

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 0172—2010
代替 SN/T 0172—1992

进出口食品中金黄色葡萄球菌检验方法

Determination of *Staphylococcus aureus*
in foods for import and export

www.kingsheng.com.cn
凯恒生物

2010-05-27 发布

2010-12-01 实施



中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 SN 0172—1992《出口食品中金黄色葡萄球菌检验方法》。

本标准与 SN 0172—1992 相比,主要技术变化如下:

——将原标准名称《出口食品中金黄色葡萄球菌检验方法》修订为《进出口食品中金黄色葡萄球菌检验方法》。

——将原标准的范围修订为:“本标准适用于进出口食品中金黄色葡萄球菌检验”;

——在仪器和设备中增加了 pH 计、天平、均质器并在检样制备中增加了拍击式均质器的拍击速度及时间。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位:中华人民共和国天津出入境检验检疫局、中华人民共和国山东出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:赵宏、高旗利、雷质文、张海滨、张宏伟、魏亚东、赵良娟、侯丽萍、张曼、李正义、唐静、张健、马维兴。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

——SN 0172—1992。

进出口食品中金黄色葡萄球菌检验方法

1 范围

本标准规定了进出口食品中金黄色葡萄球菌的检验方法。

本标准适用于进出口食品中金黄色葡萄球菌的检验。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件,凡是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。

SN/T 1538.1 培养基制备指南 第1部分:实验室培养基制备质量保证通则

SN/T 1538.2 培养基制备指南 第2部分:培养基性能测试实用指南

3 检验方法

3.1 培养基和试剂

3.1.1 普通肉汤培养基:见附录A第A.1章。

3.1.2 胰蛋白胨大豆肉汤:见附录A第A.2章。

3.1.3 Baird-Parker 培养基(BP):见附录A第A.3章。

3.1.4 甲苯胺蓝-DNA 琼脂:见附录A第A.4章。

3.1.5 生理盐水:见附录A第A.5章。

3.1.6 凝固酶试验兔血浆:见附录A第A.6章。

3.2 设备与材料

3.2.1 供常规平板计数用的基本设备与材料。

3.2.2 L形玻璃棒。

3.2.3 pH计。

3.2.4 天平:精确至0.1g。

3.2.5 均质器或拍击式均质器。

3.2.6 无菌均质杯或均质袋(Nasco WHIRL-PAK 24 OZ./710 mL或相当者)。

3.3 检样制备

3.3.1 固体或半固体食品以无菌操作称取25g样品,放入装有225mL灭菌生理盐水的灭菌均质杯(无菌均质袋)内,于8000r/min均质1min~2min或用拍打式均质器以每秒6次~9次挤压、拍击1min,制成1:10样品匀液。

3.3.2 液体食品用灭菌吸管吸取25mL样品,放入装有225mL灭菌生理盐水的灭菌玻璃瓶内(瓶内预置适当数量的玻璃珠),经充分振摇制成1:10样品匀液。

3.3.3 供计数检验时,可按十进位递增稀释法将样品匀液再进行适当稀释。

3.4 操作步骤

3.4.1 最可能数(MPN)测定法

3.4.1.1 适用于检测认为带有大量竞争菌的食品及其原料和含少量金黄色葡萄球菌的食品。

3.4.1.2 选3个连续稀释度,从每个稀释度分别取1 mL稀释样品液,接种3管含10%氯化钠胰蛋白胨大豆肉汤。样品的最高稀释度应达到能获得阴性终点,置 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养48 h。

3.4.1.3 用3 mm接种环,从有细菌生长的各管中移取1环,划线接种于表面干燥的BP琼脂平板,置 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养45 h~48 h。

3.4.1.4 从有细菌生长的每一平板上至少挑取5个可疑金黄色葡萄球菌菌落(参见附录B),移种到普通肉汤培养基中,置 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养20 h~24 h。

