|  |  |
| --- | --- |
| ICS  | 点击此处添加ICS号 |
| CCS  | C51 |

中华人民共和国国家标准

GB/T 18204.4—2022

代替 GB/T18204.4-2013



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

(点击此处添加与国际标准一致性程度的标识)

（本草案完成时间：2021.12.31）

XXXX - XX - XX发布

XXXX - XX - XX实施

`

目次

[前言 II](#_Toc92284856)

[1 范围 1](#_Toc92284857)

[2 规范性引用文件 1](#_Toc92284858)

[3 术语和定义 1](#_Toc92284859)

[4 菌落总数平皿计数法 2](#_Toc92284860)

[5 大肠菌群发酵法 4](#_Toc92284861)

[6 金黄色葡萄球菌平皿鉴定法 7](#_Toc92284862)

[7 真菌总数平皿计数法 10](#_Toc92284863)

[8 β-溶血性链球菌培养法 13](#_Toc92284864)

[附录A（规范性） 质量控制和生物安全 17](#_Toc92284865)

附录B（规范性） 公共场所公共用品用具微生物采样方法 18

1. 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。

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。

本文件为GB/T18204的第4部分。

本文件替代GB/T 18204.4—2013 《公共场所卫生检验方法 第4部分：公共用品用具微生物》。

本文件与GB/18204.4—2013相比，主要技术变化如下：

——增加了“规范性引用文件”；

——修改了部分培养基和试剂；

——修改了部分材料和仪器设备；

——完善了样品稀释和培养的描述；

——修改了计算规则和结果报告的描述；

——完善了金黄色葡萄球菌的鉴定步骤，增加了血浆凝固酶试验；

——完善了β-溶血性链球菌的鉴定步骤，增加了触酶试验、链激酶试验及其他检验方法；

——增加了质量控制和生物安全的措施。

——修改了附录B的表述

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。

本文件由中华人民共和国国家卫生健康委员会提出。

本文件由中华人民共和国国家卫生健康委员会归口。

本文件起草单位：江苏省疾病预防控制中心、常州市疾病预防控制中心、南京市疾病预防控制中心、苏州市疾病预防控制中心、中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所

本文件主要起草人：丁震、周连、马恺、马小莹、徐斌、王凤鸣、沈强、雍玮、周志荣、张付刚、赵莹、范华锋

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菌落总数、真菌总数、大肠菌群、金黄色葡萄球菌和β-溶血性链球菌的采样与检验方法。

本部分适用于公共场所内公共用品用具中菌落总数、真菌总数、大肠菌群、金黄色葡萄球菌和β-溶血性链球菌的检验，其他场所可参照执行。

* 1. 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 4789.28 食品安全国家标准 食品微生物学检验 培养基和试剂的质量要求

GB 19489 实验室生物安全通用要求

* 1. 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

* + 1. 菌落总数 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36℃±1℃、48h培养所生长发育的嗜中温性需氧和兼性厌氧菌落的总数。

* + 1. 大肠菌群 coliforms

一群在37℃、24h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。

* + 1. 金黄色葡萄球菌 staphylococcus aureus

在 Baird-Parker 平板或血平板上生长良好，分解甘露醇产酸，血浆凝固酶试验阳性的革兰氏阳性葡萄状球菌。

* + 1. 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。

* + 1. β-溶血性链球菌 β-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，在血平板上其菌落周围形成一个2～4 mm宽的透明溶血环。
	1. 菌落总数平皿计数法
		1. 培养基与试剂

