

团体标准

T/CIFST XXX—2023

葡萄球菌肠毒素测定 ELISA 试剂盒法

Detection of staphylococcal enterotoxins
using ELISA kits

(征求意见稿)

20XX-XX-XX 发布

20XX-XX-XX 实施

中国食品科学技术学会发布

前言

本文件依据 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》起草。

请注意本部分的某些内容可能涉及专利，本部分的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本文件由中国食品科学技术学会提出并归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：



葡萄球菌肠毒素测定 ELISA 试剂盒法

1 范围

本文件规定了食品、金黄色葡萄球菌培养液及可疑中毒食品中金黄色葡萄球菌肠毒素检测的酶联免疫吸附试剂盒测定方法。

本文件适用于食品、金黄色葡萄球菌培养液及可疑中毒食品中葡萄球菌肠毒素及肠毒素 A、B、C、D、E 分型的定性检测。

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）适用于本标准。

GB 4789.10-2016 《食品安全国家标准 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验》

GB/T 6682-2008 《分析实验室用水规格和试验方法》

GB 19489-2008 《实验室 生物安全通用要求》

3 方法原理

葡萄球菌肠毒素测定 ELISA 试剂盒法利用酶联免疫吸附技术，对样品中的葡萄球菌肠毒素测定及毒素分型测定。肠毒素检测中，微孔板的每一个反应孔中均包被了葡萄球菌肠毒素多价抗体；毒素分型检测中，微孔条 A~E 孔分别包被了 A、B、C、D、E 型葡萄球菌肠毒素单克隆抗体，阳性质控（H 孔）包被葡萄球菌肠毒素多价抗体，阴性质控（F 孔及 G 孔）包被非葡萄球菌肠毒素抗体。样品中游离的葡萄球菌肠毒素与微孔中包被的抗体结合，形成抗原抗体复合物。微孔中加入辣根过氧化酶标记物，与抗原抗体复合物结合。微孔中加入底物和显色剂后，辣根过氧化酶催化底物分解，微孔中的液体在显色剂的作用下由无色变为蓝色。最后，微孔中加入反应终止液终止酶反应，微孔中的液体由蓝色变为黄色。使用酶标仪（450 nm/620 nm ± 10 nm 波长）测量微孔溶液的吸光度值。样品中葡萄球菌肠毒素含量与吸光度值成正比。

4 设备和材料

- 4.1 葡萄球菌肠毒素检测试剂盒（见附录 A）。
- 4.2 葡萄球菌肠毒素分型检测试剂盒（见附录 B）。
- 4.3 酶标仪：450 nm/620 nm ± 10 nm。
- 4.4 分析天平：精确度 0.01 g。
- 4.5 均质器/振荡器。
- 4.6 摇床。
- 4.7 温箱：35 °C~37 °C。
- 4.8 冷冻离心机：≥3500 g/min，≤10 °C。
- 4.9 离心管 50 mL：玻璃或聚丙烯材质。
- 4.10 单道移液器：20 μL~200 μL，100 μL~1000 μL。

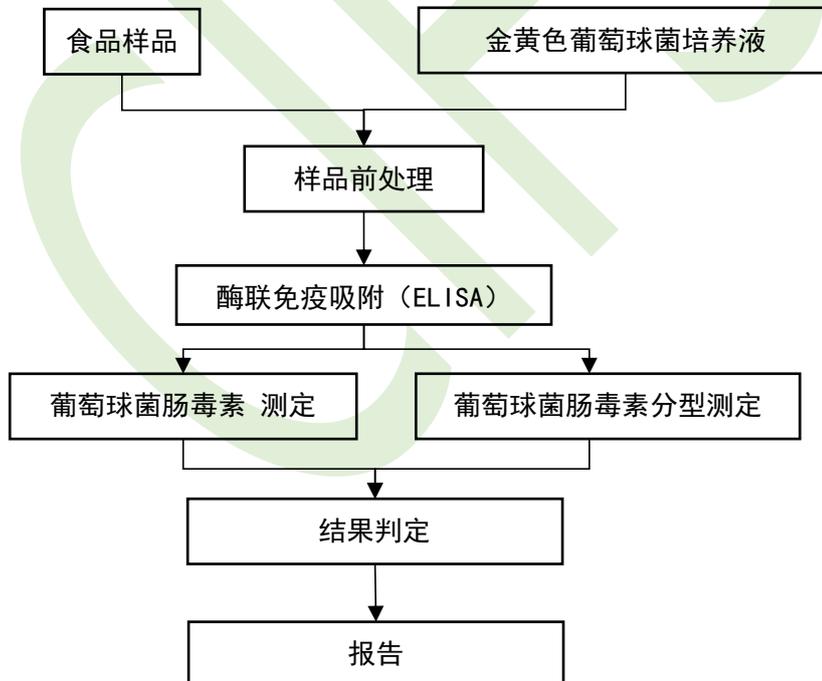
- 4.11 八道移液器：30 μL ~300 μL 。
 4.12 冰箱：冷藏 5 $^{\circ}\text{C}$ \pm 3 $^{\circ}\text{C}$ ，冷冻 \leq -18 $^{\circ}\text{C}$ 。
 4.13 pH 计：精度为 \pm 0.1。
 4.14 无菌滤膜：0.22 μm 。
 4.15 无菌注射器：10 mL。

