



版本号  
PYJ-35-1CH

# 《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》 (GB 4789.11—2014)

## 一、概述

### 1.1 适用范围

本标准规定了食品中 β 型溶血性链球菌 (*Streptococcus*) 检验的检验方法。本标准适用于食品中 β 型溶血性链球菌的检验。  
第三篇致病菌检验

### 1.2 检测原理

β 型溶血性链球菌呈球形或卵圆形，直径 0.6~1.0μm，呈链状排列，长短不一，由 4~8 个至 20~30 个细胞组成不等，需氧或兼性厌氧菌，营养要求较高，普通培养基上生长不良，需补充血清、血液等生长因子。最适生长温度为 37℃，在 20~42℃ 能生长，最适 pH 为 7.4~7.6。在血清肉汤中易成长链，管底呈絮状或颗粒状沉淀生长。在血平板上形成灰白色、半透明、表面光滑、边缘整齐、直径 0.5~0.75mm 的细小菌落，能产生链球菌溶血素 O/S，所以能在血平板上出现溶血环。该菌具有过氧化氢酶，能催化过氧化氢成为水和原子态氧，继而形成氧分子，出现气泡。β 型溶血性链球菌在代谢过程中，产生链激酶，能激活血液中的纤维蛋白酶原为溶纤维蛋白酶，促使纤维蛋白凝块溶解。

## 二、设备与耗材

### 2.1 设备

- 2.1.1 恒温培养箱 36℃ ±1℃。
- 2.1.2 冰箱 2~5℃。
- 2.1.3 厌氧培养装置。
- 2.1.4 天平 感量 0.1g。
- 2.1.5 均质器。
- 2.1.6 显微镜 100~1000 倍。
- 2.1.7 无菌吸管 1ml(具 0.01ml 刻度)、10ml(具 0.1ml 刻度)或微量移液器及吸头。
- 2.1.8 无菌锥形瓶 容量 100ml、200ml、2000ml。
- 2.1.9 无菌培养皿 直径 90mm。
- 2.1.10 pH 计或 pH 比色管或精密 pH 试纸。
- 2.1.11 水浴装置 36℃ ±1℃。
- 2.1.12 微生物生化鉴定系统。
- 2.1.13 涡旋混匀仪。

