



中华人民共和国国家标准

GB/T 18204.4—2025

代替 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指标

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

2025-05-30 发布

2025-12-01 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

目 次

前言 III

引言 IV

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 细菌总数 2

5 大肠菌群 4

6 金黄色葡萄球菌 7

7 真菌总数..... 10

8 β -溶血性链球菌 12

附录 A（规范性） 公共场所公共用品用具微生物采样方法 15

附录 B（规范性） 质量控制和生物安全 17

参考文献 18

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。

本文件是 GB/T 18204《公共场所卫生检验方法》的第4部分。GB/T 18204 已经发布了以下部分：

- 第1部分：物理性指标；
- 第2部分：化学性指标；
- 第3部分：空气微生物指标；
- 第4部分：公共用品用具微生物指标；
- 第5部分：集中空调通风系统；
- 第6部分：卫生监测技术规范。

本文件代替 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》，与 GB/T 18204.4—2013 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- a) 更改了术语和定义(见第3章,2013年版的第2章)；
- b) 更改了部分仪器和耗材(见4.2、5.2、6.2、7.2和8.2,2013年版的3.2、4.2、5.2、6.2和7.2)；
- c) 更改了部分培养基和试剂(见6.3和8.3,2013年版的5.1和7.1)；
- d) 更改了检验步骤(见4.4、5.4、6.4、7.4和8.4,2013年版的3.3、4.3、5.3、6.3和7.3)；
- e) 增加了 β -溶血性链球菌的触酶试验等生化鉴定方法(见8.4,2013年版的7.3)；
- f) 更改了计算规则和结果报告(见4.6、4.7、5.5、6.5、7.6、7.7和8.5,2013年版的3.5、3.6、4.4、5.4、6.4、6.5和7.4)；
- g) 更改了公共场所公共用品用具微生物采样方法(见附录A,2013年版的附录A)；
- h) 增加了质量控制和生物安全(见附录B)。

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。

本文件由国家疾病预防控制局提出并归口。

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、东南大学、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、马恺、马小莹、王凤鸣、雍玮、沈强、钱华、周志荣、张付刚、周连、赵莹。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

- 1998年首次发布 GB/T 17220—1998《公共场所卫生监测技术规范》，2000年首次发布 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》、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 大肠菌群测定》；
- 2013年第一次修订为 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；
- 本次为第二次修订。

引 言

GB/T 18204《公共场所卫生检验方法》是国家推荐性标准,与 GB 37488《公共场所卫生指标及限值要求》相配套使用,是开展公共场所卫生监测推荐遵循的标准检验方法。GB/T 18204(所有部分)的发布有利于规范公共场所相关的样品采集、现场和实验室检测,提升检测机构检测结果的精密度、准确度和可比性,为保障公共场所卫生安全和人群健康提供重要支撑。本文件是 GB/T 18204 的第 4 部分,本次修订对 GB 37488 中涉及公共用品用具微生物指标的检验方法进行了完善,补充了各项指标结果计算、质量控制要求,增加了 β -溶血性链球菌的生化鉴定步骤,以进一步提高标准的先进性、可操作性和适用性,满足公共场所卫生检验需求。

GB/T 18204 由 6 个部分构成。

- 第 1 部分:物理性指标。目的在于提供公共场所中的物理性指标的现场检测的基本原则和要求。
- 第 2 部分:化学性指标。目的在于提供公共场所中的化学性指标的样品采集和实验室检测的基本原则和要求。
- 第 3 部分:空气微生物指标。目的在于提供公共场所中空气微生物指标的样品采集和实验室检测的基本原则和要求。
- 第 4 部分:公共用品用具微生物指标。目的在于提供公共场所中公共用品用具微生物指标的样品采集和实验室检测的基本原则和要求。
- 第 5 部分:集中空调通风系统。目的在于提供公共场所中集中空调通风系统指标的样品采集和实验室检测的基本原则和要求。
- 第 6 部分:卫生监测技术规范。目的在于规范公共场所卫生监测的频次与样本量、质量控制等技术要求。

公共场所卫生检验方法

第4部分：公共用品用具微生物指标

1 范围

本文件描述了公共场所公共用品用具表面细菌总数、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。

本文件适用于公共场所公共用品用具微生物指标的检验，其他场所参照执行。

2 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/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

