

# 中华人民共和国国家标准

GB/T 18204.4—2013

代替 GB/T 18204.2~18204.8—2000,GB/T 18204.11~18204.12—2000, 部分代替 GB/T 17220—1998

# 公共场所卫生检验方法 第 4 部分:公共用品用具微生物

Examination methods for public places—
Part 4: Microorganism on a surface of public articles

2013-12-31 发布 2014-12-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 皮 布 国 国 家 标 准 化 管 理 委 员 会

# 目 次

前	膏 Ⅱ	]
1	范围	]
2	术语和定义	
3	细菌总数平皿计数法	,
4	大肠菌群多管发酵法	4
5	金黄色葡萄球菌平皿鉴定法	(
6	真菌总数平皿计数法	8
7	溶血性链球菌培养法	(
附	录 A(规范性附录) 公共场所公共用品用具微生物采样方法 ····································	,





# 前 言

GB/T 18204《公共场所卫生检验方法》分为六个部分:

- ——第1部分:物理因素;
- ——第2部分:化学污染物;
- ——第3部分:空气微生物;
- ----第 4 部分:公共用品用具微生物;
- ——第5部分:集中空调通风系统;
- ——第6部分:卫生监测技术规范。

本部分为 GB/T 18204 的第 4 部分。

本部分按照 GB/T 1.1-2009 给出的规则起草。

本部分代替 GB/T 18204.2—2000《公共场所茶具微生物检验方法 细菌总数测定》、GB/T 18204.3—2000《公共场所茶具微生物检验方法 大肠菌群测定》、GB/T 18204.4—2000《公共场所毛巾、床上卧具微生物检验方法 细菌总数测定》、GB/T 18204.5—2000《公共场所毛巾、床上卧具微生物检验方法 大肠菌群测定》、GB/T 18204.6—2000《理发用具微生物检验方法 大肠菌群测定》、GB/T 18204.7—2000《理发用具微生物检验方法 金黄色葡萄球菌测定》、GB/T 18204.8—2000《公共场所拖鞋微生物检验方法 霉菌和酵母菌测定》。代替 GB/T 18204.11—2000《公共场所浴盆、脸(脚)盆微生物检验方法 细菌总数测定》、GB/T 18204.12—2000《公共场所浴盆、脸(脚)盆微生物检验方法 细菌总数测定》、GB/T 17220—1998《公共场所沿盆、脸(脚)盆微生物检验方法 大肠菌群测定》。部分代替 GB/T 17220—1998《公共场所卫生监测技术规范》中的公共用品用具采样要求。

本部分与 GB/T 18204.2~18204.8—2000、GB/T 18204.11~18204.12—2000 和 GB/T 17220—1998 相比,主要变化如下:

- ——对菌落计数公式进行了修改:
- ——增加了溶血性链球菌检验方法。

本部分由中华人民共和国卫生部提出并归口。

本部分由中华人民共和国卫生部负责解释。

本部分负责起草单位:江苏省疾病预防控制中心。

本部分参加起草单位:南京市疾病预防控制中心。

本部分主要起草人:陈连生、沈贇、符晓梅、甄世祺、陈晓东、张秀珍、石利民。

自本部分实施之日起,GB/T 18204.2~18204.8—2000、GB/T 18204.11~18204.12—2000 全部内容和 GB/T 17220—1998 中相应内容同时废止。

GB/T 18204.2~18204.8—2000、GB/T 18204.11~18204.12—2000的历次版本发布情况为:

- ----GB/T 18204.2-2000;
- ----GB/T 18204.3;
- ----GB/T 18204.4;
- ——GB/T 18204.5;
- ----GB/T 18204.6;
- ----GB/T 18204.7;
- ----GB/T 18204.8;
- ----GB/T 18204.11-2000;
- ----GB/T 18204.12-2000.

GB/T 17220-1998 的历次版本发布情况为:

----GB/T 17220-1998.