无菌生理盐水

成分：

氯化钠 8.5 g

蒸馏水 1000 mL

制法：

称取8.5 g氯化钠溶于1000 mL蒸馏水中，分装到试管内，每管10 mL，121℃高压灭菌15 min。

4.1.2 平板计数琼脂培养基

4.1.2.1 成分：

胰蛋白胨 5 g

酵母浸膏 2.5 g

葡萄糖 1.0 g

琼脂 15.0 g

蒸馏水 1000 mL

4.1.2.2制法：

将上述成分加于蒸馏水中，煮沸溶解，调节pH至7.0±0.2。分装试管或锥形瓶，121℃高压灭菌15 min。

* + 1. 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　恒温培养箱：36℃±1℃。

4.2.4　恒温水浴箱：46℃±1℃

4.2.5　冰箱：2℃-5℃。

4.2.6　电炉或微波炉。

4.2.7　天平：感量0.1 g。

4.2.8　涡旋混合器。

4.2.9　无菌试管：18 mm×150 mm。

4.2.10　无菌平皿：直径90 mm。

4.2.11　无菌刻度吸管：1 mL（0.01 mL刻度）。

4.2.12　微量移液器：1000 μL。

4.2.13　灭菌棉拭子。

4.2.14　灭菌剪刀。

4.2.15　pH计或精密pH试纸。

4.2.16　放大镜或（和）菌落计数器。

* + 1. 检验步骤

采样方法见附录B。

样品的稀释：将放有采样后棉拭子的生理盐水试管在涡旋混合器上充分振摇，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。

样品的接种：根据对样品污染状况的估计，选择1个～2个适宜稀释度的样品匀液，在进行10倍递增稀释时，每个稀释度分别吸取1 mL样品匀液于2个无菌平皿内。同时分别取1 mL生理盐水稀释液加入两个无菌平血作空白对照。

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48h±2h。

* + 1. 菌落计数

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）。

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。

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。

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。

* + 1. 不同稀释度菌落计数计算规则

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，再将平均菌落数乘以相应稀释倍数，作为样本中菌落总数。

若有两个连续稀释度的平板菌落数在适宜计数范围内时，则样本中菌落总数按式（1）计算，示例见表1。

 $N=\frac{ΣC}{(n\_{1}+0.1n\_{2})d}$ …………………..(1)

式中：

N ——样本中菌落总数，单位为CFU；

ΣC ——平板（含适宜范围菌落数的平板）菌落数之和，单位为CFU；

n1 ——适宜范围菌落数的第一稀释度（低）平板个数；

n2 ——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）。

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 |

$N=\frac{232+244+33+35}{\left[2+0.1x2\right]x10^{-2}}$=$\frac{544}{2.2x10^{-2}}$=24727

上述数据经“四舍五入”后，表示为25000或2.5×104。

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。

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。

若所有稀释度平板均无菌落生长，以小于1乘以最低稀释倍数计算。

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。

* + 1. 结果报告
			1. 公共用品用具菌落总数的测定结果按式（2）得出。

A=$\frac{T×b}{k}$ .............................(2)

式中:

A ——一定面积的菌落总数测定结果（杯具以CFU/cm2为单位报告，其它公共用品用具以CFU/25cm2为单位报告。结果非整数时，四舍五入保留整数）；

T ——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（杯具的系数k为实际采样面积，其它公共用品用具的系数k为1）。

（若有两个连续稀释度的平板菌落数在适宜计数范围内，则4.5.2中的N值为公式2中的T×b值）

* + - 1. 如果一件用品采两份样品，若两份样品检测结果不一致，采用检测值高的结果报告。
	1. 大肠菌群发酵法
		1. 培养基和试剂

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 1000 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115 ℃高压灭菌20 min。

1. 双料乳糖胆盐发酵管除蒸馏水外，其他成分加倍。

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 1000 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115 ℃高压灭菌20 min，临用时加入乳糖并加热熔化琼酯，冷至50℃～55 ℃，加入伊红和美蓝溶液，摇匀，倾注平皿。

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 1000 mL

制法

将蛋白胨及乳糖溶于蒸馏水中，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115 ℃高压灭菌20 min。

革兰氏染色液。

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（质量分数=1%） 80 mL

制法

将结晶紫完全溶解于乙醇中,然后与草酸铵溶液混合。

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。

脱色剂

乙醇（95%，体积分数）。

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。

* + 1. 仪器和设备

5.2.1　高压蒸汽灭菌器。

5.2.2　干热灭菌箱。

5.2.3　恒温培养箱：36℃±1℃。

5.2.4　冰箱：2℃-5℃。

5.2.5　电炉或微波炉。

5.2.6　天平：感量0.1g。

5.2.7 涡旋混合器。

5.2.8　无菌接种环：直径3 mm。

5.2.9　无菌试管: 18 mm×150 mm。

5.2.10　无菌平皿：直径90 mm。

5.2.11　无菌刻度吸管：10 mL（0.1 mL刻度）。

5.2.12　灭菌棉拭子。

5.2.13　灭菌剪刀。

5.2.14　pH计或精密pH试纸。

5.2.15　显微镜。

* + 1. 检验步骤

采样方法见附录B．

乳糖胆盐发酵试验：将检样（多于1 mL）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。若有产气产酸者，则按下列步骤进行。