细菌总数 total bacterial count

在营养琼脂培养基上经 $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h 所生长发育的嗜中温性需氧和兼性厌氧菌落的总数。

3.2

大肠菌群 coliforms

在一定培养条件下能发酵乳糖、产酸产气的需氧和兼性厌氧革兰氏阴性无芽孢杆菌。

3.3

金黄色葡萄球菌 staphylococcus aureus

在 Baird-Parker 平板上生长良好，在血平板上可形成完全透明溶血环，血浆凝固酶试验阳性的革兰氏阳性球菌，常呈葡萄球状排列。

3.4

真菌总数 total fungal count

在沙氏琼脂培养基上经 $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、3 d~5 d 培养所形成的菌落数。

3.5

β -溶血性链球菌 β -hemolytic streptococcus

能产生溶血素，血平板上在菌落周围形成界限分明、完全透明的溶血环（ β -型溶血）的化脓（或 A 群）链球菌和无乳（或 B 群）链球菌。

[来源：GB 4789.11—2014，2.2，有修改]

4 细菌总数

4.1 原理

在公共用品用具的适当部位来回均匀涂抹进行样品采集,样品经过处理后,在营养琼脂培养基上经 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h 得到细菌菌落数的测定方法。

4.2 仪器和耗材

本方法中使用的仪器和耗材如下:

- 高压蒸汽灭菌器;
- 干热灭菌箱;
- 恒温培养箱: $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- 恒温水浴箱: $46\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- 冰箱: $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 5\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- 电炉或微波炉;
- 天平:感量 0.1 g ;
- 涡旋混合器;
- 放大镜或(和)菌落计数器;
- 无菌试管: $18\text{ mm}\times 150\text{ mm}$;
- 无菌平皿:直径 90 mm ;
- 无菌刻度吸管: 1 mL (0.01 mL 刻度);
- 微量移液器: $1\text{ }000\text{ }\mu\text{L}$;
- 灭菌棉拭子;
- 灭菌剪刀;
- pH 计或精密 pH 试纸。

4.3 培养基和试剂

4.3.1 无菌生理盐水

4.3.1.1 成分

氯化钠 8.5 g ,纯水 $1\text{ }000\text{ mL}$ 。纯水水质应符合 GB/T 6682 中三级水或以上的要求。

4.3.1.2 制法

称取 8.5 g 氯化钠溶于 $1\text{ }000\text{ mL}$ 纯水中,分装到试管内,每管 10 mL 或 9 mL , $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min 。

4.3.2 营养琼脂培养基

4.3.2.1 成分

蛋白胨 10.0 g ,牛肉膏 3.0 g ,氯化钠 5.0 g ,琼脂 20.0 g ,纯水 $1\text{ }000\text{ mL}$ 。

4.3.2.2 制法

将上述成分混合后,加热溶解,调节 pH 为 7.4 ± 0.2 ,分装于瓶装容器内, $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min ,储存于冷暗处备用。

4.4 检验步骤

样品检验步骤按照以下操作进行。

- a) 采样方法应符合附录 A 的要求。
- b) 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 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 mL 无菌吸管或吸头。
- c) 接种:根据样品污染状况,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皿作空白对照。
- d) 培养:及时将 15 mL~20 mL 冷却至 45℃~50℃的营养琼脂培养基(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,将平皿翻转,36℃±1℃培养 48 h±2 h。

4.5 菌落计数

4.5.1 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)。

4.5.2 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。

4.5.3 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。

4.5.4 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。

4.6 不同稀释度菌落计数计算规则

4.6.1 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,作为样本中菌落总数。

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

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

式中:

N ——样本中菌落总数,单位为菌落形成单位(CFU);

$\sum C$ ——平板(含适宜范围菌落数的平板)菌落数之和,单位为菌落形成单位(CFU);

n_1 ——适宜范围菌落数的第一稀释度(低)平板个数;

n_2 ——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 : 1 000(第二稀释度)
菌落数	232,244	33,35

$$N = \frac{232 + 244 + 33 + 35}{(2 + 0.1 \times 2) \times 10^{-2}} = \frac{544}{2.2 \times 10^{-2}} = 24\ 727$$