# 公共场所卫生检验方法 第4部分:公共用品用具微生物

#### 1 范围

GB/T 18204 的本部分规定了公共场所公共用品用具细菌总数、真菌总数、大肠菌群、金黄色葡萄球菌和溶血性链球菌的采样与测定方法。

本部分适用于公共场所内公共用品用具细菌总数、真菌总数、大肠菌群、金黄葡萄球菌以及溶血性链球菌的测定,其他场所可参照执行。

#### 2 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

2.1

#### 细菌总数 total bacterial count

公共用品用具经过采样处理,在营养琼脂培养基上经 35  $\mathbb{C} \sim$  37  $\mathbb{C} \sqrt{48}$  h 培养所生长发育的嗜中温性需氧和兼性厌氧菌落的总数。

2.2

# 大肠菌群 coliforms

在37℃、24 h培养能发酵乳糖、产酸、产气、需氧和兼性厌氧的革兰氏阴性无芽孢杆菌

2.3

#### 金黄色葡萄球菌 staphylococcus aureus

在 Baird Parker 培养基或血平板培养基上生长良好,分解甘露醇产酸,血浆凝固酶阳性的革兰氏阳性葡萄状球菌。

2.4

# 真菌总数 total fungi count

在孟加拉红或沙氏琼脂培养基上经 25 ℃~28 ℃、3 d~7 d 培养所形成菌落的总数。

2.5

# 溶血性链球菌 streptococcus hemolyticus

属于链球菌属,为革兰氏阳性菌,分解葡萄糖,产酸不产气,血平板上产生溶血圈。

# 3 细菌总数平皿计数法

## 3.1 培养基与试剂

### 3.1.1 生理盐水成分:

氯化钠8.5 g蒸馏水1 000 mL

制法:称取 8.5 g 氯化钠溶于 1 000 mL 蒸馏水中,分装到试管内,每管 10 mL,121 ℃高压灭菌 15 min。

#### GB/T 18204.4—2013

3.1.2 营养琼脂成分:

蛋白胨10 g牛肉膏3 g氯化钠5 g

琼脂 10 g∼20 g 蒸馏水 1 000 mL

制法:将上述成分混合后,加热溶解,调整 pH 为  $7.4 \sim 7.6$ ,分装于玻璃容器内,经 103.43 kPa  $(121 \, \mathbb{C}, 15 \, \text{lb})$ 灭菌  $20 \, \text{min}$ ,储存于冷暗处备用。

#### 3.2 仪器和设备

- 3.2.1 高压蒸汽灭菌器。
- 3.2.2 干热灭菌箱。
- 3.2.3 恒温培养箱:36 ℃±1 ℃。
- 3.2.4 冰箱。
- 3.2.5 电炉或微波炉。
- 3.2.6 天平:感量 0.1 g。
- 3.2.7 涡旋混合器。
- 3.2.8 无菌试管、平皿(直径 9 cm)、刻度吸管等。
- 3.2.9 灭菌棉拭子。
- 3.2.10 灭菌剪刀。
- 3.2.11 pH 计或精密 pH 试纸。
- 3.2.12 放大镜或(和)菌落计数器。

# 3.3 检验步骤

- 3.3.1 采样方法见附录 A。
- 3.3.2 样品的稀释:将放有采样后棉拭子的试管充分振摇,此液为1:10的样品匀液。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 生理盐水稀释液(3.1.1)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支无菌吸管反复吹打使其混合均匀,制成1:100的样品匀液。按同法制备10倍系列稀释样品匀液,每递增稀释1次,换用1次1 mL 无菌吸管或吸头。
- 3.3.4 样品的培养:及时将 15 mL~20 mL 冷却至 45 ℃~50 ℃的平板计数琼脂培养基(可放置于 46 ℃±1 ℃恒温水浴箱中保温)倾注平皿,并转动平皿使其混合均匀。琼脂凝固后,将平板翻转, 36 ℃±1 ℃培养 48 h±2 h。

#### 3.4 菌落计数

- 3.4.1 可用肉眼观察,必要时用放大镜或菌落计数器,记录稀释倍数和相应的菌落数量(CFU)。
- 3.4.2 选取菌落数在 30 CFU~300 CFU 之间、无蔓延菌落生长的平板计数菌落总数。低于 30 CFU 的平板记录具体菌落数,大于 300 CFU 的可记录为多不可计。每个稀释度的菌落数应采用两个平板的平均数。
- 3.4.3 其中一个平板有较大片状菌落生长时,则不宜采用,而应以无片状菌落生长的平板作为该稀释

