

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2528—2010

饮用水军团菌检测

Determination of *Legionella* in drinking water

2010-03-02 发布

2010-09-16 实施

中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局 发布

中华人民共和国出入境检验检疫

行 业 标 准

饮用水中军团菌检测

SN/T 2528—2010

*

中国标准出版社出版
北京复兴门外三里河北街16号

邮政编码:100045

网址 www.spc.net.cn

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 16 千字

2010年5月第一版 2010年5月第一次印刷

印数 1—1 600

*

书号: 155066·2-20860 定价 16.00 元

前 言

本标准的附录 A 为规范性的附录,附录 B 为资料性的附录。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位:中华人民共和国上海出入境检验检疫局、中华人民共和国山西出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:李晓虹、李卫华、韩伟。

本标准是首次发布的出入境检验检疫行业标准。

饮用水中军团菌检测

1 范围

本标准规定了饮用水中军团菌的检测方法。

本标准适用于饮用水中军团菌的检测。工业用水和天然水及其沉淀物、沉积物和粘土/软泥等相关样本进行军团菌检测可参考此法。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 27403 实验室质量控制规范 食品分子生物学检测

GB/T 27405 实验室质量控制规范 食品微生物检测

SN/T 1538.1 培养基制备指南 第1部分:实验室培养基制备质量保证通则

SN/T 1538.2 培养基制备指南 第2部分:培养基性能测试实用指南

3 定义和术语

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

军团菌 *Legionella*

本细菌为两端钝圆,具有端鞭毛,有动力,无芽孢和荚膜,需氧和兼性厌氧的大小为(0.3 μm ~0.4 μm) \times (2.0 μm ~3.0 μm)或(0.5 μm ~0.7 μm) \times (2.0 μm ~20 μm)的革兰氏阴性杆菌。

4 设备和材料

4.1 培养箱:36 $^{\circ}\text{C}$ \pm 1 $^{\circ}\text{C}$ 。

4.2 吸管:1 mL、5 mL 和 10 mL,分刻度 0.1 mL。

4.3 接种环:直径 3 mm。

4.4 天平:感量 0.1 g。

4.5 真空过滤系统。

4.6 灭菌平皿:皿底直径 9 cm。

4.7 浊度仪。

4.8 PCR 扩增仪。

4.9 台式离心机:最高离心力 13 000 r/min。

4.10 低倍双目显微镜。

4.11 恒温水浴锅:36 $^{\circ}\text{C}$ \pm 1 $^{\circ}\text{C}$ 。

4.12 黑色硝化纤维素过滤膜:直径 47 mm~50 mm,孔径 0.45 μm 。Milipore 或同类产品。

4.13 微量可调移液器。1 μL ~10 μL ,100 μL ,200 μL ,1 000 μL 。

4.14 旋涡振荡器。

4.15 电泳仪。

4.16 凝胶成像分析系统。

- 4.17 微波炉。
- 4.18 玻璃仪器。

5 培养基和试剂

除另有规定外,所用试剂均为分析纯,试验用水和培养基配制应符合 GB/T 27405 和 GB/T 27403 的规定。

- 5.1 缓冲酵母浸膏琼脂培养基(BCYE):见附录第 A.1 章。
- 5.2 缓冲酵母浸膏琼脂培养基(BCYE-Cys):见附录第 A.2 章。
- 5.3 选择性培养基(GVPC 培养基):见附录第 A.3 章。
- 5.4 血平板:见附录第 A.4 章。
- 5.5 酸缓冲液:见附录第 A.5 章。
- 5.6 Page'盐:见附录第 A.6 章。
- 5.7 2×Taq PCR Master Mix[0.1 U Taq Polymerase/μL,500 μmol/L dNTP each,20 mol/L Tris-HCl(pH8.3)、100 mol/L KCl,3 mol/L MgCl₂]。
- 5.8 PCR 引物:见表 1。

表 1 军团菌引物序列及扩增片段长度

基因	引物名称	引物序列(5'-3')	扩增片段大小/bp
5S rRNA	S1	ACTATAGCGATTTGGAACCA	104
	S2	GCGATGACCTACTTTTCGCAT	
Mip	S3	ATGATAGCTTATGACTGGTA	996
	S4	TTCTTTGTTCACCTCAGTAT	