上述数据经“四舍五入”后,表示为 25 000 或 2.5×10^4 。

- 4.6.3 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。
- 4.6.4 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。
- 4.6.5 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。
- 4.6.6 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。

4.7 结果报告

4.7.1 公共用品用具细菌总数的测定结果按公式(2)得出。

$$A = \frac{T \times b}{k} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

- A ——一定面积的细菌总数测定结果(杯具以 CFU/cm² 为单位报告,其他公共用品用具以 CFU/25 cm² 为单位报告);
- T ——平板平均菌落数,单位为菌落形成单位(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 50,其他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,则公式(2)中的 T×b 值为 4.6.2 中的 N 值。

- 4.7.2 菌落数小于 100 CFU 时,按“四舍五入”原则修约,以整数报告。
- 4.7.3 菌落数大于或等于 100 CFU 时,第 3 位数字采用“四舍五入”原则修约后,取前 2 位数字,后面用 0 代替位数;也可用 10 的指数形式来表示,按“四舍五入”原则修约后,采用两位有效数字。
- 4.7.4 若所有平板上为蔓延菌落而无法计数,则报告菌落蔓延。
- 4.7.5 若空白对照上有菌落生长,则此次检测结果无效。
- 4.7.6 如果同一件用品采两份样品,当两份样品检测结果不一致,采用检测值高的结果报告。

4.8 质量控制和生物安全

应符合附录 B 的要求。

5 大肠菌群

5.1 原理

在公共用品用具的适当部位来回均匀涂抹进行样品采集,样品经过处理后,在乳糖胆盐发酵培养液

中经 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养检测大肠菌群的测定方法。

5.2 仪器和耗材

本方法中使用的仪器和耗材如下：

- 高压蒸汽灭菌器；
- 干热灭菌箱；
- 恒温培养箱： $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ；
- 冰箱： $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ；
- 电炉或微波炉；
- 天平：感量 0.1 g ；
- 涡旋混合器；
- 显微镜；
- 无菌接种环：直径 3 mm ；
- 无菌试管： $18\text{ mm}\times 150\text{ mm}$ ；
- 无菌平皿：直径 90 mm ；
- 无菌刻度吸管： 10 mL (0.1 mL 刻度)；
- 灭菌棉拭子；
- 灭菌剪刀；
- pH 计或精密 pH 试纸。

5.3 培养基和试剂

5.3.1 乳糖胆盐发酵培养液

5.3.1.1 成分

蛋白胨 20.0 g ，猪胆盐（或牛、羊胆盐） 5.0 g ，乳糖 10.0 g ，溴甲酚紫水溶液（ 10 g/L ） 1 mL ，纯水 $1\text{ }000\text{ mL}$ 。

5.3.1.2 制法

将蛋白胨、胆盐及乳糖溶于纯水中，调节 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 ， $115\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min 。

注：双料乳糖胆盐发酵培养液除纯水外，其他成分加倍。

5.3.2 伊红美蓝琼脂

5.3.2.1 成分

蛋白胨 10.0 g ，乳糖 10.0 g ，磷酸氢二钾 2.0 g ，琼脂 17.0 g ，伊红水溶液（ 20 g/L ） 20 mL ，美蓝水溶液（ 5 g/L ） 13 mL ，纯水 $1\text{ }000\text{ mL}$ 。

5.3.2.2 制法

将蛋白胨、磷酸盐和琼脂溶解于纯水中，调节 pH 至 7.2 ，分装到烧瓶内。经 $115\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min ，临用时加入乳糖并加热溶化琼脂，冷却至 $50\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 55\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，加入伊红和美蓝溶液，摇匀，倾注平皿。