3.4.1.5 取肉汤培养物0.3 mL同0.5 mL凝固酶试验兔血浆于8 mm×100 mm试管内充分混合,置 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养,定时观察是否有凝块形成,至少观察6 h,以内容物完全凝固,使试管倒置或倾斜时不流动者为阳性。试验中需同时做已知阳性和阴性对照。对典型或可疑结果进行革兰氏染色,镜检和其他辅助试验[如:耐热核酸酶试验(参见附录C)]加以证实。

3.4.2 平板表面计数法

3.4.2.1 适用于检查金黄色葡萄球菌数不小于10 g或10 mL的食品。

3.4.2.2 选3个连续稀释度,从每个稀释度分别取1 mL稀释样液,接种至3个表面干燥的BP琼脂平板上(如:0.4 mL—0.3 mL—0.3 mL)。

3.4.2.3 以L形玻璃棒将接种物涂布于琼脂表面,避免涂到平板边缘,将平板正置直至接种物被培养基吸收,将平板翻转, $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养45 h~48 h。

3.4.2.4 挑选有20个~200个菌落的平板进行计数。如果有数种菌落皆类似金黄色葡萄球菌,则分别计算和记录每一类型的菌落数。当最低稀释度的平板的菌落数小于20时,仍可选用。如平板上的菌落数大于200,其中有些菌落具典型金黄色葡萄球菌的外观,同时在其高倍稀释度未出现典型菌落者,亦可用这些平板进行金黄色葡萄球菌计数,但不能把非典型菌落计算在内。

3.4.2.5 从可计数的各类型菌落中至少各选取2个以上典型或可疑菌落进行凝固酶试验。

3.4.3 定性检测法

3.4.3.1 取1:10稀释的样品液10 mL,接种于10 mL双料胰蛋白胨大豆肉汤中, $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养2 h。

3.4.3.2 再加入20 mL含20%氯化钠的单料胰蛋白胨大豆肉汤, $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养24 h±2 h。

3.4.3.3 取上述培养物0.2 mL,分别涂布于2个表面干燥的BP琼脂平板上, $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养46 h±2 h。

3.4.3.4 从每个平板上至少挑取2个以上典型或可疑金黄色葡萄球菌菌落进行凝固酶试验。

3.5 结果的计算与报告

3.5.1 最可能数(MPN)法的估算与报告

3.5.1.1 计算每个稀释样液得到的阳性反应管数。

3.5.1.2 若一管次培养物中所挑选的典型菌落中有一个为凝固酶阳性,则该供试培养物的管应视为阳性。

3.5.1.3 根据所确认的阳性管数,用最可能数(MPN)表(见附录D)估算并报告每克或每毫升试样的金黄色葡萄球菌最可能数。以MPN/g或MPN/mL报告。

3.5.2 平板表面计数的计算与报告

3.5.2.1 一般原则

用所选择计数的每个平板上典型和可疑金黄色葡萄球菌的菌落总数,乘以相应平板上已确认为金黄色葡萄球菌的菌落数与所挑取的5个有代表性的菌落数之比,以此求出所选用的同一稀释度两个计数平板上的金黄色葡萄球菌菌落数并计算平均值,再乘以该稀释倍数,得出金黄色葡萄球菌 CFU/g 或 CFU/mL。例如:在 10^{-1} 样液的两个平板中分别有 85 个和 80 个菌落,而确认在 5 个菌落中分别有 4 个和 3 个为金黄色葡萄球菌,那么每克或每毫升食品的金黄色葡萄球菌数为 $(85 \times 4/5 + 80 \times 3/5) / 2 \times 10 = 580$ 。

3.5.2.2 无特征性菌落

对于测试试样最低稀释度的两个平板上均无典型或可疑菌落,结果应报告小于 1 乘以最低稀释倍数 CFU/g 或 CFU/mL。

3.5.3 定性法报告

3.5.3.1 报告阴性结果:未检出金黄色葡萄球菌/25 g(25 mL)。

3.5.3.2 报告阳性结果:检出金黄色葡萄球菌/25 g(25 mL)。

附 录 A
(规范性附录)
培养基与试剂

A.1 一般要求

为保证培养基的质量,应按 SN/T 1538.1 和 SN/T 1538.2 进行培养基的制备与性能测试。若使用商售的脱水合成培养基,应选用国内外通过 ISO 9000 质量体系认证生产厂商的产品并按其说明制备和使用。

