SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3196—2012

水产品中致病性弧菌检测 全自动病原菌检测系统筛选法

Determination of pathogenic vibrio in aquatic product—Automatic detection system for screening pathogenic bacteria

2012-05-07 发布　　2012-11-16 实施

中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局　发布

前　言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

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

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：中华人民共和国福建出入境检验检疫局、中华人民共和国湛江出入境检验检疫局、中华人民共和国上海出入境检验检疫局、中华人民共和国宁波出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：邵碧英、郑晶、陈彬、黄晓蓉、陈春梅、劳华军、张体银、吴谦。

水产品中致病性弧菌检测 全自动病原菌检测系统筛选法

1 范围

本标准规定了水产品中霍乱弧菌、副溶血性弧菌和创伤弧菌的筛选方法。

本标准适用于水产品中霍乱弧菌、副溶血性弧菌和创伤弧菌的快速筛选检测。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 4789.7 食品卫生微生物学检验 副溶血性弧菌检验

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 27403 实验室质量控制规范 食品分子生物学检测

SN/T 0173 进出口食品中副溶血性弧菌检验方法

SN/T 1022 进出口食品中霍乱弧菌检验方法

FDA/BAM Chapter 9 美国食品药品管理局 微生物学分析手册 第9章弧菌

NMKL No. 156 北欧食品协会 食品中致病性弧菌定性和定量检测方法

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

3.1 DNA(deoxyribonuleic acid)：脱氧核糖核酸

3.2 PCR(polymerase chain reaction)：聚合酶链式反应

4 原理

BAX 全自动病原菌检测系统是应用 PCR 技术来检测病原菌。反应所需的引物、DNA 聚合酶和脱氧核苷酸等被合并成为一个稳定、干燥的片剂，并装入 PCR 管中。每个 PCR 试剂片都包含有荧光染料，该染料能结合双链 DNA，并且受光激发后发出荧光信号。在检测过程中，BAX 系统通过测量荧光信号的变化，分析测量数据，从而进行结果判定。

5 试剂

5.1 实验用水应符合 GB/T 6682 中一级水的规格。

5.2 碱性蛋白胨水(APW)，参见 A.1。

5.3 BAX 系统霍乱弧菌/副溶血性弧菌/创伤弧菌的 PCR 检测试剂盒，2 ℃～8 ℃放置，参见 A.2。

6 仪器与设备

6.1 恒温培养箱:35 ℃±2 ℃。
6.2 冰箱:2 ℃～8 ℃。
6.3 均质器。
6.4 天平:感量 0.1 g。
6.5 超净工作台。
6.6 微量可调移液器及枪头:50 μL,200 μL。
6.7 BAX 全自动病原菌检测系统。

7 检测程序

致病性弧菌全自动病原菌检测系统筛选法的检测程序见图 1。

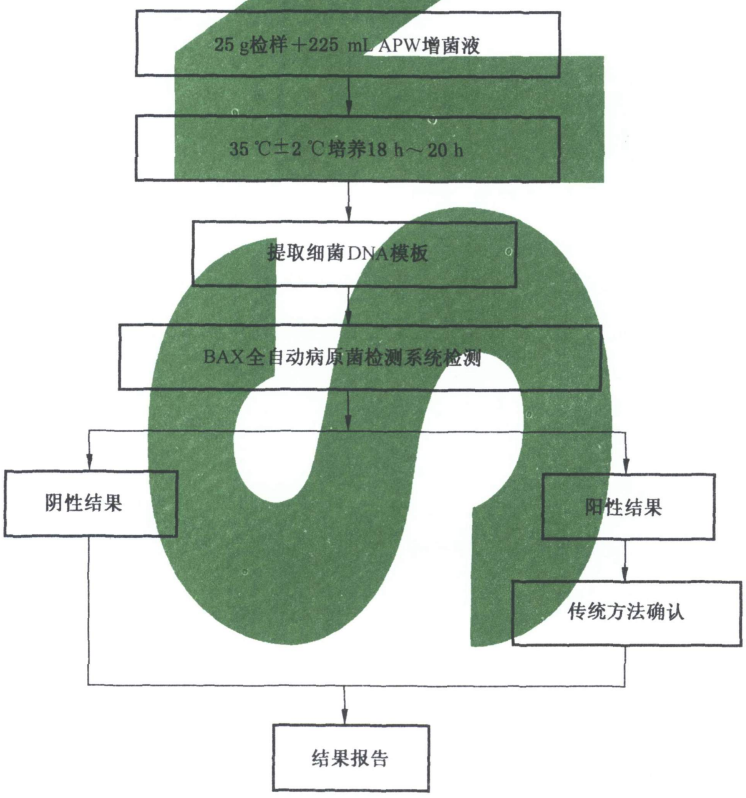


图 1 致病性弧菌全自动病原菌检测系统筛选法的检测程序

8 操作步骤

8.1 样品制备、增菌

8.1.1 称取检样 25 g,加入装有 225 mL 碱性蛋白胨水增菌液的广口瓶或均质袋内。固体样品应用均质器在 8 000 r/min～10 000 r/min 条件下均质,或用剪刀充分剪碎。