5.3.3 乳糖发酵管

5.3.3.1 成分

蛋白胨 20.0 g, 乳糖 10.0 g, 溴甲酚紫水溶液(10 g/L) 1 mL, 纯水 1 000 mL。

5.3.3.2 制法

将蛋白胨及乳糖溶于纯水中, 调节 pH 至 7.4, 加入指示剂, 分装到带有倒管的试管中, 每管 10 mL, 经 115 °C 高压灭菌 15 min。

5.3.4 革兰氏染色液

5.3.4.1 结晶紫染色液

5.3.4.1.1 成分

结晶紫 1.0 g, 乙醇(95%, 体积分数) 20 mL, 草酸铵水溶液(10 g/L) 80 mL。

5.3.4.1.2 制法

将结晶紫完全溶解于乙醇中, 然后与草酸铵溶液混合。

5.3.4.2 革兰氏碘液

5.3.4.2.1 成分

碘 1.0 g, 碘化钾 2.0 g, 纯水 300 mL。

5.3.4.2.2 制法

将碘与碘化钾先行混合, 加入纯水少许, 充分振摇, 待完全溶解后, 再加纯水。

5.3.4.3 脱色剂

乙醇(95%, 体积分数)。

5.3.4.4 沙黄复染液

5.3.4.4.1 成分

沙黄 0.25 g, 乙醇(95%, 体积分数) 10 mL, 纯水 90 mL。

5.3.4.4.2 制法

将沙黄溶解于乙醇中, 待完全溶解后加入纯水。

5.3.4.5 染色法

染色步骤按照以下操作进行:

- 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;

e) 滴加复染液,复染 1 min,水洗,待干,镜检。

5.4 检验步骤

样品检验步骤按照以下操作进行。

- a) 采样方法应符合附录 A 的要求。
- b) 初发酵试验: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 的样本匀液。用无菌吸管吸取 1:10 的样本匀液(多于 1 mL)注入双料乳糖胆盐发酵培养液中。置 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱内培养 $24\text{ h}\pm 2\text{ h}$,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 c)~e) 进行。
- c) 分离培养:自产酸、产气发酵管中取一接种环培养液,划线转种至伊红美蓝琼脂平板上,倒置于 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 $18\text{ h}\sim 24\text{ h}$,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。
- d) 挑取伊红美蓝琼脂平板上的典型菌落涂片,进行革兰氏染色镜检。
- e) 挑取 c) 中典型菌落接种乳糖发酵管,置 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $24\text{ h}\pm 2\text{ h}$,观察是否产酸、产气。

5.5 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。如果同一件用品用具采两份样品,当两份样品检测结果不一致时,采用阳性检测结果报告。

5.6 质量控制和生物安全

应符合附录 B 的要求。

6 金黄色葡萄球菌

6.1 原理

采用涂抹法采样,7.5%氯化钠肉汤增菌,Baird-Parker 平板或血平板分离培养以及血浆凝固酶试验鉴定的方法测定公共用品用具中的金黄色葡萄球菌。

6.2 仪器和耗材

本方法中使用的仪器和耗材如下:

- 高压蒸汽灭菌器;
- 恒温培养箱: $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- 恒温水浴箱: $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, $50\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- 冰箱: $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 5\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- 电炉或微波炉;
- 天平:感量 0.1 g;
- 酒精灯;
- 生物安全柜;
- 离心机;
- 显微镜;
- 载玻片;
- 无菌接种环:直径 3 mm;
- 无菌试管: $18\text{ mm}\times 150\text{ mm}$, $13\text{ mm}\times 130\text{ mm}$;

- 无菌平皿:直径 90 mm;
- 无菌刻度吸管:1 mL(0.01 mL 刻度)、10 mL(0.1 mL 刻度);
- 微量移液器:1 000 μ L;
- pH 计或精密 pH 试纸。

6.3 培养基和试剂

6.3.1 7.5% 氯化钠肉汤

6.3.1.1 成分

蛋白胨 10.0 g,牛肉膏 3.0 g,氯化钠 75.0 g,纯水 1 000 mL。

6.3.1.2 制法

将 6.3.1.1 中各成分加热溶解,调节 pH 至 7.4 ± 0.2 ,分装,每支 9 mL,121 $^{\circ}$ C 高压灭菌 15 min。

6.3.2 Baird-Parker 琼脂平板

6.3.2.1 成分

胰蛋白胨 10.0 g,牛肉膏 5.0 g,酵母浸膏 1.0 g,丙酮酸钠 10.0 g,甘氨酸 12.0 g,氯化锂($\text{LiCl} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)5.0 g,琼脂 20.0 g,纯水 950 mL。

6.3.2.2 增补剂

30%卵黄盐水 50 mL 与通过 0.22 μm 孔径滤膜进行过滤除菌后的 1%亚碲酸钾溶液 10 mL 混合,保存于 2 $^{\circ}$ C~5 $^{\circ}$ C 冰箱内。

