

中华人民共和国国家标准

GB 4789. 11-2014

食品安全国家标准

食品微生物学检验 β 型溶血性链球菌检验

2014-12-01 发布

2015-05-01 实施

中华人民共和国
国家卫生和计划生育委员会 发布

前　　言

本标准代替 GB/T 4789.11—2003《食品卫生微生物学检验 溶血性链球菌检验》。

本标准与 GB/T 4789.11—2003 相比，主要变化如下：

- 修改了标准名称；
- 修改了范围；
- 增加了术语和定义；
- 修改了设备与材料；
- 修改了培养基与试剂；
- 删除了以无菌生理盐水稀释样品的步骤和杆菌肽敏感试验；
- 增加了触酶试验；
- 增加了附录 A。

食品安全国家标准

食品微生物学检验 β 型溶血性链球菌检验

1 范围

本标准规定了食品中 β 型溶血性链球菌 (*Streptococcus*) 的检验方法。

本标准适用于食品中 β 型溶血性链球菌的检验。

2 术语和定义

2.1 β 型溶血

在菌落周围形成完全透明的溶血环，红细胞完全溶解。

2.2 β 型溶血性链球菌

能够产生 β 型溶血的化脓（或 A 群）链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 和无乳（或 B 群）链球菌 (*Streptococcus agalactiae*)。

3 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：

- a) 恒温培养箱：36 $^{\circ}\text{C} \pm 1$ $^{\circ}\text{C}$ ；
- b) 冰箱：2 $^{\circ}\text{C} \sim 5$ $^{\circ}\text{C}$ ；
- c) 厌氧培养装置；
- d) 天平：感量 0.1 g；
- e) 均质器与配套均质袋；
- f) 显微镜：10 倍～100 倍；
- g) 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；
- h) 无菌锥形瓶：容量 100 mL、200 mL、2 000 mL；
- i) 无菌培养皿：直径 90 mm；
- j) pH 计或 pH 比色管或精密 pH 试纸；
- k) 水浴装置：36 $^{\circ}\text{C} \pm 1$ $^{\circ}\text{C}$ ；
- l) 微生物生化鉴定系统。

4 培养基和试剂

- 4.1 改良胰蛋白胨大豆肉汤 (Modified tryptone soybean broth, mTSB)：见附录 A 中 A.1。
- 4.2 哥伦比亚 CNA 血琼脂(Columbia CNA blood agar)：见附录 A 中 A.2。
- 4.3 哥伦比亚血琼脂(Columbia blood agar)：见附录 A 中 A.3。
- 4.4 革兰氏染色液：见附录 A 中 A.4。
- 4.5 胰蛋白胨大豆肉汤 (Tryptone soybean broth, TSB)：见附录 A 中 A.5。
- 4.6 草酸钾血浆：见附录 A 中 A.6。

- 4.7 0.25%氯化钙(CaCl_2)溶液：见附录A中A.7。
 4.8 3%过氧化氢(H_2O_2)溶液：见附录A中A.8。
 4.9 生化鉴定试剂盒或生化鉴定卡。