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，典型菌落形态为深紫黑色、具有金属光泽；紫黑色、不带或略带金属光泽；淡紫红色、中心较深。

在上述平板上，挑取典型菌落1个～2个做革兰氏染色。

（1）将培养18 h～24 h的培养物涂片．

（2）将涂片在火焰上固定，滴加结晶紫染色液，染1 min，水洗。

（3）滴加革兰氏碘液，作用1 min，水洗。

（4）滴加乙醇脱剂，摇动玻片，直至无紫色脱落为止，约30 s，水洗。

（5）滴加复染液，复染1 min，水洗，待干，镜检。

挑取典型菌落接种乳糖发酵管，置36℃±1℃培养24 h±2 h。

* + 1. 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。如果一件用品采两份样品，若两份样品检测结果不一致，采用阳性检测结果报告。

* 1. 金黄色葡萄球菌平皿鉴定法
		1. 培养基和试剂
			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 1000 mL

制法

将上述成分混合后，加热溶解，调节pH至7.3±0.2，分装，每支9 mL，121 ℃高压灭菌15 min。

* + - 1. 7.5% 氯化钠肉汤

成分

蛋白胨 10 g

牛肉膏 3 g

氯化钠 75 g

蒸馏水 1000 mL

制法

将上述成分加热溶解，调节pH至7.4±0.2，分装，每支9 mL，121 ℃高压灭菌15 min。

* + - 1. Baird-Parker平板

成分

胰蛋白胨 10 g

牛肉膏 5 g

酵母浸液 1 g

丙酮酸钠 10 g

甘氨酸 12 g

氯化锂（LiCl·6H2O） 5 g

琼脂 20 g

蒸馏水 950 mL

增菌剂的配制

30%卵黄盐水50 mL与过滤除菌后的1%亚碲酸钾溶液10 mL混合，保存于4 ℃冰箱内。

制法

将6.1.3.1中各成分混合，加热煮沸至完全溶解，冷却至25 ℃，调节pH至7.0±0.2。分装，每瓶95 mL，121 ℃高压灭菌15 min。临用时加热熔化琼脂，冷却至50 ℃，每95 mL加入预热至50 ℃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4℃冰箱储存，不得超过48 h。

* + - 1. 血琼脂平板

成分

营养琼脂 100 mL

脱纤维羊血（或兔血） 10 mL

制法

将营养琼脂加热熔化，待冷却至50 ℃左右以无菌操作加入灭菌脱纤维羊血（或兔血），摇匀，倾注平板，置于4 ℃冰箱备用。

* + - 1. 脑心浸出液肉汤

成分

胰蛋白胨 10 g

氯化钠 5 g

磷酸氢二钠（12H2O） 2.5 g

葡萄糖 2 g

牛心浸出液 500 mL

制法

加热溶解，调节pH至7.4±0.2，分装，每支5 mL，121℃高压灭菌15 min。

* + - 1. 营养琼脂小斜面

成分

蛋白胨 10 g

牛肉膏 3 g

氯化钠 5 g

琼脂 15~20 g

蒸馏水 1000 mL

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7.3±0.2。然后加入琼脂，加热煮沸，使琼脂熔化，分装至13 mm×130 mm试管，121 ℃高压灭菌15 min。

* + - 1. 兔血浆

成分

柠檬酸钠 3.8 g

蒸馏水 100 mL

兔全血 4 份

制法

将柠檬酸钠溶于蒸馏水后过滤，装瓶，121℃高压灭菌15 min。取灭菌后3.8%柠檬酸钠溶液1份，加兔全血4份，混匀静置（或以3000 rpm/min离心30 min），使血细胞下沉，取上面血浆。