5 试剂和培养基

- 5.1 无菌蒸馏水：应符合 GB/T 6682 规定的三级水要求。
 5.2 PBS 缓冲液：8.70 gNaCl，0.55 gNaH₂PO₄·H₂O，2.85 gNa₂HPO₄·2H₂O，用水定容至 1 L，调 pH 值至 7.4。
 5.3 洗涤缓冲液：按照 1:10 比例稀释 10 \times 洗涤缓冲液浓缩液。稀释后的 1 \times 洗涤缓冲液可在 2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 保存 1 周。若 10 \times 洗涤缓冲液浓缩液稀释前有结晶，需在 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅加热至完全溶解后再行配置。
 5.4 正庚烷：分析纯。
 5.5 脑心浸液培养基（BHI）。

6 检验程序

葡萄球菌肠毒素检验程序见图 1。



7 操作步骤

7.1 样品前处理

7.1.1 食品样品

7.1.1.1 液态样品（如生鲜乳、巴氏杀菌乳、调制乳、发酵乳、饮料、特医食品及食品原料等）

充分混匀待检样品，吸取样品 10 mL~25 mL，3500 g/min 10 °C 离心 10 min，完全去除脂肪层，取上清液进行检测。检测前须确认待检样品的 pH 值在 7.0±0.5 范围内。

7.1.1.2 粉状样品（如特医食品、婴幼儿配方粉、乳粉、调制乳粉、食品原料等）

充分混匀待检样品，称取 10 g~25 g 进行均质后称取 1g 加入 10mL 无菌蒸馏水，漩涡混匀，3500 g/min 10 °C 离心 10 min，完全去除脂肪层，取上清液用以检测（结果以溶解态计）。检测前须确认待检样品的 pH 值在 7.0±0.5 范围内。

7.1.1.3 脂肪含量小于 40% 的样品（如米、面及其制品，豆制品、熟肉制品、冰淇淋、即食食品等）

充分混匀待检样品，称取 10 g~25 g 均质后按每克样品加入 1.5 mL PBS 缓冲液比例（例如：10 g 样品+15 mL PBS 缓冲液），振荡混合 15 min，3500 g/min 10 °C 离心 10 min，完全去除脂肪层，取上清液进行检测。

7.1.1.4 脂肪含量大于等于 40% 的样品（如生肉、熟肉制品、即食食品等）

充分混匀待检样品，称取 10 g~25 g 均质，按照每 g 样品加入 1.5 mL PBS 缓冲液的比例（例如 10 g 样品+15 mL PBS 缓冲液），振荡混合 15 min，3500 g/min 10 °C 离心 10 min，取一定量上清液移至另一个离心管中，加入与所取上清液相同体积的正庚烷，充分混合 5 min，3500 g/min 10 °C 离心 10 min，完全去除上层庚烷层，取下层清液进行检测。

7.1.2 金黄色葡萄球菌培养液

将纯培养的待测金黄色葡萄球菌接种于 BHI 脑心浸出液培养基过夜培养。取 1.5 mL~2 mL 培养液至于离心管中，3500 g/min 10 °C 离心 5 min，将上清液过滤除菌，取滤清液进行检测。

7.1.3 可疑中毒食品

参考 7.1.1 食品样品的分类和样品前处理方法执行。

7.2 葡萄球菌肠毒素检测

7.2.1 将预先包被有葡萄球菌肠毒素特异性抗体的微孔条插入微孔板架，标记样品、阴性质控和阳性质控的位置。

7.2.2 在相应的微孔中分别加入 100 μL 处理好的样品液、阴性质控及阳性质控。使用粘胶纸密封微孔板，35 °C~37 °C 孵育 1 h。

7.2.3 取出微孔板，倒去微孔中的液体，每个微孔加入 300 μL 1× 洗涤缓冲液洗涤，混合

静置后倒去洗涤液，在吸水纸上拍干微孔板（力度适中），重复上述步骤 5 次（可由自动洗板机完成）。

7.2.4 洗板后，每个微孔加入 100 μL 辣根过氧化酶标记物 1 溶液，用粘胶纸密封微孔板，35 $^{\circ}\text{C}$ ~37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。