### 2.2 耗材

- 2.2.1 均质袋。
- 2.2.2 生化鉴定试剂盒或生化鉴定卡。
- 2.2.3 厌氧产气袋。
- 2.2.4 均质杯。

2.2.5 接种环。

2.2.6 载玻片。

### 三、培养基与试剂

#### 3.1 培养基

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

3.1.2 哥伦比亚 CNA 血琼脂 (Columbia CNA blood agar )。

3.1.3 哥伦比亚血琼脂 (Columbia blood agar )。

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

#### 3.2 试剂

3.2.1 革兰染色液。

3.2.2 草酸钾血浆。

3.2.3 0.25% 氯化钙 (CaCl<sub>2</sub>) 溶液。

3.2.4 3% 过氧化氢 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 溶液。

### 四、检验过程

#### 4.1 检验程序



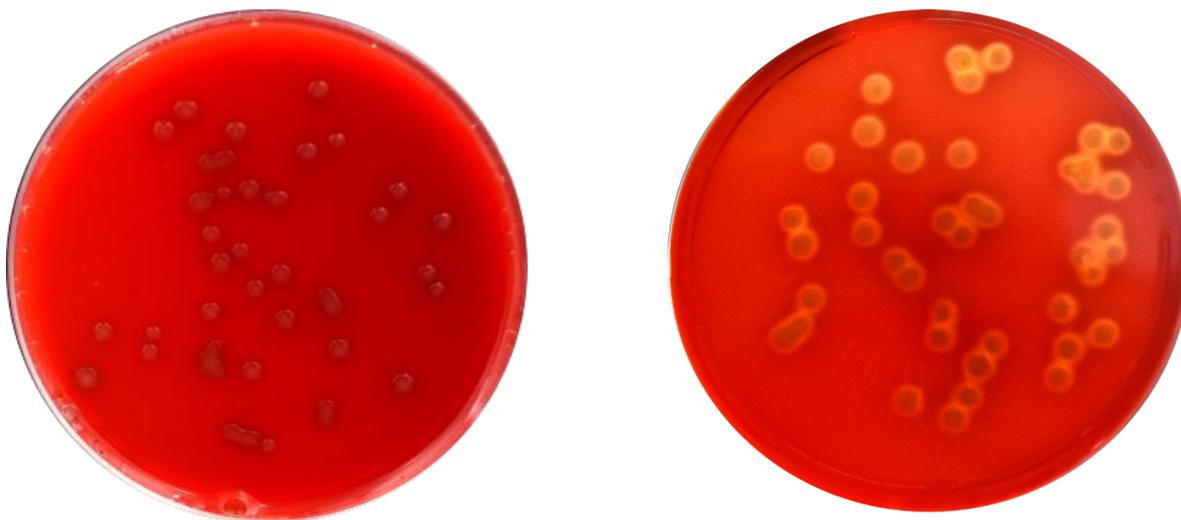
图 1 溶血性链球菌检验程序



#### 4.2 检验步骤

4.2.1 样品前处理及增菌 按无菌操作称取检样 25g(mL), 加入盛有 225ml mTSB 的均质袋中, 用拍击式均质器均质 1~2 分钟; 或加入盛有 225mL mTSB 的均质杯中, 以 8000~10000r/min 均质 1~2 分钟。若样品为液态, 振荡均匀即可。36°C ±1°C 培养 18~24 小时。

4.2.2 分离 将增菌液划线接种于哥伦比亚 CNA 血琼脂平板, 36°C ±1°C 厌氧培养 18~24 小时, 观察菌落形态。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 2~3mm, 灰白色、半透明、光滑、表面突起、圆形、边缘整齐, 并产生 β 型溶血。



β 型溶血性链球菌在哥伦比亚 CNA 血琼脂平板上的典型菌落 (正反面)

#### 4.2.3 鉴定

4.2.3.1 分纯培养 挑取 5 个 (如小于 5 个则全选) 可疑菌落分别接种哥伦比亚血琼脂平板和 TSB 增菌液, 36°C ±1°C 培养 18~24 小时。

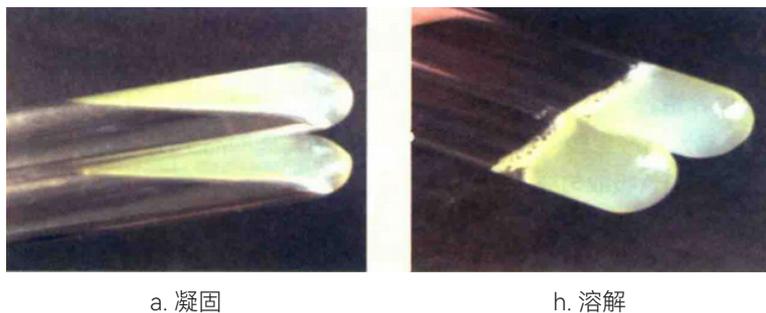
4.2.3.2 革兰染色镜检 挑取可疑菌落染色镜检。β 型溶血性链球菌为革兰染色阳性, 球形或卵圆形, 常排列成短链状。

4.2.3.3 触酶试验 挑取可疑菌落于洁净的载玻片上, 滴加适量 3% 过氧化氢溶液, 立即产生气泡者为阳性。β 型溶血性链球菌触酶为阴性 (见下图)。



触酶试验

4.2.3.4 链激酶试验 (选做项目) 吸取草酸钾血浆 0.2mL 于 0.8mL 0.85% 无菌生理盐水中混匀, 再加入经  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  培养 18~24 小时的可疑菌的 TSB 培养液 0.5mL 及 0.25% 氯化钙溶液 0.25mL, 振荡摇匀, 置于  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  水浴中 10 分钟, 血浆混合物自行凝固 (凝固程度至试管倒置, 内容物不流动)。继续  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  培养 24 小时, 凝固块重新完全溶解为阳性, 不溶解为阴性,  $\beta$  型溶血性链球菌为阳性。