* + - 1. 革兰氏染色液

见5.1.4。

* + 1. 仪器和设备

6.2.1　高压蒸汽灭菌器。

6.2.2　恒温培养箱：36 ℃±1 ℃。

6.2.3　恒温水浴箱：36 ℃±1 ℃。

6.2.4 电炉或微波炉

6.2.5　天平：感量0.1 g。

6.2.6　无菌接种环：直径3 mm。

6.2.7　无菌试管：18 mm×150 mm，13 mm×130 mm。

6.2.8　无菌平皿：直径 90 mm。

6.2.9 无菌刻度吸管：1 mL（0.01 mL刻度）、10 mL（0.1 mL刻度）。

6.2.10 微量移液器：1000 μL。

6.2.11 pH计或精密pH试纸。

6.2.12 显微镜

6.2.13 载玻片。

6.2.14 酒精灯。

6.2.15 生物安全柜。

6.2.16 离心机。

* + 1. 操作步骤
			1. 采样方法见附录B。
			2. 增菌：取1 mL样品接种到9 mL 7.5%氯化钠肉汤或胰酪胨大豆肉汤中，于36℃±1℃培养18 h~24 h。金黄色葡萄球菌在上述培养基中呈混浊生长。
			3. 分离：自上述增菌培养基中，取1~2接种环培养物，划线接种至Baird-Parker平板或血平板，于36 ℃±1 ℃培养18 h~24 h，观察记录菌落特征，Baird-Parker平板必要时可将培养时间延长至45 h~48 h。在Baird-Parker平板上金黄色葡萄球菌菌落呈圆形、光滑、凸起、湿润，菌落直径为2 mm~3 mm，颜色呈灰黑色至黑色，边缘整齐、常为淡色，周围为一混浊带，在其外层有一透明带。偶有不分解脂肪的菌株，除没有混浊带和透明带之外，其他外观基本相同。在血平板上菌落较大，呈圆形、光滑、凸起、湿润，颜色呈金黄色（有时为白色），菌落周围见完全透明的溶血环。
			4. 革兰氏染色镜检：挑取典型菌落，涂片，进行革兰氏染色，镜检。金黄色葡萄球菌为革兰氏阳性球菌，排列呈葡萄状，无芽胞，无荚膜。
			5. 血浆凝固酶试验：挑取Baird-Parker平板或血平板上至少5个可疑菌落（小于5个全选），分别接种到5 mL脑心浸出液肉汤和营养琼脂小斜面，36℃±1℃培养18 h~24 h。取新鲜配制的兔血浆0.5 mL，放入小试管中，再加入脑心浸出液肉汤培养物0.2 mL~0.3 mL，振荡摇匀，置于36℃±1℃培养箱或水浴箱内，每30 min观察一次，在6 h内观察结果。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，则判定为阳性结果。同时用已知血浆凝固酶试验阳性和阴性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。如结果可疑，挑取营养琼脂小斜面的菌落接种到5 mL脑心浸出液肉汤，于36℃±1℃培养18 h~48 h，重复试验。
		2. 结果报告

综合以上试验结果，报告样品中检出或未检出金黄色葡萄球菌。如果一件用品采两份样品，若两份样品检测结果不一致，采用阳性检测结果报告。

* 1. 真菌总数平皿计数法
		1. 培养基与试剂
			1. 无菌生理盐水

见4.1.1。

* + - 1. 孟加拉红培养基

成分

蛋白胨 5 g

葡萄糖 10 g

磷酸二氢钾 1 g

硫酸镁( MgSO4·7H2O） 0.5 g

琼脂 20 g

氯霉素 0.1 g

蒸馏水 1000 mL

孟加拉红水溶液(质量浓度=1:3000) 100 mL

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，再加人孟加拉红溶液，分装后121℃高压灭菌20 min，待冷至55℃左右加入氯霉素。

* + - 1. 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 1000 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。