度的菌落数;若片状菌落不到平板的一半,而其余一半中菌落分布又很均匀,即可计算半个平板后乘以 2,代表一个平板菌落数。

3.4.4 平板内如有链状菌落生长时(菌落之间无明显界限),应将每条链(不同来源)作为一个菌落计。

#### 3.5 不同稀释度菌落计数计算规则

- 3.5.1 若只有一个稀释度平板上的菌落数在适宜计数范围内,计算两个平板菌落数的平均值,再将均值乘以相应稀释倍数,作为每毫升中菌落总数结果。
- 3.5.2 若有两个连续稀释度的平板菌落数在适宜计数范围内时,则总菌落数按式(1)计算,示例见表1。

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

式中:

N ——一定面积的菌落总数,CFU/cm<sup>2</sup>;

 $\Sigma C$  ——平板(含适宜范围菌落数的平板)菌落数之和,单位为 CFU;

n<sub>1</sub> ——适宜范围菌落数的第一稀释度(低)平板个数;

n<sub>2</sub> ——适宜范围菌落数的第二稀释度(高)平板个数;

d ——稀释因子(第一稀释度)。

表 1 两个连续稀释度的平板菌落数

稀释度	1:100(第一稀释度)	1:1000(第二稀释度)
菌落数	232,244	33,35

$$N = \frac{232 + 244 + 33 + 35}{2 + 0.1 \times 27 \times 10^{-2}} = \frac{544}{2.2 \times 10^{-2}} = 24727$$

上述数据经"四舍五人"后,表示为  $25\,000$  或  $2.5\times10^4$ 。

- 3.5.3 若所有稀释度的平板上菌落数均大于300 CFU,对稀释度最高的平板进行计数,其他平板可记录为多不可计,结果按平均菌落数乘以最高稀释倍数计算。
- 3.5.4 若所有稀释度的平板菌落数均小于 30 CFU,应按稀释度最低的平均菌落数乘以稀释倍数计算。
- 3.5.5 若所有稀释度(包括液体样品原液)平板均无菌落生长,以小于1乘以最低稀释倍数计算。
- 3.5.6 若所有稀释度的平板菌落数均不在 30 CFU~300 CFU 之间,其中一部分大于 300 CFU 或小于 30 CFU 时,则以最接近 30 CFU 或 300 CFU 的平均菌落数乘以稀释倍数计算。

#### 3.6 结果报告

公共用品用具细菌总数的测定结果按式(2)得出。

$$A = \frac{N \times b}{k} \qquad \qquad \cdots \qquad (2)$$

式中:

A ——细菌总数测定结果;

N ——平板平均菌落数,单位为 CFU;

b -----稀释倍数:

k ——根据采样面积、标准限值单位得出的系数。

#### 4 大肠菌群多管发酵法

#### 4.1 培养基和试剂

#### 4.1.1 乳糖胆盐发酵培养液

成分:

蛋白胨20 g猪胆盐(或牛、羊胆盐)5 g乳糖10 g溴甲酚紫水溶液(质量浓度=0.04%)25 mL蒸馏水1 000 mL

制法:将蛋白胨、胆盐及乳糖溶于蒸馏水中,调 pH 至 7.4,加溴甲酚紫溶液,混匀,分装到带有倒管的试管中,每管 10 mL。经  $68.96 \text{ kPa}(115 \, \mathbb{C}, 10 \text{ lb})$ 高压灭菌 20 min。

注:双料乳糖胆盐发酵管除蒸馏水外,其他成分加倍。

#### 4.1.2 伊红美蓝琼脂

成分:

蛋白胨10 g乳糖10 g磷酸氢二钾2 g琼脂17 g伊红水溶液(质量浓度=2%)20 mL美蓝水溶液(质量浓度=0.5%)10 mL蒸馏水1 000 mL

制法:将蛋白胨、磷酸盐和琼脂溶解于蒸馏水中,调整 pH 至 7.2,分装到烧瓶内。经 68.96 kPa (115  $\mathbb{C}$ ,10 lb)高压灭菌 20 min,临用时加入乳糖并加热熔化琼脂,冷至 50  $\mathbb{C}$ ~55  $\mathbb{C}$ ,加入伊红和美蓝溶液,摇匀,倾注平皿。