7.2.5 取出微孔板，进行第 2 次洗板（按照 7.2.3 操作）。

7.2.6 洗板后，每个微孔中加入 100 μL 辣根过氧化酶标记物 2 溶液，用粘胶纸密封微孔板，35 $^{\circ}\text{C}$ ~37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。

7.2.7 取出微孔板，进行第 3 次洗板（按照 7.2.3 操作）。

7.2.8 洗板后，每个微孔加入 100 μL 底物/显色剂，水平方向轻摇微孔板使微孔中的液体充分混合，用粘胶纸密封微孔板，35 $^{\circ}\text{C}$ ~37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 15 min。

7.2.9 取出微孔板，每个微孔加入 100 μL 终止液，水平方向轻摇微孔板使微孔中的液体充分混合，30 min 之内读取 450 nm/620 nm (± 10 nm) 波长下吸光度 (OD) 值。

7.3 葡萄球菌肠毒素分型检测

7.3.1 将预先包被有葡萄球菌肠毒素特异性抗体的微孔板条按照 A-H 的方向插入微孔板架，每一件待测样品使用一条微孔板条。

7.3.2 在微孔板条 A~G 孔中各加入 100 μL 处理好的样品液，在 H 孔加入 100 μL 阳性质控，轻轻混匀后，用粘胶纸密封微孔板，35 $^{\circ}\text{C}$ ~37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1h。

7.3.3 取出微孔板，倒去微孔中的液体，每个微孔加入 300 μL 1 \times 洗涤缓冲液洗涤，混合静置后倒去洗涤液，在吸水纸上拍干微孔板（力度适中），重复上述步骤 5 次（可由自动洗板机完成）。

7.3.4 洗板后，每个微孔加入 100 μL 辣根过氧化酶标记物 1 溶液，用粘胶纸密封微孔板，35 $^{\circ}\text{C}$ ~37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。

7.3.5 取出微孔板，进行第 2 次洗板（按照 7.3.3 操作）。

7.3.6 洗板后，每个微孔加入 100 μL 辣根过氧化酶标记物 2 溶液，用粘胶纸密封微孔板 35 $^{\circ}\text{C}$ ~37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。

7.3.7 取出微孔板，进行第 3 次洗板（按照 7.3.3 操作）。

7.3.8 洗板后，每个微孔加入 100 μL 底物/显色剂，水平方向轻摇微孔板使微孔中的液体充分混合，用粘胶纸密封微孔板，35 $^{\circ}\text{C}$ ~37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 15 min。

7.3.9 取出微孔板，每个加入 100 μL 终止液至每个微孔，水平方向轻摇微孔板使微孔中的液体充分混合，30 min 之内读取 450 nm/620 nm (± 10 nm) 波长下吸光度 (OD) 值。

8 结果与报告

8.1 检验有效性判定

阳性质控的吸光度 (OD) 值应 ≥ 1.0 ，阴性质控的吸光度 (OD) 值应 ≤ 0.2 ，如果不能同时满足以上要求，测试结果无效。

8.2 检出限

8.2.1 食品样品（包括可疑中毒食品）：液体样品及溶解后的粉末样品：0.25 ng/mL，其他样品 0.375 ng/g (mL)。

8.2.2 金黄色葡萄球菌培养液：0.25 ng/mL。

8.3 临界值计算

- 8.3.1 葡萄球菌肠毒素测定：临界值（Cut-off）=阴性质控的吸光度（OD）值+0.15
- 8.3.2 葡萄球菌肠毒素分型测定：临界值（Cut-off）=（F孔OD值+G孔OD值）/2+0.15