* + 1. 仪器和设备

7.2.1　高压蒸汽灭菌器。

7.2.2　恒温培养箱：25℃~28℃。

7.2.3　冰箱：2℃-5℃。

7.2.4　电炉或微波炉。

7.2.5　天平：感量0.1 g。

7.2.6　涡旋混合器。

7.2.7　无菌试管：18 mm×150 mm。

7.2.8　无菌平皿：直径90mm。

7.2.9　无菌刻度吸管：1 mL（0.01 mL刻度）。

7.2.10　pH计或精密pH试纸。

7.2.11　放大镜或（和）菌落计数器。

* + 1. 检验步骤

采样方法见附录 B。

样品的稀释：参照4.3.2。

样品的接种：根据对样品污染状况的评估，选择3个适宜稀释度的样品匀液。在进行10倍递增稀释的同时，每个稀释度分别吸取1 mL 样品匀液于2个无菌平皿内。同时分别取1 mL无菌稀释液加人2个无菌平皿作空白对照。

样品的培养：将溶化并冷却至45℃左右的孟加拉红培养基或沙氏琼脂培养基倾注平皿约20 mL⁓25 mL，并转动平皿使其混合均匀，待琼脂凝固后，正置平皿于25℃～28℃培养箱中，培养5天，3天后开始观察，若真菌数量过多可于第3天计数结果，并记录培养时间，否则于第5天记录结果。

* + 1. 菌落计数
			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）。

通常选择菌落数在5 CFU～50 CFU之间的平皿进行计数。真菌蔓延生长覆盖整个平皿的可记录为菌落蔓延。

* + 1. 不同稀释度菌落计数计算规则
			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，再将平均菌落数乘以相应稀释倍数，作为样本中真菌总数。
			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，应参照4.5.2的相关规定进行计算。
			3. 若所有稀释度的平板上菌落数均大于50 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。
			4. 若所有稀释度的平板菌落数均小于5 CFU，应按稀释度最低的平均菌落数乘以稀释倍数计算。
			5. 若所有稀释度平板均无菌落生长，以小于1乘以最低稀释倍数计算。
			6. 若所有稀释度的平板菌落数均不在5 CFU～50CFU之间，其中一部分大于50CFU或小于5 CFU时，则以最接近5 CFU或50 CFU的平均菌落数乘以稀释倍数计算。
		2. 结果报告
			1. 公共用品用具真菌总数的测定结果按式（3）得出。

A=$\frac{T×b}{k}$ .............................(3)

式中:

A ——一定面积的真菌总数测定结果（以CFU/50cm2为单位报告。结果非整数时，四舍五入保留整数）；

T ——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（如采样面积50cm2，则k=1；如采样面积25cm2，则k=1/2）。