链激酶试验

4.2.3.5 其他检验 使用生化鉴定试剂盒或生化鉴定卡对可疑菌落进行鉴定。

#### 4.3 结果与报告

综合以上试验结果, 报告每 25g(mL) 检样中检出或未检出溶血性链球菌。

### 五、检验注意事项

#### 5.1 设备与耗材的控制与使用

5.1.1 实验室的设备和耗材入库时, 应该对产品的质量进行验收, 确保产品内外密封性、无潮湿、完好无损, 产品规格、型号相符, 且在有效期内。

5.1.2 为了保证试验结果的准确性, 每批次一次性耗材均应进行无菌性和性能验收。同时实验室应定期对洁净区、生物安全柜、超净工作台等进行环境监测。

5.1.3 实验用的一次性无菌耗材应存放于阴凉干燥、通风良好的物架上, 常温区域为  $10\sim 30^{\circ}\text{C}$ , 阴凉区域为不高于  $20^{\circ}\text{C}$ , 相对湿度为  $40\%\sim 65\%$ 。按失效期的先后顺序码放, 禁止与其他物品混放, 不得使用标识不清、包装破损、失效、霉变的耗材。

5.1.4 为了控制环境污染, 可在每次检验过程中, 于检验工作台上打开两块 TSA 平板, 并在检验环境中暴露不少于 15 分钟, 将此平板与本批次样品同时进行培养, 以掌握检验过程中是否存在来自检验环境的污染。

#### 5.2 培养基与试剂的控制与使用

5.2.1 定期用 GB4789.28 推荐的阳性和阴性对照标准菌种, 对所使用的每批次培养基和生化试剂进行验证, 并进行记录。

5.2.2 实验过程中, 每批样品选择性增菌液、哥伦比亚 CNA 血琼脂平板等都要做空白对照。如果空白对照平板上出现  $\beta$  型溶血性链球菌菌落时, 应废弃本次实验结果, 并对增菌液、吸管、平皿、培养基、实验环境等进行污染来源分析。

5.2.3 定期使用  $\beta$  型溶血性链球菌标准菌株或相应定量活菌质控品, 在 BSL- II 生物安全实验室或阳性对照实验室内, 用适当的食品样品进行阳性对照试验验证, 染菌剂量应控制在每 25g 样品  $10\sim 100\text{CFU}$ , 并进行记录。

5.2.4 哥伦比亚 CNA 血琼脂平板应  $2\sim 8^{\circ}\text{C}$  冷藏保存, 开封后尽快使用完毕。

#### 5.3 样品前处理

液体样品先用 NaOH 或 HCl 调节 pH 至  $6.5\sim 7.5$ 。

#### 5.4 增菌培养

5.4.1 使用均质袋进行增菌培养时, 应使用带有底托的均质袋架子, 防止培养过程中前增菌液泄露污染培养箱。

5.4.2 当样品为易产生较大颗粒的样品 (譬如肉与肉制品) 时, 可使用带滤网无菌均质袋, 以方便均质后用吸管吸取匀液。

## 5.5 菌落特征

哥伦比亚 CNA 血琼脂平板上如有  $\beta$  型溶血性链球菌落出现, 应与金黄色葡萄球菌区别。后者在哥伦比亚 CNA 血琼脂平板上, 菌落较大, 呈金黄色 (有时为白色), 菌落周围可见完全透明溶血圈。 $\beta$  型溶血性链球菌在哥伦比亚 CNA 血琼脂平板上呈灰白色、半透明或不透明、光滑、表面突起、边缘整齐, 周围有无色透明溶血圈。

## 5.6 其他注意事项

5.6.1 厌氧环境下 (10% 二氧化碳和 90% 氮气), 哥伦比亚 CNA 血琼脂平板比普通血琼脂平板更适合  $\beta$  型溶血性链球菌的分离培养, 主要表现为菌落形态典型、溶血显现更为明显, 同时抑制了需氧菌及干扰菌的生长, 从而提高辨别率, 利于该菌的分离和筛选。