6.3.2.3 制法

将 6.3.2.1 中各成分混合,加热煮沸至完全溶解,调节 pH 至 7.0 ± 0.2 ,分装,每瓶 95 mL,121 $^{\circ}$ C 高压灭菌 15 min。临用时加热溶化琼脂,冷却至 50 $^{\circ}$ C,每 95 mL 加入预热至 50 $^{\circ}$ C 的增补剂 5 mL,摇匀后立即在每个平皿倾注约 15 mL~20 mL。培养基应是致密不透明的。如不及时使用,可在 2 $^{\circ}$ C~5 $^{\circ}$ C 冰箱暂存。

6.3.3 血琼脂平板

6.3.3.1 成分

蛋白胨 10.0 g,氯化钠 5.0 g,琼脂 20.0 g,脱纤维羊血 50 mL~100 mL,纯水 1 000 mL。

6.3.3.2 制法

脱纤维羊血:在无菌操作条件下,将羊血加入盛有灭菌玻璃珠的容器中,振摇 10 min 左右,静置后除去附有血纤维的玻璃珠即可。

将蛋白胨、氯化钠、琼脂加热溶化于纯水中,校正 pH 为 7.5 ± 0.1 ,121 $^{\circ}$ C 15 min 灭菌。待冷却至 45 $^{\circ}$ C 左右,以无菌操作加入无菌脱纤维羊血,摇匀后每皿倾注 15 mL 培养基于平皿中,制成血琼脂平板备用。

6.3.4 脑心浸出液肉汤

6.3.4.1 成分

胰蛋白胨 10.0 g, 氯化钠 5.0 g, 十二水合磷酸氢二钠 2.5 g, 葡萄糖 2.0 g, 牛心浸出液 500 mL。

6.3.4.2 制法

加热溶解, 调节 pH 至 7.4 ± 0.2 , 分装, 每支 5 mL, $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min。

6.3.5 营养琼脂小斜面

6.3.5.1 成分

蛋白胨 10.0 g, 牛肉膏 3.0 g, 氯化钠 5.0 g, 琼脂 20.0 g, 纯水 1 000 mL。

6.3.5.2 制法

将除琼脂以外的各成分溶解于纯水内, 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, 使琼脂溶化, 分装至 13 mm×130 mm 试管, $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min, 摆成斜面备用。

6.3.6 兔血浆

6.3.6.1 成分

柠檬酸钠 3.8 g, 纯水 100 mL, 兔全血。

6.3.6.2 制法

将柠檬酸钠溶于纯水, 分装, $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 3 000 r/min 离心 30 min), 使血细胞下沉, 取上层血浆。

6.3.7 革兰氏染色液

见 5.3.4。

6.4 检验步骤

样品检验步骤按照以下操作进行。

- a) 采样方法应符合附录 A 的要求。
- b) 增菌: 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, 用 1 mL 无菌吸管或微量移液器吸取 1 mL, 接种到 9 mL 7.5% 氯化钠肉汤中, 于 $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h。
- c) 分离: 取 1~2 接种环增菌培养物, 划线接种至 Baird-Parker 平板或血平板, Baird-Parker 平板于 $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h~48 h, 血平板于 $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h, 观察记录菌落特征。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, 直径为 3 mm~5 mm, 呈圆形、光滑、凸起、湿润, 颜色呈金黄色 (有时为白色), 菌落周围通常可见完全透明的溶血环。
- d) 革兰氏染色镜检: 挑取典型菌落, 涂片、革兰氏染色, 显微镜下进行观察。金黄色葡萄球菌为革

兰氏阳性球菌,排列呈葡萄球状,无芽孢。

- e) 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 °C ± 1 °C 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 °C ± 1 °C 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的葡萄球菌标准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 °C ± 1 °C 培养 18 h~24 h,重复试验。金黄色葡萄球菌血浆凝固酶试验为阳性。

6.5 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。如果同一件用品用具采两份样品,当两份样品检测结果不一致时,采用阳性检测结果报告。