5 检验程序

溶血性链球菌检验程序见图1。

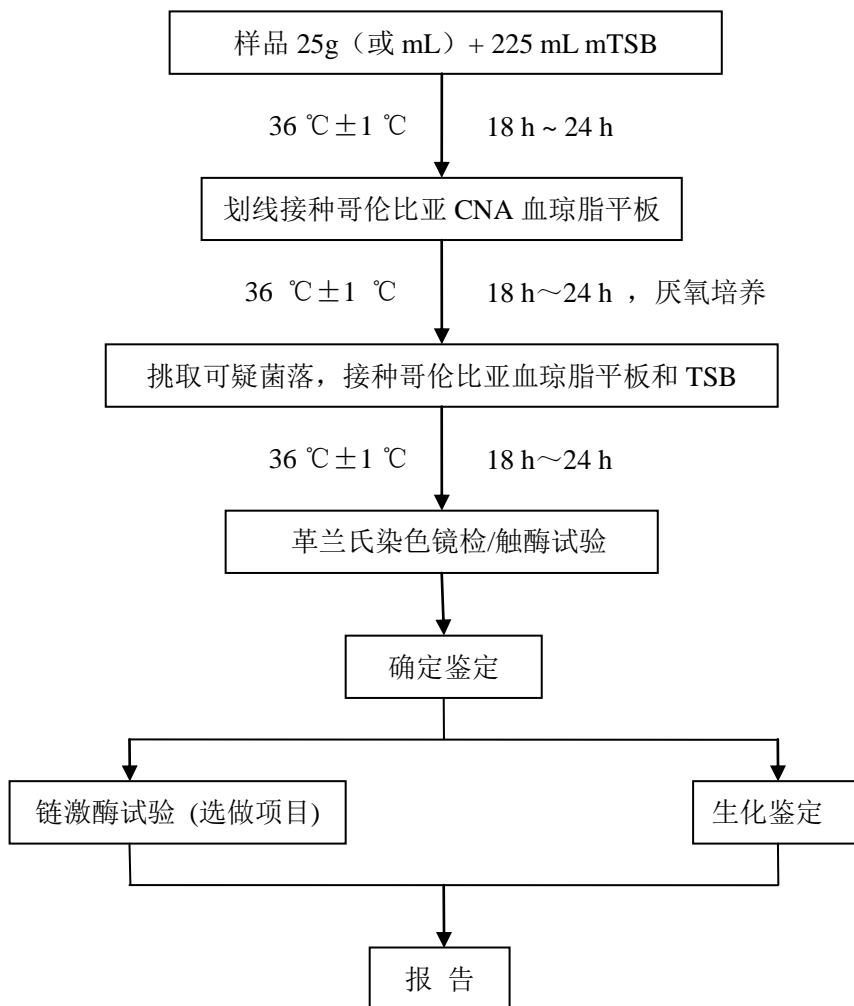


图1 溶血性链球菌检验程序

6 操作步骤

6.1 样品处理及增菌

按无菌操作称取检样 25 g (mL)，加入盛有 225 mL mTSB 的均质袋中，用拍击式均质器均质 1 min~2 min；或加入盛有 225 mL mTSB 的均质杯中，以 8000 r/min~10000 r/min 均质 1 min~2 min。若样品为液态，振荡均匀即可。36 °C ± 1 °C 培养 18 h~24 h。

6.2 分离

将增菌液划线接种于哥伦比亚 CNA 血琼脂平板，36 °C ± 1 °C 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。

6.3 鉴定

6.3.1 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。

6.3.2 革兰氏染色镜检

挑取可疑菌落染色镜检。 β 型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。

6.3.3 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 型溶血性链球菌触酶为阴性。

6.3.4 链激酶试验(选做项目)

吸取草酸钾血浆0.2 mL于0.8 mL灭菌生理盐水中混匀，再加入经36℃±1℃培养18 h~24 h的可疑菌的TSB培养液0.5 mL及0.25%氯化钙溶液0.25 mL，振荡摇匀，置于36℃±1℃水浴中10 min，血浆混合物自行凝固(凝固程度至试管倒置，内容物不流动)。继续36℃±1℃培养24 h，凝固块重新完全溶解为阳性，不溶解为阴性， β 型溶血性链球菌为阳性。

6.3.5 其他检验

使用生化鉴定试剂盒或生化鉴定卡对可疑菌落进行鉴定。

7 结果与报告

综合以上试验结果，报告每25 g(mL)检样中检出或未检出溶血性链球菌。

附录 A

培养基与试剂

A. 1 改良胰蛋白胨大豆肉汤培养基 (Modified tryptone soybean broth, mTSB)

A. 1. 1 基础培养基 (胰蛋白胨大豆肉汤 TSB)

A. 1. 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. 1. 1. 2 制法

将A. 1. 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 °C灭菌15 min，备用。

A. 1. 2 抗生素溶液

A. 1. 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. 1. 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. 1. 3 完全培养基

A. 1. 3. 1 成分

胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)	1 000.0 mL
多黏菌素溶液	10.0 mL
萘啶酮酸钠溶液	10.0 mL

A. 1. 3. 2 制法

无菌条件下，将A.1.3.1中各成分进行混合，充分混匀，分装备用。

A. 2 哥伦比亚CNA血琼脂 (Columbia CNA blood agar)

A. 2. 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. 2. 2 制法

将 A.2.1 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. 3 哥伦比亚血琼脂(Columbia blood agar)

A. 3. 1 基础培养基

A. 3. 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	1 000.0 mL

A. 3. 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. 3. 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. 3. 3 完全培养基

A. 3. 3. 1 组分

基础培养基	1 000.0 mL
无菌脱纤维绵羊血	50.0 mL

A. 3. 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. 4 革兰氏染色液

A. 4. 1 结晶紫染色液基础培养基

A. 4. 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. 4. 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. 4. 2 革兰氏碘液

A. 4. 2. 1 成分

碘	1.0 g
碘化钾	2.0 g
蒸馏水	300.0 mL

A. 4. 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. 4. 3 沙黄复染液

A. 4. 3. 1 成分

沙黄	0.25 g
95%乙醇	10.0 mL
蒸馏水	90.0 mL

A. 4. 3. 2 制法

将沙黄溶解于乙醇中，然后用蒸馏水稀释。

A. 4. 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. 5 胰蛋白胨大豆肉汤 (Tryptone soybean broth, TSB)

A. 5. 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. 5. 2 制法

将A. 5. 1中各成分溶于蒸馏水中，加热溶解，校正pH至7.3±0.2，121 °C灭菌15 min，分装备用。

A. 6 草酸钾血浆

A. 6. 1 成分

草酸钾	0.01 g
人血	5.0 mL

A. 6. 2 制法

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血浆。

A. 7 0.25%氯化钙(CaCl_2)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22.2g氯化钙（无水）溶于蒸馏水中，分装备用。

A. 8 3%过氧化氢(H_2O_2)溶液

A. 8. 1 成分

30%过氧化氢(H_2O_2)溶液	100.0 mL
蒸馏水	900.0 mL

A. 8. 2 制法

吸取100mL 30%过氧化氢(H_2O_2)溶液，溶于蒸馏水中，混匀，分装备用。