8.1.2 35 ℃±2 ℃培养 18 h～20 h。

8.2 细菌 DNA 模板的提取

8.2.1 打开加热槽，分别加热至 37 ℃±2 ℃和 95 ℃±3 ℃，检查冷藏过夜的冷却槽(4 ℃)。

8.2.2 在每个溶菌管中加入 200 μL 配制好的溶菌试剂(12 mL 裂解缓冲液中加 150 μL 蛋白酶)，加入 5 μL 增菌液，盖上盖子。

8.2.3 将溶菌管放在 37 ℃±2 ℃加热槽中，加热 20 min，再将溶菌管转移到 95 ℃±3 ℃加热槽中，加热 10 min；最后将溶菌管转移到冷却槽上，冷却 5 min。

8.2.4 剩余增菌肉汤或待鉴定菌株保存于 2 ℃～8 ℃，以备对阳性检测结果进行确认。

8.3 上机操作

8.3.1 开机并启动 BAX 系统软件，如果仪器自检后建议校正，按屏幕提示进行校正操作。

8.3.2 创建“rack”文件，根据提示在完整的“rack”文件和“个样”资料中输入样品信息。

8.3.3 加热循环仪/检测仪，从菜单中选择“RUNFULL PROCESS”，加热到设定温度(加热槽 90 ℃，盖子 100 ℃)。

8.3.4 将带药片的 PCR 八联管放入专用冷却槽内，移去管盖，将 30 μL 细菌 DNA 模板加入八联管中，盖上八联管盖。

8.3.5 在“Ready for Rack Load”提示框中，点击“NEXT”按钮。打开仪器托盘，将加完样的 PCR 八联管放入托盘中。关上托盘，点击“NEXT”按钮，仪器开始自动运行。

9 结果报告

9.1 绿色“－”表示阴性结果，红色“＋”表示阳性结果，黄色“?”表示不确定结果，黄色“!”表示错误结果。

9.2 检测结果阴性，根据检测项目，可直接报告 25 g(mL)样品中未检出霍乱弧菌、副溶血性弧菌和创伤弧菌。

9.3 检测结果阳性的样品，根据检出的弧菌种类，对保存于 2 ℃～8 ℃的增菌液或菌悬液进行确认。霍乱弧菌按照 SN/T 1022 或 FDA/BAM Chapter 9 或 NMKL No. 156 方法进行确认。副溶血性弧菌按照 GB/T 4789.7 或 SN/T 0173 或 FDA/BAM Chapter 9 或 NMKL No. 156 方法进行确认。创伤弧菌按照 FDA/BAM Chapter 9 或 NMKL No. 156 方法进行确认。

9.4 检测结果不确定或错误，对保存于 2 ℃～8 ℃的增菌液或菌悬液重新提取 DNA，上机检测。

10 防止污染的措施

检测过程中防止交叉污染的措施参照 GB/T 27403。

附 录 A
（资料性附录）
培养基和试剂盒

A.1 碱性蛋白胨水（APW）

A.1.1 成分

蛋白胨	10.0 g
氯化钠	10.0 g
蒸馏水	1 000 mL

A.1.2 制法

将上述各成分加热搅拌溶解，调 pH 至(8.5±0.2)，分装 225 mL 于 250 mL 广口瓶中，121 ℃高压灭菌 10 min。

A.2 BAX 系统霍乱弧菌/副溶血性弧菌/创伤弧菌的 PCR 检测试剂盒组成

A.2.1 PCR 片剂

2 袋，每个 PCR 管中一个片剂，12 个八联管。片剂包括检测反应和内置阳性对照反应所需的试剂（有了内置阳性对照不需另设质控反应）。

A.2.2 PCR 管盖

1 袋，12 个八联管盖。

A.2.3 裂解缓冲液

2 瓶，12 mL/瓶，pH 8.35+0.05(25 ℃)，用于制备溶菌试剂。

A.2.4 蛋白酶溶液

1 瓶，400 μL/瓶，用于制备溶菌试剂。