5.6.2 触酶实验中的 3% 过氧化氢溶液应现配现用; 用一次性塑料接种环挑取菌落; 不宜用血琼脂平板上生长的菌落, 因红细胞含有触酶, 可致假阳性反应。

5.6.3 因  $\beta$  型溶血性链球菌对消毒剂的抵抗力较低, 远低于大肠杆菌对消毒剂的抵抗力。因此, 培养室应尽量减少消毒剂残留对  $\beta$  型溶血性链球菌的生长影响 (尽量选用一次性培养皿)。

5.6.4 在使用 VITEK2 Compact 全自动微生物分析系统进行鉴定时, 应结合其他生物学特性综合评价后判断结果。如遇待检菌鉴定评分过低、多个生化反应结果不符或 48 小时生化反应仍不明显的情况, 应考虑与链球菌乳化程度不够、呈颗粒状, 不能形成均匀的菌悬液有关, 此时应重复试验或改用其他方法鉴定, 如 API20STREP 快速生化鉴定系统。

5.6.5 本方法移液时可使用可连接吸管的电动移液器, 在使用过程中, 一旦液体进入电动移液器滤膜中, 应立即对滤膜进行更换, 以防止交叉污染。

5.6.6 鉴于微量移液器移液头较短, 为控制污染, 在本方法移液过程中不建议使用。

## 六、疑难解析

6.1  $\beta$  型溶血与  $\alpha$  型溶血在观察时有什么区别?

$\beta$  型溶血: 菌落周围出现较宽的透明溶血环;  $\alpha$  型溶血: 菌落周围出现较窄的草绿色溶血环。

6.2  $\beta$  型溶血性链球菌和乙型溶血性链球菌是一种菌吗? 是的, 同一种菌的不同名称。

6.3 为什么  $\beta$  型溶血性链球菌实验要在生物安全柜中操作?

$\beta$  型溶血性链球菌可通过直接接触、空气飞沫传播或通过皮肤、黏膜伤口感染, 被污染的食品如奶、肉、蛋及其制品也可能感染人, 且该菌致病力强, 应做好相应的个人防护, 在生物安全柜中进行实验操作。

6.4 在医院抽了自己的血做链激酶试验, 血浆无法凝固? 医院用来抽血的小试管中已经有抗凝剂, 一般是 EDTA, 这个不能做链激酶试验。

6.5 草酸钾血浆该怎么配制?

直接有商品化的购买, 如果买不到, 由现在医院抽血加入到含 0.01g 草酸钾的真空试管, 然后上下振摇使其混合均匀。

## 参考文献

[1] 张焕春. 临床微生物学和微生物检验 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2017.

## 附录 A

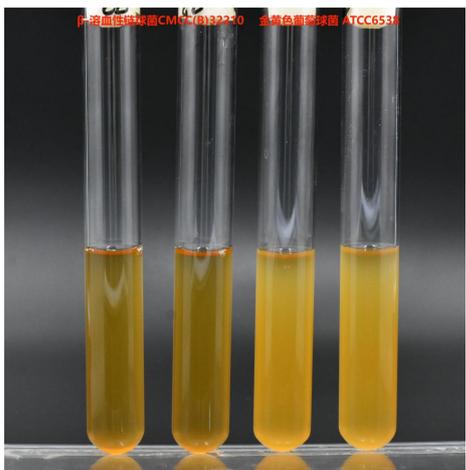
# 胰蛋白胨大豆肉汤 (TSB)

- 1、产品用途：可广泛应用于细菌的培养，特别用于消毒剂消毒效果的测试、蜡样芽孢杆菌的多管发酵法测定、溶血性链球菌选择性增菌培养。
- 2、检验原理：胰蛋白胨、植物蛋白胨提供氮源、维生素和生长因子；葡萄糖提供碳源；磷酸氢二钾为缓冲剂；氯化钠维持均衡的渗透压。
- 3、胰蛋白胨大豆肉汤 (TSB) 验证数据

