附件 15

牙膏中金黄色葡萄球菌检验方法

 Detection ofStaphylococcus Aureus in Toothpaste

1 范围

本规范规定了牙膏中金黄金色葡萄球菌的检验方法。

本规范适用于牙膏中金黄色葡萄球菌的检验。

2 定义

金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*

为革兰氏阳性球菌，呈葡萄状排列，无芽胞，无荚膜，能分解甘露醇，血浆凝固酶阳性。

3 仪器和设备

3.1 显微镜。

3.2 恒温培养箱：36℃±1℃。

3.3 离心机。

3.4 无菌吸管：1 mL（具0.01 mL刻度）、10 mL（具0.1 mL刻度）或者移液器及吸头。

3.5 试管：18 mm×150 mm。

3.6 载玻片。

3.7 酒精灯。

3.8 三角瓶：250 mL。

3.9 高压灭菌器。

3.10 恒温水浴箱。

4 培养基和试剂

4.1 SCDLP 液体培养基

见总则中3.1。

4.2 营养肉汤

 成分：蛋白胨 10 g

 牛肉膏 3 g

 氯化钠 5 g

 蒸馏水加至 1000 mL

 制法：将上述成分加热溶解，调pH为7.4，分装，121℃高压灭菌15 min。

4.3 7.5%氯化钠肉汤

 成分：蛋白胨 10 g

 牛肉膏 3 g

 氯化钠 75 g

 蒸馏水加至 1000 mL

制法：将上述成分加热溶解，调pH为7.4，分装，121℃高压灭菌15 min。

4.4 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·6H2O） 5 g

 琼脂 20 g

 蒸馏水 950 mL

 pH7.0±0.2

 增菌剂的配制：30%卵黄盐水50 mL与除菌过滤的1%亚碲酸钾溶液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℃±1℃，调节pH。分装每瓶95 mL，121℃高压灭菌15 min。临用时加热溶化琼脂，冷至50℃，每95 mL加入预热至50℃左右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。使用前在冰箱贮存不得超过48 h±2 h。

4.5 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：将营养琼脂加热融化，待冷至50℃左右无菌操作加入脱纤维羊血，摇匀，制成平板，置冰箱内备用。

4.6 甘露醇发酵培养基

 成分：蛋白胨 10 g

 氯化钠 5 g

 甘露醇 10 g

 牛肉膏 5 g

 0.2%麝香草酚蓝溶液 12 mL

 蒸馏水 1000 mL

制法：将蛋白胨、氯化钠、牛肉膏加到蒸馏水中，加热溶解，调pH为7.4，加入甘露醇和指示剂，混匀后分装试管中，68.95 kPa（115℃ 10 lb）20 min灭菌备用。

4.7 灭菌液体石蜡

制法：取液体石蜡50 mL，121℃高压灭菌20 min。

4.8 兔（人）血浆制备

取3.8%柠檬酸钠溶液，121℃高压灭菌30 min，1份加兔（人）全血4份，混匀静置；2000 rpm~3000 rpm离心3 min~5 min。血球下沉，取上面血浆。

5 操作步骤

5.1 增菌：取1:10的检液10 mL接种到90 mL SCDLP液体培养基中，置36℃±1℃培养箱，培养24 h±2 h。

5.2 分离：自上述增菌培养液中，取1~2接种环，划线接种到Baird Parker平板上，如无此培养基也可划线接种到血琼脂平板上，置36℃±1℃培养48 h±2 h。在血琼脂平板上菌落呈金黄色，圆形，不透明，表面光滑，周围有溶血圈。在Baird Parker平板培养基上为圆形，光滑，凸起，湿润，颜色呈灰色到黑色，边缘为淡色，周围为一混浊带，在其外层有一透明带。用接种针接触菌落似有奶油树胶的软度。偶然会遇到非脂肪溶解的类似菌落，但无混浊带及透明带。挑取单个菌落分纯在血琼脂平板上，置36℃±1℃培养24 h±2 h。

5.3 染色镜检：挑取血琼脂平板上分纯后的菌落，涂片，进行革兰氏染色，镜检。金黄色葡萄球菌为革兰氏阳性菌，排列成葡萄状，无芽胞，无荚膜，致病性葡萄球菌，菌体较小，直径约为0.5 μm~1 μm。

5.4 甘露醇发酵试验：取血琼脂平板上分纯后的菌落接种到甘露醇发酵培养基中，在培养基液面上加入高度为2 mm~3 mm的灭菌液体石蜡，置36℃±1℃培养24 h±2 h，金黄色葡萄球菌应能发酵甘露醇产酸。

5.5 血浆凝固酶试验：吸取1:4新鲜血浆0.5 mL，置于灭菌小试管中，加入待检菌24 h±2 h营养肉汤培养物0.5 mL，混匀，置36℃±1℃恒温箱或恒温水浴中，每半小时观察一次，6 h之内如呈现凝块即为阳性。同时将已知血浆凝固酶阳性和阴性菌株的营养肉汤培养物及营养肉汤培养基各0.5 mL，分别加入无菌1:4血浆0.5 mL，混匀，作为对照。也可使用商品化试剂，按照说明书操作，进行血浆凝固酶试验。

5.6 如选择生化鉴定试剂盒或微生物鉴定系统，可从营养琼脂平板上挑取经纯化的可疑菌落，用无菌稀释液制备成浊度适当的菌悬液，使用生化鉴定试剂盒或微生物鉴定系统进行鉴定。

6 检验结果报告

被检样品经增菌分离培养后，平板上有可疑菌落生长，经染色镜检，证实为革兰氏阳性葡萄球菌，并能发酵甘露醇产酸，血浆凝固酶试验阳性者，可报告被检样品检出金黄色葡萄球菌。