8.4 结果判定及报告

8.4.1 葡萄球菌肠毒素测定

若结果显示样品吸光度（OD）值<临界值，报告未检出葡萄球菌肠毒素。若结果显示样品吸光度（OD）值≥临界值，报告检出葡萄球菌肠毒素。

8.4.2 葡萄球菌肠毒素分型测定

若结果显示样品吸光度（OD）值<临界值，报告未检出某型葡萄球菌肠毒素。若结果显示样品吸光度（OD）值≥临界值，报告检出某型葡萄球菌肠毒素。

9 质量控制

- 9.1 实验前应确认试剂盒有效期，如阳性质控的吸光度（OD）值<1.0或底物/发色剂在使用前颜色变蓝则表明试剂已失效，不得使用。
- 9.2 若检测结果的吸光度（OD）值超出仪器读值的线性范围，则需要用PBS缓冲液稀释培养物上清液，重新检测。
- 9.3 当葡萄球菌肠毒素分型检测同时检出2种及2种以上肠毒素时，按附录C对检测结果进行修正。

10 生物安全

- 10.1 所有实验操作应在生物安全柜中进行。
- 10.2 每次加样前必须更换新的吸头并定期清洁移液器。
- 10.3 使用无菌蒸馏水配置洗涤缓冲液及PBS缓冲液。
- 10.4 在称量、均质样品、肠毒素提取和肠毒素检测等四个实验阶段分别佩戴并更换一次性乳胶手套。
- 10.5 按照GB19489处理实验废弃物。

附录A
(规范性)
葡萄球菌肠毒素测定试剂盒

A.1 试剂和材料

- A.1.1 预包被金黄色葡萄球菌肠毒素多价抗体的可拆分微孔板：8×12孔；
- A.1.2 阳性质控：2 mL/瓶×1瓶；
- A.1.3 阴性质控：2 mL/瓶×1瓶；
- A.1.4 10×洗涤缓冲液浓缩液：100 mL/瓶×1瓶；
- A.1.5 酶连接物 1：11 mL/瓶×1瓶；
- A.1.6 酶连接物 2：11 mL/瓶×1瓶；
- A.1.7 底物/发色剂：13 mL/瓶×1瓶；
- A.1.8 终止液：14 mL/瓶×1瓶。

A.2 试剂盒保存及使用

- A.2.1 试剂盒于 2℃~8℃ 黑暗处避光保存，使用前回复至室温（20℃~25℃）；使用完尽快放回 2℃~8℃，不可冷冻。未使用的微孔板孔，必须与袋中的干燥剂一起，重新放入铝箔封口袋中并封好，放置 2℃~8℃ 保存。
- A.2.2 不同批号试剂盒中组分不得混用。
- A.2.3 超过有效期的试剂盒不得使用。

附录B
(规范性)
葡萄球菌肠毒素分型检测试剂盒

B.1 试剂和材料

- B.1.1 可拆分微孔板(8×12孔): A-E孔及H孔预包被金黄色葡萄球菌肠毒素A、B、C、D、E型特异性抗体, F、G孔预包被非葡萄球菌肠毒素的特异性抗体;
- B.1.2 阳性质控: 2 mL/瓶×1瓶;
- B.1.3 10×洗涤缓冲液浓缩液: 100 mL/瓶×1瓶;
- B.1.4 酶连接物1: 11 mL/瓶×1瓶;
- B.1.5 酶连接物2: 11 mL/瓶×1瓶;
- B.1.6 底物/发色剂: 13 mL/瓶×1瓶;
- B.1.7 终止液: 14 mL/瓶×1瓶。

B.2 试剂盒保存及使用

- B.2.1 试剂盒于2℃~8℃黑暗处避光保存, 使用前回复至室温(20℃~25℃); 使用完尽快放回2℃~8℃, 不可冷冻。未使用的微孔板孔, 必须与袋中的干燥剂一起, 重新放入铝箔封口袋中并封好, 放置2℃~8℃保存。
- B.2.2 不同批号试剂盒中组分不得混用。
- B.2.3 超过有效期的试剂盒不得使用。

附录C
(规范性附录)
葡萄球菌肠毒素分型检测结果修正方法

C.1 单型别葡萄球菌肠毒素吸光度(OD)值

单型别葡萄球菌肠毒素吸光度(OD)值应该介于1.0到2.5之间。当OD值 >2.5 时,需使用PBS缓冲液稀释测样品,并重新进行检测,使其吸光度(OD)值介于1.0到2.5之间。

C.2 A/E孔或B/C孔吸光度(OD)值均 <2.5

当吸光度(OD)值较低孔的吸光度(OD)值 \leq 吸光度(OD)值较高孔的吸光度(OD)值的50%时,报告为样品中含有吸光度(OD)值较高的孔的某型毒素。当吸光度(OD)值较低的孔的吸光度(OD)值 $>$ 吸光度(OD)值较高孔的吸光度(OD)值的50%时,报告为样品中含有两种型的毒素。