（若有两个连续稀释度的平板菌落数在适宜计数范围内，则4.5.2中的N值为公式3中的T×b值）

* + - 1. 如果一件用品采两份样品，若两份样品检测结果不一致，采用检测值高的结果报告。
	1. *β*-溶血性链球菌培养法
		1. 培养基和试剂

8.1.1胰蛋白胨大豆肉汤（Tryptone soybean broth, TSB）

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

制法：将上述各成分溶于蒸馏水中，加热溶解，校正pH至7.3±0.2，121℃灭菌15 min，分装备用。

8.1.2改良胰蛋白胨大豆肉汤（Modified tryptone soybean broth, mTSB）

8.1.2.1基础培养基（胰蛋白胨大豆肉汤 TSB）见8.1.1

8.1.2.2抗生素溶液

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。

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。

8.1.2.3完全培养基

成分：

胰蛋白胨大豆肉汤（TSB） 1000.0 mL

多黏菌素溶液 10.0 mL

萘啶酮酸钠溶液 10.0 mL

制法：无菌条件下，将上述各成分进行混合，充分混匀，分装备用。

8.1.3哥伦比亚CNA血琼脂（Columbia CNA blood agar）

8.1.3.1基础培养基

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

制法：将上述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。

8.1.3.2无菌脱纤维绵羊血

无菌操作下条件下，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。

8.1.3.3完全培养基

成分：

基础培养基 1 000.0 mL

无菌脱纤维绵羊血 50 mL

制法：当基础培养基冷却至50℃左右时，无菌操作加入50 mL脱纤维绵羊血，摇匀后倾注平板。

8.1.4血琼脂平板：见6.1.4。

8.1.5革兰氏染色液：见5.1.4。

8.1.6草酸钾血浆

成分：

草酸钾 0.01 g

人血 5.0 mL

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。

8.1.7 0.25％氯化钙（CaCl2）溶液

成分：

氯化钙（无水） 22.2 g

蒸馏水 1000.0 mL

制法：称取22.2g氯化钙（无水）溶于蒸馏水中，分装备用。

8.1.8 3％过氧化氢（H2O2）溶液

成分：

30％过氧化氢（H2O2）溶液 100.0 mL

蒸馏水 900.0 mL

制法：吸取100mL 30％过氧化氢(H2O2)溶液，溶于蒸馏水中，混匀，分装备用。

8.1.9生化鉴定试剂盒或生化鉴定卡。

* + 1. 设备和材料

8.2.1　高压蒸汽灭菌器。

8.2.2 恒温培养箱：36℃±1℃。

8.2.3　恒温水浴箱：36℃±1℃。

8.2.4 厌氧培养装置。

8.2.5　冰箱：2℃～5℃。

8.2.6　电炉或微波炉。

8.2.7 天平：感量0.1 g

8.2.8　无菌试管：18 mm×150 mm。

8.2.9　无菌平皿：直径90 mm。

8.2.10 无菌刻度吸管：1 mL（0.01 mL刻度）、10 mL（0.1 mL刻度）。

8.2.11 微量移液器：1000 μL。

8.2.12 无菌锥形瓶：容量200 mL、500 mL、1000 mL、2000 mL。

8.2.13 pH计或精密pH试纸。

8.2.14 显微镜

8.2.16 载玻片。

8.2.16 离心机

8.2.17　微生物生化鉴定系统。

* + 1. 操作步骤

采样方法见附录B。

样品增菌及分离培养，取1 mL液体检样，加入9 mL改良胰蛋白胨大豆肉汤，36℃±1℃培养18 h～24 h。接种于哥伦比亚CNA血琼脂平板，36℃±1℃厌氧培养18 h～24 h，观察菌落形态。*β*-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～4mm，灰白色、半透明、光滑、表面突起、圆形、边缘整齐，在菌落周围形成完全透明的溶血环，红细胞完全溶解。

鉴定

分纯培养：挑取哥伦比亚CNA血琼脂平板上5个（如小于5个则全选）可疑菌落分别接种血琼脂平板和TSB增菌液，36℃±1℃培养18 h～24 h。

革兰氏染色镜检：挑取血琼脂平板上可疑菌落染色镜检。*β*-溶血性链球菌为革兰氏染色阳性，呈球形或卵圆形，常排列成短链状。

触酶试验：挑取血琼脂平板上可疑菌落于洁净的载玻片上，滴加适量3%过氧化氢溶液，于半分钟内有大量气泡产生者为阳性，不产生气泡者为阴性，*β*-溶血性链球菌触酶为阴性。

链激酶试验：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时内容物不流动）。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*-溶血性链球菌为阳性。

其他检验：使用商品化生化鉴定试剂盒或生化鉴定卡对可疑菌落进行鉴定。

* + 1. 结果报告

综合以上试验结果，报告样品中检出或未检出*β*-溶血性链球菌。如果一件用品采两份样品，若两份样品检测结果不一致，采用阳性检测结果报告。

1.
2. （规范性）
质量控制和生物安全
	1. 培养基和试剂需符合《GB 4789.28食品安全国家标准 食品微生物学检验 培养基和试剂的质量要求》，购买国内生产的成品培养基需有中国食品药品监督管理局批准的生产文号，对于购买的成品培养基，应在培养基有效期内使用，严格按照培养基要求的贮存条件进行保存。
	2. 确保所用试剂和材料为无菌状态，操作过程中避免人为污染。
	3. 实验用水的电导率在25℃时不应超过25 μS/cm(相当于电阻率≥0.4ΜΩcm)，除非另有规定要求。水的微生物污染不应超过103 CFU/mL。
	4. 实验室生物安全应符合《GB 9489 实验室生物安全通用要求》，实验操作人员应有二级生物安全防护实验室工作的实践经验，实验人员在处理或检测可疑致病菌时应采取适当的预防措施，减少职业暴露，并保证符合国家有关法规规定的要求。
3. （规范性）
公共场所公共用品用具微生物采样方法
	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。

* 1. 一般要求

随机抽取清洗消毒后准备使用的公共用品用具。

采样过程中应无菌操作。

采样步骤：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，将采集样品后的棉拭子放人剩余的9 mL生理盐水内，用灭菌剪刀剪去棉签手接触的部分，4 h内送检。