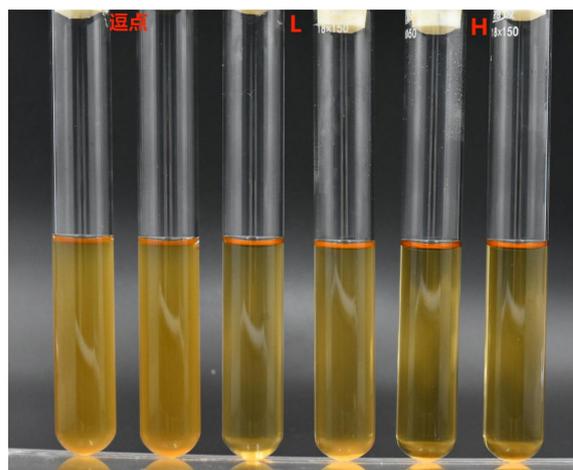


样品名称	质控菌株	厂家	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
胰蛋白胨大豆肉汤 (TSB)	β- 溶血性链球菌 CMCC(B)32210	逗点	88	生长良好 (浑浊度 2)	生长良好 (浑浊度 2)	符合
		H 品牌				符合
		L 品牌				符合
	金黄色葡萄球菌 ATCC6538	逗点	79			符合
		H 品牌				符合
		L 品牌				符合

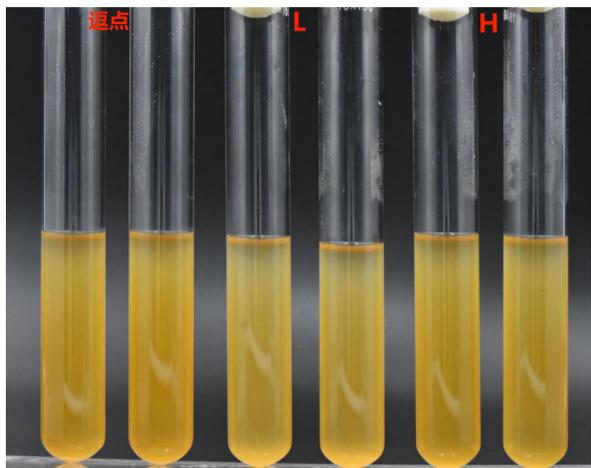
## 4、典型特征图片：



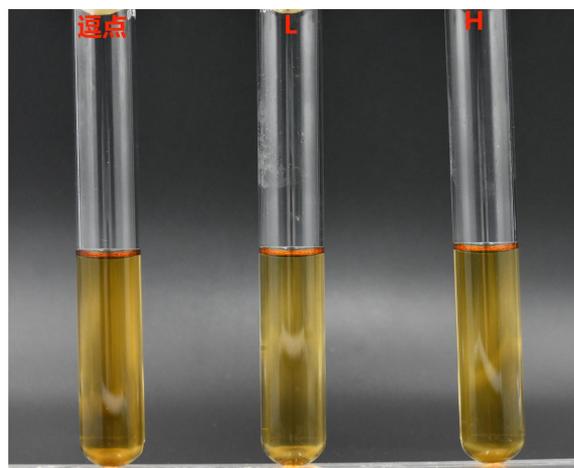
逗点 胰蛋白胨大豆肉汤 (TSB) 生长现象



β- 溶血性链球菌 CMCC(B)32210 TSB 肉汤竞品对比



金黄色葡萄球菌 ATCC6538 TSB 肉汤竞品对比



胰蛋白胨大豆肉汤 (TSB) 竞品空白对比



计数  $\beta$ -溶血性链球菌 CMCC(B)32210



计数金黄色葡萄球菌 ATCC6538

### 5、验证结果小结：

- 1、生长率：目标菌  $\beta$ -溶血性链球菌 CMCC(B)32210、金黄色葡萄球菌 ATCC6538，逗点、L 品牌、H 品牌的混浊度、生长现象均满足要求；
- 2、感观：逗点、L 品牌、H 品牌外观颜色无明显差异。