#### 4.1.3 乳糖发酵管

成分:

蛋白胨20 g乳糖10 g溴甲酚紫水溶液(质量浓度=0.04%)25 mL蒸馏水1 000 mL

制法:将蛋白胨及乳糖溶于水中,调 pH 至 7.4,加入指示剂,分装到带有倒管的试管中,每管 3 mL, 经 68.96 kPa(115  $^{\circ}$ C,10 lb)高压灭菌 20 min。

#### 4.1.4 革兰氏染色液

#### 4.1.4.1 结晶紫染色液

成分:

结晶紫 1 g 乙醇(95%,体积分数) 20 mL

草酸铵水溶液(质量浓度=1%) 80 mL制法:将结晶紫溶于乙醇中,然后与草酸铵溶液混合。

#### 4.1.4.2 革兰氏碘液

成分:

 碘
 1 g

 碘化钾
 2 g

 蒸馏水
 300 mL

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。

## 4.1.4.3 脱色剂

乙醇(95%,体积分数)。

#### 4.1.4.4 沙黄复染液

成分:

沙黄 0.25 g 乙醇(95%,体积分数) 10 mL 蒸馏水 90 mL

制法:将沙黄溶解于乙醇中,待完全溶解后加入蒸馏水。

#### 4.1.4.5 染色法

将培养 18 h~24 h 的培养物涂片。

将涂片在火焰上固定,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。

滴加乙醇脱剂,摇动玻片,直至无紫色脱落为止,约30 s,水洗。

滴加复染液,复染1 min,水洗,待干,镜检。

#### 4.2 仪器和设备

- 4.2.1 高压蒸汽灭菌器。
- 4.2.2 干热灭菌箱。
- 4.2.3 培养箱:36 ℃±1 ℃。
- 4.2.4 冰箱。
- 4.2.5 电炉或微波炉。
- 4.2.6 天平。
- 4.2.7 无菌试管、平皿(直径 9 cm)、刻度吸管等。
- 4.2.8 灭菌棉拭子。
- 4.2.9 灭菌剪刀。
- 4.2.10 pH 计或精密 pH 试纸。
- 4.2.11 显微镜。
- 4.2.12 涡旋混合器。

# 4.3 检验步骤

4.3.1 采样方法见附录 A。

# GB/T 18204.4—2013

- **4.3.2** 乳糖胆盐发酵试验:将检样倒入双料乳糖胆盐发酵培养液中。置 36 ℃±1 ℃培养箱内培养 24 h±2 h,观察是否产酸、产气,如不产酸、不产气则为大肠菌群阴性。若有变黄和气体产生,则按下列步骤进行。
- **4.3.3** 分离培养:自产酸、产气发酵管中取一接种环培养液,转种伊红美蓝琼脂平板上,置 36 ℃±1 ℃ 培养箱培养 18 h~24 h,然后取出,观察菌落形态,并做革兰氏染色和证实性试验。

深紫黑色、具有金属光泽的菌落;

紫黑色、不带或略带金属光泽的菌落;

淡紫红色、中心较深的菌落。

**4.3.4** 证实性试验:在上述平板上,挑取可疑大肠菌群菌落  $1 \land \sim 2 \land$  进行染色镜检;同时接种乳糖发酵管,置  $36 \lor \pm 1 \lor$  培养  $24 \lor h \pm 2 \lor h$ 。

#### 4.4 结果报告

凡乳糖发酵管最终产酸、产气,革兰氏染色为阴性的无芽孢杆菌,即可报告检出大肠菌群。

#### 5 金黄色葡萄球菌平皿鉴定法

#### 5.1 培养基和试剂

#### 5.1.1 胰酪胨大豆肉汤

成分:

胰酪胨(或胰蛋白胨)17 g植物蛋白胨(或大豆蛋白胨)3 g氯化钠100 g磷酸氢二钾2.5 g葡萄糖2.5 g蒸馏水1 000 mL

制法:将上述成分混合后,加热溶解,调 pH 为 7.2~7.3,分装,121 ℃、20 min 高压灭菌。

#### 5.1.2 氯化钠肉汤(75 g/L)

成分:

蛋白胨10 g牛肉膏3 g氯化钠75 g蒸馏水1 000 mL

制法:将上述成分加热溶解,调 pH 为 7.4,分装,121 ℃、20 min 高压灭菌。

#### 5.1.3 Baird Parker 平板

成分:

胰蛋白胨10 g牛肉膏5 g酵母浸膏1 g丙酮酸钠10 g甘氨酸12 g

氯化锂 (LiCl・6H<sub>2</sub>O)5 g琼脂蒸馏水5 g20 g950 mL

增菌剂的配制:卵黄盐水(30%,体积分数)50 mL 与除菌过滤的亚碲酸钾溶液(质量浓度=1%)10 mL 混合,保存于冰箱内。

制法:将各成分加到蒸馏水中,加热煮沸完全溶解,冷至 25 ℃校正 pH 至 7.0±0.2。分每瓶95 mL, 121 ℃高压灭菌 15 min,临用时加热熔化琼脂,每 95 mL 加入预热至 50 ℃的卵黄亚碲酸钾增菌 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。

#### 5.1.4 血琼脂培养基

成分:

营养琼脂 100 mL 脱纤维羊血(或兔血) 10 mL

制法:将营养琼脂加热溶化,待冷至50℃左右以无菌方法加入脱纤维羊血,摇匀,制成平板,置冰箱内备用。

#### 5.1.5 革兰氏染色液

见 4.1.4。

#### 5.2 仪器和设备

- 5.2.1 显微镜。
- 5.2.2 恒温培养箱:36 ℃±1 ℃。
- 5.2.3 离心机。
- 5.2.4 天平。
- 5.2.5 高压灭菌锅。
- 5.2.6 热灭菌箱。
- 5.2.7 无菌试管、平皿(直径 9 cm)、刻度吸管等。
- 5.2.8 pH 计或精密 pH 试纸
- 5.2.9 载玻片。
- 5.2.10 酒精灯。
- 5.2.11 电炉或微波炉。

#### 5.3 操作步骤

- 5.3.1 采样方法见附录 A。
- 5.3.2 将 1 mL 样品放入 9 mL 氯化钠肉汤(5.1.2)或胰酪胨大豆肉汤(5.1.1)培养基中,36 ℃±1 ℃培养 24 h。
- 5.3.3 从培养液中取 1 接种环~2 接种环,划线接种在 Baird Parker 平板(5.1.3)或用血琼脂培养基(5.1.4),于 36 ℃±1 ℃培养 24 h。在 Baird Parker 平板培养基上菌落为圆形、光滑、凸起湿润、颜色呈黑灰色、边缘整齐、周围混浊、外层有一透明带;在血平板上菌落呈圆形、金黄色、凸起、表面光滑、周围有溶血圈。
- 5.3.4 挑取典型菌落作涂片染色镜检,为革兰氏阳性,成葡萄状排列。
- 5.3.5 血浆凝固酶试验:吸取 1:4 新鲜血浆 0.5 mL 放入灭菌小试管中,再加入待检菌 24 h 肉汤培养物 0.5 mL。混匀,放 36  $\mathbb{C}\pm 1$   $\mathbb{C}$  温箱或水浴中,每 30 min 观察 1 次,24 h 之内如呈现凝块即为阳性。

#### GB/T 18204.4-2013

同时以已知血浆凝固酶阳性和阴性菌株肉汤培养物及肉汤培养基各 0.5 mL,分别加入灭菌小试管内与 1:4 血浆 0.5 mL 混匀,作为对照。

#### 5.4 结果报告

凡在上述选择平板上有可疑菌落生长,经染色镜检,证明为革兰氏阳性葡萄球菌,血浆凝固酶试验 阳性,可报告检出金黄色葡萄球菌。

## 6 真菌总数平皿计数法

#### 6.1 培养基与试剂

#### 6.1.1 生理盐水

见 3.1.1。

#### 6.1.2 孟加拉红培养基

成分: 蛋白胨 5 g 10 g 葡萄糖 磷酸二氢钾 1 g 0.5 g 硫酸镁(MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O) 琼脂 20 g 氯霉素

0.1 g

蒸馏水 1 000 mL 100 mL 孟加拉红水溶液(质量浓度=1:3000)