A.2 普通肉汤培养基

A.2.1 成分

牛肉膏	5.0 g
氯化钠	5.0 g
蛋白胨	20.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A.2.2 制法

将以上成分混合加热溶化,调至 pH7.4~7.6,分装试管,121℃ 高压灭菌 30 min。

A.3 胰蛋白胨大豆肉汤

A.3.1 成分

胰蛋白胨	17.0 g
植物蛋白胨	3.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸氢二钾(K_2HPO_4)	2.5 g
葡萄糖	2.5 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A.3.2 制法

将各成分溶于蒸馏水中,必要时加热使完全溶解,分装于试管或玻瓶中,121℃ 高压灭菌 15 min,最终 pH7.3±0.2。

注:制备双料胰蛋白胨大豆肉汤时,除蒸馏水外,其他成分加倍。配制 10% 或 20% 氯化钠胰蛋白胨大豆肉汤时,可将氯化钠量增加至所需浓度。

A.4 Baird-Parker 培养基

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 ₂ O)	5.0 g
琼脂	20.0 g
蒸馏水	950.0 mL

A. 4.2 制法

将各成分加于蒸馏水中,加热煮沸使完全溶解,冷至 25 ℃,调至 pH7.0±0.2,分装每瓶 95 mL,121 ℃高压灭菌 15 min,临用时加热熔化琼脂,冷至 50 ℃左右,于每 95 mL 加入预热至 50 ℃的卵黄亚硝酸钾增菌剂 5 mL。摇匀后倾注平皿培养基,应是致密不透明的,使用前在冰箱贮存不得超过 48 h。

A. 4.3 卵黄亚硝酸钾增菌剂配制

将新鲜鸡蛋浸泡在适当的氯化汞(HgCl₂)溶液(1:1 000)中约 1 min,以无菌操作打开鸡蛋,使蛋黄与蛋白分开,将蛋黄加于生理盐水中(30%)充分摇匀,于 50 mL 蛋黄乳液中加入 10 mL 过滤除菌的 1%亚硝酸钾水溶液,混匀,4 ℃±1 ℃贮存。

A. 5 甲苯胺蓝-DNA 琼脂

A. 5.1 成分

脱氧核糖核酸(DNA)	0.3 g
琼脂	10.0 g
氯化钙(CaCl ₂ 无水)	1.1 mg
氯化钠	10.0 g
甲苯胺蓝(O)	0.083 g
三羟甲基氨基甲烷	6.1 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A. 5.2 制法

将三羟甲基氨基甲烷溶解于蒸馏水中,调至 pH9.0,除甲苯胺蓝(O)外将其余各项成分加热使溶解。再将甲苯胺蓝(O)溶于培养基中。分装于塞有橡皮塞的烧瓶中。如立即使用可不需灭菌。已灭菌的培养基在室温可存放 4 个月无变化,并经数次熔化后仍可使用。

A. 6 生理盐水

A. 6.1 成分

氯化钠	8.5 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A. 6.2 制法

将氯化钠溶于蒸馏水中,分装于适当容器中,121 ℃高压灭菌 15 min。

A.7 凝固酶试验兔血浆

临用时取 3.8% (取柠檬酸钠 3.8 g 加蒸馏水 100 mL, 待溶解后过滤, 121 °C 高压灭菌 15 min) 柠檬酸钠 1 份, 加入新鲜兔血 4 份, 混匀后放冰箱中使用球沉降 (或以 3 000g 离心 30 min) 后取上清液进行试验。也可采用等效的商品化凝固酶试剂。

www.kinghunt.cn
凯恒生物

附录 B

(资料性附录)