## 附录 B

# 哥伦比亚 CNA 血琼脂



1. 产品用途：用于溶血性链球菌的选择性分离。
2. 检验原理：胰酪蛋白胨、动物组织蛋白酶消化液、酵母提取粉、牛肉提取粉、淀粉提供碳氮源、维生素和生长因子；琼脂是凝固剂。配制添加羊血是细菌生长繁殖的良好营养物质。在 45 ~ 50℃的基础培养基中加入血液可以保存血液中某些不耐热的生长因子，同时血球不被破坏。多粘菌素 B、萘啶酸能抑制杂菌生长。
- 3、哥伦比亚 CNA 血琼脂验证

样品名称	质控菌株	厂家	待测培养基计数	参比培养基计数 (TSA)	生长率 (或特征)	评定标准	结果判定
哥伦比亚 CNA 血琼脂	化脓性链球菌 ATCC19615	逗点	40	46	PR=0.9	PR ≥ 0.5	符合
		L 品牌	51		PR=1.1		符合
		H 品牌	46		PR=1		符合
	普通变形杆菌 CMCC(B)49027	逗点	/	/	G=0	G ≤ 1	符合
		L 品牌	/	/	G=0		符合
		H 品牌	/	/	G=0		符合
	大肠埃希氏菌 ATCC25922	逗点	/	/	G=0	G ≤ 1	符合
		L 品牌	/	/	G=0		符合
		H 品牌	/	/	G=0		符合

1. 化脓性链球菌 ATCC19615 在哥伦比亚 CNA 血板上的菌落特征：灰白色菌落，产生 β 型溶血；
2. 普通变形杆菌 CMCC(B)49027 在哥伦比亚 CNA 血板上的菌落特征：选择性 G ≤ 1；
3. 大肠埃希氏菌 ATCC25922 在哥伦比亚 CNA 血板上的菌落特征：选择性 G ≤ 1；

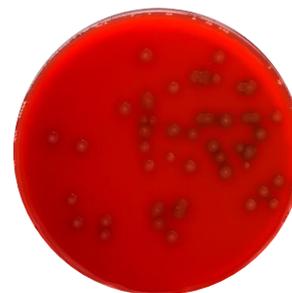
## 4、典型特征图片：



逗点化脓性链球菌  
ATCC19615 (正面)



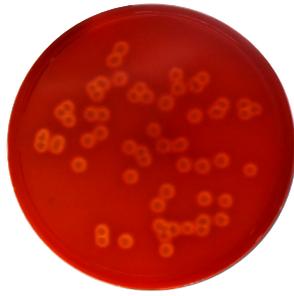
L 品牌化脓性链球菌  
ATCC19615 (正面)



H 品牌化脓性链球菌  
ATCC19615 (正面)



逗点化脓性链球菌 ATCC19615 (背面)



L 品牌化脓性链球菌 ATCC19615(背面)



H 品牌化脓性链球菌 ATCC19615(背面)



逗点普通变形杆菌 CMCC(B)49027



L 品牌普通变形杆菌 CMCC(B)49027



H 品牌普通变形杆菌 CMCC(B)49027



逗点大肠埃希氏菌 ATCC25922



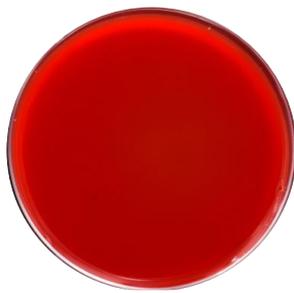
L 品牌大肠埃希氏菌 ATCC25922



H 品牌大肠埃希氏菌 ATCC25922



逗点哥伦比亚 CNA 血琼脂空白



L 品牌哥伦比亚 CNA 血琼脂空白



H 品牌哥伦比亚 CNA 血琼脂空白

#### 5、验证结果小结：

##### 验证结果小结

1. 生长率：目标菌化脓性链球菌 ATCC19615，逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标 PR  $\geq 0.5$  的要求，逗点、H 品牌、L 品牌都有产生  $\beta$  型溶血。
2. 选择性：普通变形杆菌 CMCC(B)49027、大肠埃希氏菌 ATCC25922，逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标 G  $\leq 1$  的要求。
3. 感观：三家外观暂无明显差异。