6.6 质量控制和生物安全

应符合附录 B 的要求。

7 真菌总数

7.1 原理

在公共用品用具的适当部位来回均匀涂抹进行样品采集,样品经过处理后,在沙氏琼脂培养基上经 28 °C ± 1 °C、3 d~5 d 培养得到真菌菌落数的测定方法。

7.2 仪器和耗材



本方法中使用的仪器和耗材如下:

- 高压蒸汽灭菌器;
- 恒温培养箱:28 °C ± 1 °C;
- 冰箱:2 °C~5 °C;
- 电炉或微波炉;
- 天平:感量 0.1 g;
- 涡旋混合器;
- 放大镜或(和)菌落计数器;
- 无菌试管:18 mm×150 mm;
- 无菌平皿:直径 90 mm;
- 无菌刻度吸管:1 mL(0.01 mL 刻度);
- pH 计或精密 pH 试纸。

7.3 培养基和试剂

7.3.1 无菌生理盐水

见 4.3.1。

7.3.2 沙氏琼脂培养基

7.3.2.1 成分

蛋白胨 10.0 g, 葡萄糖 40.0 g, 琼脂 20.0 g, 纯水 1 000 mL。

7.3.2.2 制法

将蛋白胨、葡萄糖和琼脂溶于纯水中, 加热溶解, 调节 pH 为 5.6 ± 0.2 , 分装于瓶装容器内, 分装后 $115\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min, 储存于冷暗处备用。

7.4 检验步骤

样品检验步骤按照以下操作进行。

- a) 采样方法应符合附录 A 的要求。
- b) 稀释: 参照 4.4 b)。
- c) 接种: 根据对样品污染状况的评估, 选择 2 个~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 无菌稀释液加入 2 个无菌平皿作空白对照。
- d) 培养: 将溶化并冷却至 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右的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, 倒置平皿于 $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 5 d, 逐日观察并于第 5 天记录结果。若真菌数量过多可于第 3 天计数结果, 并记录培养时间。

7.5 菌落计数

7.5.1 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)。

7.5.2 选择菌落数在 10 CFU~150 CFU 之间的平皿进行计数。

7.6 不同稀释度菌落计数计算规则

7.6.1 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。

7.6.2 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 4.6.2 的相关规定进行计算。

7.6.3 若所有稀释度的平板上菌落数均大于 150 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。

7.6.4 若所有稀释度的平板菌落数均小于 10 CFU, 应按稀释度最低的平均菌落数乘以稀释倍数计算。

7.6.5 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。

7.6.6 若所有稀释度的平板菌落数均不在 10 CFU~150 CFU 之间, 其中一部分大于 150 CFU 或小于 10 CFU 时, 则以最接近 10 CFU 或 150 CFU 的平均菌落数乘以稀释倍数计算。

7.7 结果报告

7.7.1 公共用品用具真菌总数的测定结果按公式(3)得出。

$$A = \frac{T \times b}{k} \dots\dots\dots (3)$$

式中:

A ——一定面积的真菌总数测定结果(以 CFU/50 cm² 为单位报告);

T ——平板平均菌落数,单位为菌落形成单位(CFU);

b ——稀释倍数;

k ——根据采样面积、标准限值单位得出的系数($k = \frac{\text{采样面积}}{50}$,如采样面积 50 cm²,则 $k = 1$;如采样面积 25 cm²,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,则公式(3)中的 $T \times b$ 值为 4.6.2 中的 N 值。

7.7.2 菌落数小于 100 CFU 时,按“四舍五入”原则修约,以整数报告。

7.7.3 菌落数大于或等于 100 CFU 时,第 3 位数字采用“四舍五入”原则修约后,取前 2 位数字,后面用 0 代替位数;也可用 10 的指数形式来表示,按“四舍五入”原则修约后,采用两位有效数字。

7.7.4 若真菌蔓延生长覆盖整个平板的可记录为菌落蔓延。

7.7.5 若空白对照上有菌落生长,则此次检测结果无效。

7.7.6 如果同一件用品采两份样品,当两份样品检测结果不一致时,采用检测值高的结果报告。

7.8 质量控制和生物安全

应符合附录 B 的要求。

8 β -溶血性链球菌

8.1 原理

采用涂抹法采样,改良胰蛋白胨大豆肉汤增菌,血琼脂平板分纯培养并使用生化鉴定等方法检测公共用品用具中的 β -溶血性链球菌。

8.2 仪器和耗材

本方法中使用的仪器和耗材如下:

- 高压蒸汽灭菌器;
- 恒温培养箱:36 ℃ $\pm$ 1 ℃;
- 厌氧培养装置;
- 冰箱:2 ℃~5 ℃;
- 电炉或微波炉;
- 天平:感量 0.01 g;
- 显微镜;
- 载玻片;
- 涡旋混合器;
- 微生物生化鉴定系统;
- 无菌平皿:直径 90 mm;
- 无菌刻度吸管:1 mL(0.01 mL 刻度)、10 mL(0.1 mL 刻度);
- 微量移液器:1 000 μ L;
- 无菌锥形瓶:容量 200 mL、500 mL、1 000 mL、2 000 mL;
- pH 计或精密 pH 试纸。

8.3 培养基和试剂

8.3.1 改良胰蛋白胨大豆肉汤(mTSB)

8.3.1.1 基础培养基[胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)]

8.3.1.1.1 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,纯水 1 000 mL。

8.3.1.1.2 制法

将 8.3.1.1.1 中各成分溶于纯水中,加热溶解,校正 pH 至 7.3 ± 0.2 ,121 °C 灭菌 15 min,分装备用。

8.3.1.2 抗生素溶液

8.3.1.2.1 多黏菌素溶液

称取 10 mg 多黏菌素 B 于 10 mL 灭菌纯水中,振摇混匀,充分溶解后过滤除菌。

8.3.1.2.2 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。

8.3.1.3 完全培养基

8.3.1.3.1 成分

胰蛋白胨大豆肉汤(TSB) 1 000 mL,多黏菌素溶液 10 mL,萘啶酮酸钠溶液 10 mL。

8.3.1.3.2 制法

无菌条件下,将 8.3.1.3.1 中各成分进行混合,充分混匀,分装备用。

8.3.2 哥伦比亚 CNA 血琼脂

8.3.2.1 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,纯水 1 000 mL。

8.3.2.2 制法

将 8.3.2.1 中各成分溶于纯水中,加热溶解,校正 pH 至 7.3 ± 0.2 ,121 °C 灭菌 12 min,待冷却至 50 °C 左右时,加 50 mL 无菌脱纤维绵羊血,摇匀后倒平板。



8.3.3 血琼脂平板

见 6.3.3。

8.3.4 革兰氏染色液

见 5.3.4。

8.3.5 3%过氧化氢(H₂O₂)溶液

8.3.5.1 成分

30%过氧化氢(H₂O₂)溶液 100 mL, 纯水 900 mL。

8.3.5.2 制法

吸取 100 mL 30%过氧化氢(H₂O₂)溶液, 溶于纯水中, 混匀, 分装备用。

8.3.6 生化鉴定试剂盒或生化鉴定卡

商品化试剂, 按说明书操作。

8.4 检验步骤

样品检验步骤按照以下操作进行。

- a) 采样方法应符合附录 A 的要求。
- b) 增菌: 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, 用无菌吸管或微量移液器吸取液体检样 1 mL, 接种到 9 mL 改良胰蛋白胨大豆肉汤中, 于 36 °C ± 1 °C 培养 18 h ~ 24 h。
- c) 分离: 取 1~2 接种环增菌培养物, 划线接种至哥伦比亚 CNA 血琼脂平板, 36 °C ± 1 °C 厌氧培养 18 h ~ 24 h, 观察记录菌落特征。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 ~ 4 mm, 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。
- d) 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)典型菌落接种血琼脂平板, 36 °C ± 1 °C 培养 18 h ~ 24 h。
- e) 革兰氏染色镜检: 挑取血琼脂平板上典型菌落染色镜检。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。
- f) 触酶试验: 挑取血琼脂平板上典型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。
- g) 生化鉴定: 可使用商品化生化鉴定试剂盒或生化鉴定卡对典型菌落进行鉴定。

8.5 结果报告

综合以上试验结果, 在血琼脂平板上呈灰白色菌落, 菌落透明或半透明, 在菌落周围形成完全透明的溶血环, 镜检为革兰氏染色阳性, 球形或卵圆形, 呈链状排列, 触酶试验阴性, 可报告样品中检出 β-溶血性链球菌。如果同一件用品用具采两份样品, 当两份样品检测结果不一致时, 采用阳性检测结果报告。