* 1. 采集部位与采样面积
		1. 杯具

在茶具内、外缘与口唇接触处，即1 cm～2 cm 高处采样一圈。计算并记录采样面积。

棉织品

* + - 1. 将毛巾、枕巾、浴巾先对折后展开，在展开平面上，取对折线两侧中央对称位置5cm×5cm（25cm2）面积范围内分别均匀涂抹5次，每25cm2采样面积为1份样品，每件用品共采集2份样品。
			2. 在床单、被单表面与颈部、脚部接触部位5cm×5cm（25cm2）面积范围内分别均匀涂抹5次，每25cm2采样面积为1份样品，每件用品共采集2份样品。
			3. 睡衣、睡裤随机选择2个与皮肤接触部位5cm×5cm（25cm2）面积范围内分别均匀涂抹5次，每25cm2采样面积为1份样品，每件用品共采集2份样品。
		1. 洁具

浴盆：在浴盆二分之一高度内侧壁与盆底中央位置5cm×5cm（25cm2）范围内分别均匀涂抹5次，每25cm2采样面积为1份样品，每件用品共采集2份样品。

脸（脚）盆：在盆内壁二分之一高度，相对称的两侧壁处5cm×5cm（25cm2）范围内分别均匀涂抹5次，每25cm2采样面积为1份样品，每件用品共采集2份样品。

坐便器：在坐便圈前端弯曲处相对称的两处5cm×5cm（25cm2）范围内分别均匀涂抹5次，每25cm2采样面积为1份样品，每件用品共采集2份样品。

按摩床（椅）：在床（椅）表面中部选择2个与人体接触部位5cm×5cm（25cm2）范围内分别均匀涂抹5次 ，每25cm2采样面积为1份样品，每件用品共采集2份样品。

* + 1. 鞋类

在每只鞋的鞋内与脚趾接触处5cm×5cm（25cm2）面积范围内分别均匀涂抹5次，每25 cm2采样面积为1份样品，每件用品共采集2份样品。

* + 1. 购物车（筐）

车（筐）把手：在把手三分之一与三分之二手易接触处5cm×5cm（25cm2）面积范围内分别均匀涂抹5次 ，每25cm2采样面积为1份样品，每件用品共采集2份样品。

* + 1. 美容美发美甲用品

理发推子：应在推子的前部（与皮肤接触处）均匀涂抹5次，采样面积达到25cm2为1份样品，（一把理发推子采样面积未达到25cm2的可加采其他理发推子）。每类用品共采集2份样品。

理发刀、剪：应在刀、剪两个面各均匀涂抹5次，采样面积达到25cm2为1份样品。（一把理发刀、剪的采样面积未达到25cm2的可加采其他理发刀、剪）。每类用品共采集2份样品。

美容美甲用品：应在美容美甲用品表面（与皮肤接触处）均匀涂抹5次，采样面积达到25cm2 为1份样品。（一套美容美甲用品的采样面积未达到25cm2的可加采其他美容美甲用品）。每类用品共采集2份样品。

* + 1. 修脚工具

修脚工具：应在修脚工具表面（与皮肤接触处）均匀涂抹5次，采样面积达到25cm2 为1份样品。（一套修脚工具的采样面积未达到25cm2的可加采其他修脚工具）。每类用品共采集2份样品。

* + 1. 其他用品

在用品表面选择2个与人体接触处5cm×5cm（25cm2）面积范围内分别采样，25cm2采样面积为1份样品，每件用品共采集2份样品。

* + 1. 结果判定

 每件（或每类）用品共采集2份样品。在定量实验中，如两份样品检测值不一致，以检测值高的为判定结果。在定性实验中，如两份样本检测结果均为阴性，则判定检测结果为阴性；如两份样本检测结果均为阳性，则判定检测结果为阳性；如两份样本检测结果为一份阴性一份阳性，则判定检测结果为阳性。

 注：鞋类与修脚工具中真菌总数的结果判定，以两份样品合计50 cm2面积范围的总真菌数判定。



联系人：马小莹

联系电话：18362957311

联系邮箱：623260771@qq.com