制法:将蛋白胨、葡萄糖、磷酸二氢钾、硫酸镁和琼脂溶于蒸馏水中,再加入孟加拉红溶液,分装后 121 ℃高压灭菌 20 min, 待冷至 55 ℃左右加入氯霉素。

#### 6.1.3 沙氏琼脂培养基

成分:

蛋白胨 10 g 葡萄糖 40 g 琼脂 20 g 氯霉素 0.1 g蒸馏水 1 000 mL

制法:将蛋白胨、葡萄糖和琼脂溶于蒸馏水中,分装后 121 ℃高压灭菌 15 min,待冷至 55 ℃左右加 入氯霉素。

#### 6.2 仪器和设备

- 6.2.1 恒温箱:25 ℃~28 ℃。
- 6.2.2 天平。
- 6.2.3 冰箱。
- 6.2.4 高压蒸汽灭菌器。
- 6.2.5 电炉或微波炉。

- 6.2.6 无菌试管、平皿(直径 9 cm)、刻度吸管等。
- 6.2.7 pH 计或精密 pH 试纸。
- 6.2.8 放大镜或(和)菌落计数器。

#### 6.3 检验步骤

- 6.3.1 采样方法见附录 A。
- 6.3.2 样品的稀释:将盛有棉拭子的盐水管在手心用力振荡 80 次,再用带橡皮乳头的 1 mL 灭菌吸管 反复吹吸 50 次,使真菌孢子充分散开,制成 1:10 稀释液。

用灭菌吸管吸取 1:10 稀释液 2 mL,分别注入到 2 个灭菌平皿内,每皿 1 mL。另取 1 mL 注入 9 mL 灭菌盐水管中,换 1 支 1 mL 灭菌吸管吹吸 5 次,此液为 1:100 稀释液。按上述操作顺序作10 倍递增稀释液,每稀释一次,换 1 支 1 mL 灭菌吸管,根据样品的污染情况,选择 3 个合适的稀释度。

**6.3.3** 样品的培养:将溶化并冷却至 45 ℃左右的培养基注入灭菌的平皿中,待琼脂凝固后,倒置于 25 ℃~28 ℃温箱中,3 d后开始观察,共培养观察一周。

#### 6.4 菌落计数

- 6.4.1 通常选择菌落数在 5 CFU~50 CFU 之间的平皿进行计数,同稀释度的两个平皿的菌落平均数乘以稀释倍数,即为每毫升检样中所含菌落数。
- 6.4.2 若两个稀释度的菌落数皆在规定范围之间或3个稀释度皆不在此范围时,应参照3.5 计数。

#### 6.5 结果报告

公共用品用具真菌总数的测定结果按式(3)得出。

$$A = \frac{N \times b}{k} \qquad \qquad \dots \tag{3}$$

式中:

A ——真菌总数测定结果;

N ——平板平均菌落数,单位为 CFU;

b -----稀释倍数:

k ——根据采样面积、标准限值单位得出的系数。

### 7 溶血性链球菌培养法

# 7.1 培养基和试剂

7.1.1 葡萄糖肉浸液肉汤

成分:

 绞碎牛肉
 500 g

 氯化钠
 5 g

 蛋白胨
 10 g

 磷酸氢二钾
 2 g

 蒸馏水
 1 000 mL

制法:将绞碎之去筋膜无油脂牛肉 500 g 加蒸馏水 1 000 mL,混合后放冰箱过夜,除去液面之浮油,隔水煮沸 30 min,使肉渣完全凝结成块,用绒布过滤,并挤压收集全部滤液,加水补充原量。加入蛋白胨、氯化钠和磷酸盐,溶解后调整 pH7.4~7.6 煮沸并过滤,加入 1%的葡萄糖,121  $^{\circ}$  高压灭菌 15 min。

#### GB/T 18204.4-2013

#### 7.1.2 匹克氏肉汤

成分:

胰蛋白胨的牛心浸液(质量浓度=1%) 200 mL 结晶紫盐水溶液(质量浓度=0.04%) 10 mL 三氮化钠溶液(质量浓度=0.125%) 10 mL 脱纤维兔血(或羊血) 10 mL