- 5.9 琼脂糖(电泳级)。
- 5.10 溴化乙锭。
- 5.11 DNA marker。
- 5.12 TAE 电泳储备液(50×):见附录第 A.7 章。
- 5.13 军团菌分型诊断试剂盒。

6 检验程序

军团菌检验程序见图 1。

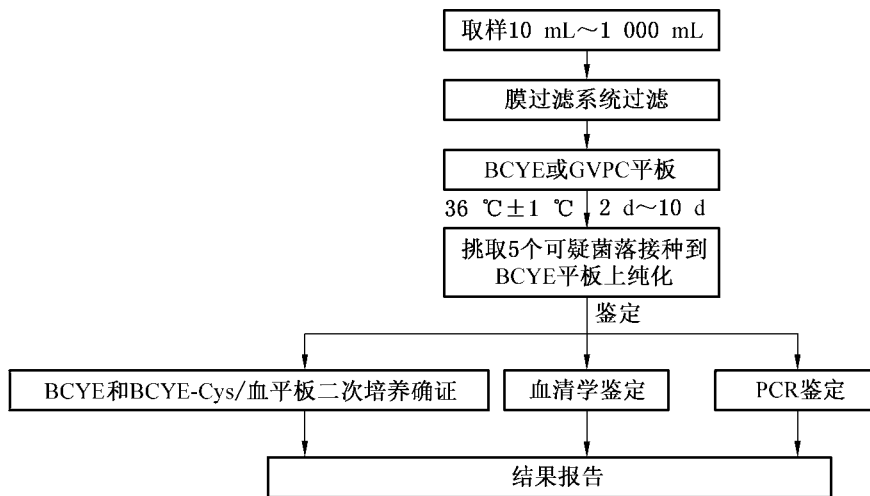


图 1 军团菌的检测程序

7 检验步骤

7.1 取样

7.1.1 总则

根据给水系统和检验目的确定收集样品的体积。要详细记录样品的来源、体积、取样时的温度和是否含有灭菌剂及其性质,以助于实验室检测。基于安全和分析原因,不要检测未知来源的样品或是冷却水、过程水,除非这些样品有关于化学添加物的信息,或是在过程中可能存在的污染物的信息。

7.1.2 取样容器

用无菌玻璃、聚乙烯或类似容器收集水样品 10 mL~1 000 mL。样品容器的材料也应适用于饮用水。若离试样点较远,使用易碎的玻璃容器不安全的,可使用塑料制品。

7.1.3 含生物防腐剂的样品

如果水样含有或是认为含有氧化型灭菌剂时,在取样时或取样前应先使其钝化。

注:对于氯和其他氧化型灭菌剂,可通过加硫代硫酸钾或硫代硫酸钠到容器中钝化。

7.1.4 样品运输和储存

实验室接到水样后应尽快进行微生物学分析,最好是取样当天,最多不超过 2 d。如果是在取样的当天分析,样品运输时在室温状态下,避免光照就可以了。否则,需在冷藏条件 $5\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下运输样品。热水样应在取样后直接冷却。

7.2 膜过滤

过滤 10 mL~1 000 mL 水样。按照以下步骤通过酸缓冲液处理样品,以抑制非军团菌的生长。样品过滤后,加入 30 mL 酸缓冲液,静置 5 min。膜过滤去酸缓冲液,用 20 mL Page' 盐或其他洗液洗涤膜。小心地用无菌镊子转移膜,正面向上放置在 BCYE 或 GVPC 琼脂平板上,确保没有气泡。

7.3 培养

倒置平板在 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 2 d~10 d。培养期间保持湿润的培养环境。

7.4 检查平板

在 10 d 的培养期间,经常观察。用显微镜在 3 d~4 d 内至少观察两次。记录可疑军团菌菌落的数量。军团菌的生长很可能被其他菌掩盖或抑制。如果怀疑被抑制,或是有强的生长背景,需重新稀释样品或减少过滤的样品体积。在黑色滤膜或黑色背景下,典型的军团菌菌落通常是白-灰-蓝-紫,但也可能出现棕色、粉色、灰绿色或深红色。军团菌表面光滑,边缘整齐,出现典型的毛玻璃现象。