## 哥伦比亚血琼脂验证

1. 产品用途：用于苛养和非苛养型细菌的培养，以及溶血性细菌的鉴别
2. 检验原理：酪蛋白胰酶消化物、心胰酶消化物、肉胃酶消化物、酵母浸出粉、可溶性淀粉提供碳氮源、维生素和生长因子；羊血是细菌生长繁殖的良好营养物质。在 45 ~ 50°C 的基础培养基中加入血液可以保存血液中某些不耐热的生长因子，同时血球不被破坏。
3. 哥伦比亚血琼脂验证



样品名称	质控菌株	厂家	生长率（或特征）	评定标准	结果判定
哥伦比亚血琼脂	金黄色葡萄球菌 ATCC 6538	逗点	菌落周围有 β 溶血环	菌落周围有 β 溶血环	符合
		L 品牌	菌落周围有 β 溶血环		符合
		H 品牌	菌落周围有 β 溶血环		符合
	蜡样芽胞杆菌 CMCC(B)63303	逗点	菌落周围有 α 溶血环	菌落周围有 α 溶血环	符合
		L 品牌	菌落周围有 α 溶血环		符合
		H 品牌	菌落周围有 α 溶血环		符合

#### 4、典型特征图片：



逗点金黄色葡萄球菌  
ATCC 6538（正面）



L 品牌金黄色葡萄球菌  
ATCC 6538（正面）



H 品牌金黄色葡萄球菌  
ATCC 6538（正面）



逗点金黄色葡萄球菌  
ATCC 6538（反面）



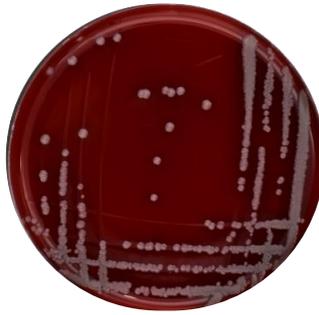
L 品牌金黄色葡萄球菌  
ATCC 6538（反面）



H 品牌金黄色葡萄球菌  
ATCC 6538（反面）



逗点蜡样芽胞杆菌  
CMCC(B)63303 (正面)



L 品牌蜡样芽胞杆菌  
CMCC(B)63303 (正面)



H 品牌蜡样芽胞杆菌  
CMCC(B)63303 (正面)



逗点蜡样芽胞杆菌  
CMCC(B)63303 (反面)



L 品牌蜡样芽胞杆菌  
CMCC(B)63303 (反面)



H 品牌蜡样芽胞杆菌  
CMCC(B)63303 (反面)



逗点哥伦比亚血琼脂空白



L 品牌哥伦比亚血琼脂空白



H 品牌哥伦比亚血琼脂空白

### 5、验证结果小结：

1. 特异性：目标菌金黄色葡萄球菌 ATCC 6538、蜡样芽胞杆菌 CMCC(B)63303，逗点、L 品牌、H 品牌均满足国标生长特性溶血现象的要求，逗点、H 品牌溶血现象明显，L 品牌溶血现象较弱。逗点生长速度较缓慢。
2. 感观：逗点、L 品牌、H 品牌外观颜色无明显差异。
3. 三家产品无明显差距。添加的羊血影响产品的主要性能，以上验证和仅有两种质控菌并不能充分判别干粉质量的好坏。

Aiculture®  
让微生物检测更省时



让微生物检测更省时



官方公众号



逗点商城



逗点 1688



逗点锐竞



逗点喀斯玛

深圳逗点生物技术有限公司  
Biocomma Limited

地址：深圳市龙岗区吉华街道甘坑社区甘李六路 12 号中海信创新产业城 12 栋 14 楼 1401-1406  
TEL: 400-878-7248 WEB: www.biocomma.cn EMAIL: info@biocomma.com