制法:将上述已灭菌的各种成分,以无菌操作依次混合,保存于冰箱备用。

- 7.1.3 血琼脂:见 5.1.4。
- 7.1.4 草酸钾人血浆:草酸钾 0.01 g 放入灭菌小试管中,再加入 5 mL 人血,混匀,经离心沉淀,吸取上清液即为草酸钾人血浆。
- 7.1.5 氯化钙(质量浓度=0.25%)。
- 7.1.6 灭菌生理盐水(质量浓度=0.85%)。
- 7.1.7 革兰氏染液:见 4.1.4。

#### 7.2 仪器和设备

- 7.2.1 高压灭菌箱。
- 7.2.2 恒温水浴锅:36 ℃±1
- 7.2.3 显微镜。
- 7.2.4 电炉或微波炉。
- 7.2.5 无菌试管、平皿(直径 9 cm)、刻度吸管等。
- 7.2.6 载玻片。
- 7.2.7 均质器。
- 7.2.8 离心机。
- 7.2.9 天平。

#### 7.3 操作步骤

- 7.3.1 采样方法见附录 A。
- 7.3.2 取 1 mL 液体检样,加入 9 mL 葡萄糖肉浸液肉汤;或直接划线接种于血平板,如检样污染严重,可同时按上述量接种匹克氏肉汤,经 36  $\mathbb{C}\pm 1$   $\mathbb{C}$ 培养 24 h,接种血平板,置 36  $\mathbb{C}\pm 1$   $\mathbb{C}$ 培养 24 h,挑起有溶血圆形的细小菌落,在血平板上分纯,然后观察溶血情况及革兰氏染色。
- 7.3.3 形态与染色:本菌呈球形或卵圆形,直径  $0.5~\mu m \sim 1~\mu m$ ,链状排列,链长短不一,短者  $4~h \sim 8~h \sim 1$  细胞组成,长者  $20~h \sim 30~h$ ,链的长短常与细菌的种类及生长环境有关;液体培养中易呈长链;在固体培养基中常呈短链,不形成芽孢,无鞭毛,不能运动。
- 7.3.4 培养特性:该菌营养要求较高,在普通培养基上生长不良,在加有血液、血清的培养基中生长较好。溶血性链球菌在血清肉汤中生长时管底呈絮状或颗粒状沉淀。血平板上菌落为灰白色,半透明或不透明,表面光滑,有乳光,直径约0.5 mm~0.75 mm,为圆形突起的细小菌落,溶血性链球菌周围有溶血圈。

#### 7.4 结果报告

在血平板上呈灰白色菌落,菌落透明或半透明,表面光滑有乳光,镜检为革兰氏阳性无芽孢球菌,圆形或卵圆形,呈链状排列,菌落周围有溶血环,可报告为样品中检出溶血性链球菌。

#### 附录A

#### (规范性附录)

#### 公共场所公共用品用具微生物采样方法

#### A.1 范围

本附录规定了公共场所公共用品用具微生物采样的基本要求。

#### A.2 一般要求

随机抽取清洗消毒后准备使用的公共用品用具,无菌操作,使用灭菌干燥棉拭子,于 10 mL 灭菌生理盐水内浸润(吸取约 1 mL 溶液)后,在用品用具的适当部位来回均匀涂抹进行样品采集,再用灭菌剪刀剪去棉签手接触的部分,将棉拭子放入剩余的 9 mL 生理盐水内,4 h 内送检。

#### A.3 采集部位与采样面积

#### A.3.1 杯具

在荼具内、外缘与口唇接触处,即  $1 \text{ cm} \sim 5 \text{ cm}$  高处一圈采样。采样总面积为  $50 \text{ cm}^2$ 。

#### A.3.2 棉织品

- **A.3.2.1** 在毛巾、枕巾、浴巾对折后两面的中央  $5 \text{ cm} \times 5 \text{ cm} (25 \text{ cm}^2)$ 面积范围内分别均匀涂抹  $5 \text{ 次,每} 25 \text{ cm}^2$  采样面积为 1 份样品,每件用品共采集 2 份样品。
- **A.3.2.2** 在床单、被单的上下两部即与颈部、脚部接触部位  $5 \text{ cm} \times 5 \text{ cm} (25 \text{ cm}^2)$ 面积范围内分别均匀涂抹 5 次,每  $25 \text{ cm}^2$  采样面积为 1 份样品,每件用品共采集 2 份样品。
- **A.3.2.3** 睡衣、睡裤随机选择  $2 \uparrow 5 \text{ cm} \times 5 \text{ cm} (25 \text{ cm}^2)$ 面积范围内分别均匀涂抹  $5 \not x$ ,每  $25 \text{ cm}^2$  采样面积为 1 份样品,每件用品共采集 2 份样品。