注:通过膜过滤的军团菌在培养基的生长更加缓慢,且通常菌落比直接在培养基上生长的要小。

7.5 可疑军团菌的确证

7.5.1 BCYE-Cys 的二次培养

在 BCYE 或 GVPC 平板上次日生长的菌落均不是军团菌。从 BCYE 或 GVPC 平板上选择 2 d 后生长的至少 5 个可疑军团菌菌落接种到 BCYE 和 BCYE-Cys 两块平板上进行二次培养,如果可疑菌落的形状不同,确保每一形状至少挑取两个菌落, $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养至少 2 d。在 BCYE 平板上生长而在 BCYE-Cys 平板或血平板上不生长的被认为是军团菌。记录每个平板的结果。

7.5.2 血清学鉴定

从 BCYE 或 GVPC 平板上挑取可疑菌落纯化后,用多价诊断血清作玻片凝集实验。有条件的可作分型实验。

7.5.3 PCR 检测

7.5.3.1 PCR 模板的制备

挑取从 BCYE 或 GVPC 平板上可疑纯菌落混于 100 μL 蒸馏水中,振荡混匀,100 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸 5 min~10 min,10 000 r/min 离心 5 min,取上清液作为模板。

7.5.3.2 多重 PCR 反应体系和条件

——反应体系体积为 50 μL ;10 $\mu\text{mol/L}$ 引物 S1、S2 各 1 μL ,20 $\mu\text{mol/L}$ 引物 S3、S4 各 5 μL ;2 \times

Taq PCR Master Mix 25 μ L;模板 DNA 3 μ L;ddH₂O 补足 50 μ L;
——反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,60 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,30 个循环,
72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min,4 $^{\circ}$ C 保存反应产物。

7.5.3.3 PCR 质控对照

每次进行 PCR 检测时均需要设置阳性对照、阴性对照和空白对照。其中,用军团菌标准阳性菌株提取的 DNA 作阳性对照。用非军团菌的标准菌株提取的 DNA 作阴性对照。用灭菌双蒸水替代模板作空白对照。

7.5.3.4 PCR 扩增产物电泳检测

取 1.5 g 琼脂糖于 100 mL 电泳缓冲液中加热,充分融化,加入溴化乙锭,使其最终浓度达到 1.0 μ g/mL,制胶。在电泳槽中加入电泳缓冲液,使液面刚刚没过胶面 1 mm。取 10.0 μ L PCR 扩增产物点样。9 V/cm 恒压,电泳 20 min~30 min。紫外凝胶成像仪下观察电泳结果,做好记录。PCR 扩增产物为 104 bp、996 bp(见表 1)。

8 结果及报告

8.1 当在 BCYE 或 GVPC 平板上次日生长者,报告未检出军团菌/过滤水的体积。

8.2 当在 BCYE 或 GVPC 平板上不生长,或在 BCYE/GVPC 平板上生长而在 BCYE-Cys/血平板上也生长时,报告未检出军团菌/过滤水的体积。

8.3 当在 BCYE 或 GVPC 平板上生长而在 BCYE-Cys 或血平板上不生长的,同时血清凝集实验阳性者,报告检出军团菌/过滤水的体积。

8.4 当在 BCYE 或 GVPC 平板上生长,同时 PCR 产物扩增出片段长度为 104 bp 者,报告检出军团菌(非嗜肺军团菌)/过滤水的体积。

8.5 当在 BCYE 或 GVPC 平板上生长,同时 PCR 产物扩增出片段长度为 104 bp、996 bp 两条片断者,报告检出军团菌(嗜肺军团菌)/过滤水的体积。

8.6 定量计算。挑取的可疑菌落经鉴定后,计数方法如下:从 BCYE 或 GVPC 平板上计算出在 30 个~300 个之间的可疑菌落数(若超出 300 个要稀释),从可疑菌落中挑取 5 个进行确证,若有 3 个证实是军团菌,则 3/5 乘以 BCYE 或 GVPC 平板上在 30 个~300 个之间的可疑菌落数,即为单位体积的可能军团菌数(CFU/过滤水的体积)。

