



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 发布
中国国家标准化管理委员会

目 次

前言	Ⅲ
1 范围	1
2 术语和定义	1
3 细菌总数平板计数法	1
4 大肠菌群多管发酵法	4
5 金黄色葡萄球菌平板鉴定法	6
6 真菌总数平板计数法	8
7 溶血性链球菌培养法	9
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	11

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 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、金黄色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 °C~37 °C、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 °C、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 °C~28 °C、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 °C 高压灭菌 15 min。

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 7.4~7.6,分装于玻璃容器内,经 103.43 kPa (121 °C, 15 lb)灭菌 20 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 °C±1 °C。
- 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。

3.3.3 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 稀释液加入两个无菌平皿作空白对照。

3.3.4 样品的培养:及时将 15 mL~20 mL 冷却至 45 °C~50 °C 的平板计数琼脂培养基(可放置于 46 °C±1 °C 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 °C±1 °C 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。

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

式中:

- N ——一定面积的菌落总数,CFU/cm²;
- ∑C ——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)。

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2.5×10⁴。

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。

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

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 kPa(115 °C,10 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 °C,10 lb)高压灭菌 20 min,临用时加入乳糖并加热融化琼脂,冷至 50 °C~55 °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 °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 °C±1 °C。

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。

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 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱培养 $18\text{ h}\sim 24\text{ h}$,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 个~2 个进行染色镜检;同时接种乳糖发酵管,置 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $24\text{ h}\pm 2\text{ h}$ 。

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, $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、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, $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、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 ₂ O)	5 g
琼脂	20 g
蒸馏水	950 mL

增菌剂的配制:卵黄盐水(30%,体积分数)50 mL与除菌过滤的亚硝酸钾溶液(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,临用时加热融化琼脂,每95 mL加入预热至50℃的卵黄亚硝酸钾增菌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℃±1℃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。

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
葡萄糖	10 g
磷酸二氢钾	1 g
硫酸镁(MgSO ₄ · 7H ₂ O)	0.5 g
琼脂	20 g
氯霉素	0.1 g
蒸馏水	1 000 mL
孟加拉红水溶液(质量浓度=1:3 000)	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,再加入孟加拉红溶液,分装后 121 °C 高压灭菌 20 min,待冷至 55 °C 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 °C 高压灭菌 15 min,待冷至 55 °C 左右加入氯霉素。

6.2 仪器和设备

6.2.1 恒温箱:25 °C~28 °C。

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内或 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。

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

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 ℃高压灭菌 15 min。

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
三氯化钠溶液(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 °C ±1 °C。

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 °C ±1 °C 培养 24 h,接种血平板,置 36 °C ±1 °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 μm~1 μm,链状排列,链长短不一,短者 4 个~8 个细胞组成,长者 20 个~30 个,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

在茶具内、外缘与口唇接触处,即 1 cm~5 cm 高处一圈采样。采样总面积为 50 cm²。

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 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、被单的上下两部即与颈部、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 个 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 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.3.3.3 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 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.3.4 鞋类

在每只鞋的鞋内与脚趾接触处 5 cm×5 cm 面积范围内分别均匀涂抹 5 次,1 双鞋为 1 份样品,采样总面积为 50 cm²。

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 cm²。

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。