#### A.3.3 洁具

- **A.3.3.1** 浴盆:在盆内一侧壁二分之一高度及盆底中央 5 cm×5 cm(25 cm²)范围内分别涂抹采样,每 25 cm² 采样面积为 1 份样品,每件用具共采集 2 份样品。
- **A.3.3.2** 脸(脚)盆:在盆内二分之一高度相对两侧壁  $5 \text{ cm} \times 5 \text{ cm} (25 \text{ cm}^2)$ 范围内分别涂抹采样,每  $25 \text{ cm}^2$  采样面积为 1 份样品,每件用具共采集 2 份样品。
- **A.3.3.3** 坐便器:在坐便圈前部弯曲处选择 2 个 5 cm×5 cm(25 cm²)范围内分别涂抹采样,每 25 cm² 采样面积为 1 份样品,每件用具共采集 2 份样品。
- **A.3.3.4** 按摩床(椅):在床(椅)面中部选择  $2 \uparrow 5 \text{ cm} \times 5 \text{ cm} (25 \text{ cm}^2)$ 范围内分别涂抹采样,每  $25 \text{ cm}^2$  采样面积为 1 份样品,每件用具共采集 2 份样品。

#### A.3.4 鞋类

在每只鞋的鞋内与脚趾接触处  $5 \text{ cm} \times 5 \text{ cm}$  面积范围内分别均匀涂抹 5 次, 1 双鞋为  $1 \text{ 份样品}, \mathcal{K}$  样总面积为  $50 \text{ cm}^2$ 。

#### A.3.5 购物车(筐)

在车(筐)把手处选择 2 个 5 cm×5 cm 面积范围内分别均匀涂抹 5 次,1 件物品为 1 份样品,采样总面积为 50 cm<sup>2</sup>。

#### A.3.6 美容美发美甲用品

- A.3.6.1 理发推子:应在推子的前部上下均匀各涂抹 3 次,采样面积达到 25 cm² 为 1 份样品。
- A.3.6.2 理发刀、剪:在刀、剪两面个各涂抹1次,采样面积达到25 cm²为1份样品。
- A.3.6.3 美容美甲用品:与人体接触处涂抹采样,采样面积达到 25 cm² 为 1 份样品。
- A.3.6.4 修脚工具:在修脚工具与人体接触处涂抹采样,采样面积达到 50 cm² 为 1 份样品。

# A.3.7 其他用品

在用品与人体接触处选择 2 个 5 cm×5 cm 面积范围内分别采样,每 25 cm² 采样面积为 1 份样品,每件用品共采集 2 份样品。





# ⚠ 版权声明

中国标准在线服务网(www.spc.org.cn)是中国质检出版社委托北京标科网络技术有限公司负责运营销售正版标准资源的网络服务平台,本网站所有标准资源均已获得国内外相关版权方的合法授权。未经授权,严禁任何单位、组织及个人对标准文本进行复制、发行、销售、传播和翻译出版等违法行为。版权所有,违者必究!

# 中国标准在线服务网 http://www.spc.org.cn

标准号: GB/T 18204.4-2013

购买者: 光泽疾控中心

订单号: 0100181113029849

防伪号: 2018-1113-0413-1237-5141

时 间: 2018-11-13

定 价: 28元



GB/T 18204, 4-2013

中 华 人 民 共 和 国 国 家 标 准 公共场所卫生检验方法 第 4 部分:公共用品用具微生物

GB/T 18204.4-2013

中国标准出版社出版发行 北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029) 北京市西城区三里河北街16号(100045)

> 网址:www.gb168.cn 服务热线:400-168-0010

010-68522006

2014年6月第一版

\*

书号: 155066 • 1-49359

版权专有 侵权必究