9 废弃物处理和防止污染的措施

检测过程中防止交叉污染的措施参见附录 B。

附 录 A
(规范性附录)
培养基和试剂

A.1 一般要求

为保证培养基的质量,宜按照 SN/T 1538.1 和 SN/T 1538.2 对培养基进行质量控制。

A.2 缓冲酵母浸膏琼脂培养基(BCYE)**A.2.1 成分**

酵母粉	10.0 g
琼脂	12.0 g
活性炭	2.0 g
α -酮戊二酸钾	1.0 g
ACES 缓冲液 (N-2-乙酰氨基-2-氨基乙磺酸)	10.0 g
氢氧化钾	2.8 g
L-盐酸半胱氨酸	0.4 g
焦磷酸铁	0.25 g
蒸馏水	1 000 mL

A.2.2 制备**A.2.2.1 半胱氨酸和铁盐溶液**

制备新鲜的 L-盐酸半胱氨酸和焦磷酸铁溶液:称取半胱氨酸和铁盐 0.4 g 和 0.25 g 分别加到 10 mL 蒸馏水中。溶液通过孔径为 0.22 μm 的纤维素酯滤膜过滤灭菌。-20 $^{\circ}\text{C}$ 存贮于灭菌容器中,时间不超过 3 个月。

A.2.2.2 ACES 缓冲液

N-2-乙酰氨基-2-氨基乙磺酸加到 500 mL 蒸馏水中,45 $^{\circ}\text{C}$ ~ 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴溶解。称取氢氧化钾于 480 mL 蒸馏水中,混匀至溶解。混合以上两种溶液即为 ACES 缓冲液。

A.2.2.3 培养基

活性酵母浸膏和 α -酮戊二酸连续地加入到 980 mL 的 ACES 缓冲液中。0.1 mol/L 氢氧化钾 (5.6 g + 1 L 蒸馏水),0.1 mol/L H_2SO_4 (5.3 mL + 1 L 蒸馏水)。用以上两种溶液调整培养基的 pH 至 6.8 \pm 0.2。加入琼脂,121 $^{\circ}\text{C}$,15 min 高压灭菌。5 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存于密闭容器内,不超过 4 个星期。

A.3 缓冲酵母浸膏琼脂培养基(BCYE-Cys)

配制见第 A.2 章,不加 L-半胱氨酸。

A.4 选择性培养基(GVPC 培养基)

注:GVPC 培养基是在 BCYE 培养基中添加了三种抗生素和甘氨酸。

A.4.1 成分

游离的氨基甘氨酸	3 g/L
硫酸多粘菌素 B(多肽类抗生素)	80 000 IU/L
万古霉素	0.001 g/L

放线菌酮 0.08 g/L

放线菌酮也可用那他霉素代替。

A.4.2 制备

A.4.2.1 抗生素的制备

称取硫酸多粘菌素 B 200 mg 加入到 100 mL 的蒸馏水中,使其终浓度为 14 545 IU/mL。混合。通过孔径为 0.22 μm 的纤维素酯滤膜过滤灭菌。吸取 5.5 mL 于灭菌容器中,储存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。使用时室温溶解。称取适量的万古霉素 20 mg 加入到 20 mL 的蒸馏水中,混合。通过孔径为 0.22 μm 的纤维素酯滤膜过滤灭菌。吸取 5.5 mL 于灭菌容器中,储存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。使用时室温溶解。称取适量的放线菌酮 2 g 加入到 100 mL 的蒸馏水中,混合。通过孔径为 0.22 μm 的纤维素酯滤膜过滤灭菌。吸取 4 mL 于灭菌容器中,储存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。使用时室温溶解。抗生素溶液冷冻保存最长时间为 6 个月。