8.6 质量控制和生物安全

应符合附录 B 的要求。

附 录 A

(规范性)

公共场所公共用品用具微生物采样方法

A.1 概述

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

A.2.1 随机抽取清洗消毒后待使用的公共用品用具。

A.2.2 采样过程中应无菌操作。

A.2.3 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入剩余的 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。

A.3 采集部位与采样面积

A.3.1 杯具

在杯具内、外缘与口唇接触处,即 1 cm~2 cm 高处各涂抹 25 cm²,内外圈为 1 份样品,采样总面积为 50 cm²。

A.3.2 棉织品

A.3.2.1 将毛巾、枕巾(枕套)、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 5 cm×5 cm (25 cm²)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。

A.3.2.2 在床单、被单(被套)表面与颈部、脚部接触部位 5 cm×5 cm (25 cm²)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。

A.3.2.3 睡衣、睡裤随机选择 2 处与皮肤接触部位 5 cm×5 cm (25 cm²)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。

A.3.3 洁具

A.3.3.1 浴盆:在浴盆内侧壁二分之一高度及盆底中央位置 5 cm×5 cm (25 cm²)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。

A.3.3.2 脸(脚)盆:在盆内壁二分之一高度,相对称的两侧壁处 5 cm×5 cm (25 cm²)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。

A.3.3.3 坐便器:在坐便圈前端弯曲处相对称的 2 处 5 cm×5 cm (25 cm²)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。

A.3.3.4 按摩床(椅):在床(椅)表面中部选择 2 处与人体接触部位 5 cm×5 cm (25 cm²)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。

A.3.4 鞋类

在每只鞋的鞋内与脚趾接触处 5 cm×5 cm (25 cm²)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,每双鞋共采集 2 份样品。

A.3.5 购物车(筐)

车(筐)把手:在把手 1/3 与 2/3 手易接触处 $5\text{ cm} \times 5\text{ cm}$ (25 cm^2) 面积范围内分别均匀涂抹 5 次,每 25 cm^2 采样面积为 1 份样品,每件用品共采集 2 份样品。

A.3.6 美容美发美甲用品

A.3.6.1 理发推子:在推子的前部(与皮肤接触处)均匀涂抹 5 次,采样面积达到 25 cm^2 为 1 份样品(一把理发推子采样面积未达到 25 cm^2 的可加采其他理发推子)。

A.3.6.2 理发刀、剪:在刀、剪两个面各均匀涂抹 5 次,采样面积达到 25 cm^2 为 1 份样品(一把理发刀、剪的采样面积未达到 25 cm^2 的可加采其他理发刀、剪)。

A.3.6.3 美容美甲用品: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 25 cm^2 为 1 份样品(一套美容美甲用品的采样面积未达到 25 cm^2 的可加采其他美容美甲用品)。

A.3.7 修脚工具

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 25 cm^2 为 1 份样品(一套修脚工具的采样面积未达到 25 cm^2 的可加采其他修脚工具)。

A.3.8 其他用品

在用品表面选择 2 处与人体接触处 $5\text{ cm} \times 5\text{ cm}$ (25 cm^2) 面积范围内分别采样,每 25 cm^2 采样面积为 1 份样品,每件用品共采集 2 份样品。

附 录 B
(规范性)
质量控制和生物安全

B.1 质量控制

B.1.1 培养基和试剂需符合 GB 4789.28 的要求,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。

B.1.2 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。

B.1.3 实验用水的电导率在 25℃ 时不应超过 $25\ \mu\text{S}/\text{cm}$ (相当于电阻率 $\geq 0.4\ \text{M}\Omega \cdot \text{cm}$),除非另有规定要求。水的微生物污染不应超过 $10^3\ \text{CFU}/\text{mL}$ 。

B.2 生物安全

实验室生物安全应符合 GB 19489 的要求,实验操作人员应掌握实验室生物安全操作知识,在处理或检测可疑致病菌时应采取必要的防护措施,减少职业暴露,并保证符合国家有关法规规定的要求。

参 考 文 献

- [1] 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
-