典型或可疑金黄色葡萄球菌菌落

金黄色葡萄球菌的单个菌落在 BP 琼脂一平板上呈圆形,表面光滑、凸起、湿润、直径 2 mm~3 mm。灰黑色至黑色,有光泽,常有浅色(非白色)的边缘,周围绕以不透明圈(沉淀),其外常有一清晰带。当用接种针触及菌落时具有黄油样粘稠感。有时可见到不分解脂肪的菌株,除没有不透明圈和清晰带外,其他外观基本相同。从长期贮存的冷冻或脱水食品中分离的菌落,其黑色常较典型菌落浅些,且外观可能较粗糙,质地较干燥。

www.kinghunt.cn
凯恒生物

附 录 C
(资料性附录)
耐热核酸酶试验

- C.1 取 3 mL 甲苯胺蓝-DNA 琼脂平铺于载玻片上制成标本片。
- C.2 待琼脂凝固后,在琼脂上打成直径 2 mm 的小洞(每个载玻片 10 个~12 个),抽出小洞中的琼脂块。
- C.3 加入约 0.01 mL 加过热(在水浴中煮沸 15 min)的供凝固酶试验的肉汤培养物至所制备载玻片上的小洞中。
- C.4 将载玻片置湿室中,于 35 °C 培养 4 h。
- C.5 阳性反应为在小洞周围形成至少扩展约 1 mm 的浅粉红色的晕圈。

www.kinghunt.cn
凯恒生物

附录 D

(规范性附录)

金黄色葡萄球菌的最可能数(MPN)检索表

表 D.1 每克(毫升)样品中最可能数(MPN)表¹⁾

阳性管数组组合			MPN/g 或 MPN/mL	95%置信限	
0, 10	0, 01	0, 001		下限值	上限值
0	0	0	<3.0	—	9.5
0	0	1	3.0	0.15	9.6
0	1	0	3.0	0.15	11
0	1	1	6.1	1.2	18
0	2	0	6.2	1.2	18
0	3	0	9.4	3.6	38
1	0	0	3.6	0.17	18
1	0	1	7.2	1.3	18
1	0	2	11	3.6	38
1	1	0	7.4	1.3	20
1	1	1	11	3.6	38
1	2	0	11	3.6	42
1	2	1	15	4.5	42
1	3	0	16	1.4	38
2	0	0	9.2	1.4	38
2	0	1	14	3.6	42
2	0	2	20	4.5	42
2	1	0	15	3.7	42
2	1	1	20	4.5	42
2	1	2	27	8.7	94
2	2	0	21	4.5	42
2	2	1	28	8.7	94
2	2	2	35	8.7	94
2	3	0	29	8.7	94
2	3	1	36	8.7	94
3	0	0	23	4.6	94
3	0	1	38	8.7	110

表 D.1 每克(毫升)样品中最可能数(MPN)表¹⁾(续)

阳性管数组组合			MPN/g 或 MPN/mL	95%置信限	
0.10	0.01	0.001		下限值	上限值
3	0	2	64	17	180
3	1	0	43	9	180
3	1	1	75	17	200
3	1	2	120	37	420
3	1	3	160	40	420
3	2	0	93	18	420
3	2	1	150	37	420
3	2	2	210	40	430
3	2	3	290	90	1 000
3	3	0	240	42	1 000
3	3	1	460	180	2 000
3	3	2	1 100	20	4 100
3	3	3	>1 100	420	—

1) 表内所列接种量如改用 1.0 g(mL)、0.1 g(mL)、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)、0.000 1 g(mL)时,则表内数字应相应增加 10 倍,其余类推。

www.kinghunt.cn
凯恒生物

中华人民共和国出入境检验检疫
行业标准
进出口食品中金黄色葡萄球菌检验方法
SN/T 0172—2010

*

中国标准出版社出版
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码:100045

网址 www.spc.net.cn

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 1 字数 16 千字
2010年10月第一版 2010年10月第一次印刷
印数 1—1 600

*

书号: 155066·2-21132 定价 18.00 元



SN/T 0172-2010