注:放线菌酮对肝脏有毒害,称量其粉末时要戴橡胶手套和防尘面罩。

A.4.2.2 GVPC 培养基的配制

按照 A.1 配制 BCYE 培养基的步骤进行,在加过 α -酮戊二酸后添加 3.0 g 甘氨酸氨盐,调 pH 到 6.8 ± 0.2 。添加 L-半胱氨酸和铁以后,各添加 A.4.2.1 中三种抗生素 5.5 mL、5.5 mL 和 4 mL,混合。

A.5 血平板

A.5.1 成分

豆粉琼脂(pH7.4~7.6)	100 mL
脱纤维羊血(或兔血)	5 mL~10 mL

A.5.2 制备

加热溶化琼脂,冷到 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$,以灭菌手续加入脱纤维羊血,摇匀,倾注平板。亦可用其他营养丰富的基础培养基配制血琼脂。

A.6 酸缓冲液

A.6.1 成分

盐酸	0.2 mol/L
氯化钾	0.2 mol/L

A.6.2 制备

A.6.2.1 溶液 A:0.2 mol/L 盐酸

在 1 L 蒸馏水中添加 17.4 mL($\rho=1.18,35.4\%$)或是 20 mL($\rho=1.16,31.5\%$)浓盐酸。混合, $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min。

A.6.2.2 溶液 B:0.2 mol/L 氯化钾

在 1 L 蒸馏水中溶解 14.9 g 氯化钾,混合,在 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 15 min。

A.6.2.3 制备酸缓冲液:混合 3.9 mL 溶液 A 和 25 mL 溶液 B 制备酸缓冲液,用 1 mol/L 氢氧化钾调 pH 到 2.2 ± 0.2 ,用带塞的玻璃溶液保存。在黑暗状态下室温放置不超过 1 个月。

A.7 Page' 盐

A.7.1 成分

氯化钠	0.120 g
七水硫酸镁	0.004 g
二水氯化钙	0.004 g
磷酸氢二钠	0.142 g
磷酸二氢钾	0.136 g

双蒸水 1 000 mL

A.7.2 制备

将上述化学试剂添加到蒸馏水中,溶解、混合,在 121 °C 高压灭菌 15 min。为精确称量以上化学试剂,先制备 10 L 盐溶液,然后分装成小体积灭菌。

A.8 TAE 电泳储备液(×50)

Tris	24.2 g
冰乙酸	5.7 mL
0.5 mol/L EDTA 溶液(pH8.0)	10.0 mL
加蒸馏水	定容至 100 mL

使用时稀释成 1×电泳缓冲液。

附 录 B
(资料性附录)
检测过程中防止交叉污染的措施

B.1 抽样和制样过程

抽样和制样工具,应清洗干净,121℃高压灭菌15 min~20 min,一套洁净工具限于一份样品使用。存放样品的容器应该经过清洗、高压,或为一次性灭菌容器。

B.2 检测过程

B.2.1 PCR实验室应分为样品制备区、前PCR区、PCR区和后PCR区。将模板提取、PCR反应液配制、PCR循环扩增及PCR产物的鉴定等步骤分区或分室进行。实验室的运作应从“洁净”到“污染区”单向进行。

B.2.2 实验过程中,应穿戴实验服和手套,手套要经常更换。各区要有专用实验服,经常清洗。

B.2.3 各区所有的试剂、器材(尤其是移液器)、仪器都应专用,不得带出该区。

B.2.4 所有溶液、水、耗材和器具要121℃,15 min高压,避免核酸和(或)核酸酶污染。每种溶液应使用高质量的成分和新蒸馏的双蒸水。在20℃~25℃贮存的试剂中,可加入0.025%的叠氮钠。所有试剂应该以大体积配制,然后分装成仅够一次使用的量进行贮存。

B.2.5 DNA模板或引物的离心管打开之前,要短暂离心,离心管不能用力崩开,以免产生气溶胶。

B.2.6 前PCR区中,最好能在PCR操作箱中加入PCR反应各组分。

B.2.7 实验前后,实验室用紫外线消毒以破坏残留的DNA。

B.2.8 可使用UDG和dUTP系统控制污染。

B.2.9 应遵循PCR操作的其他要求。



SN/T 2528-2010

书号:155066·2-20860

定价: 16.00 元