**编制说明**

**项目名称：动物垫料中肺炎克雷伯氏菌检测方法**

**项目编号： 内质监标函（2019）170号-2**

**编制单位： 呼和浩特海关**

**编制时间： 2019.5-2020.4**

**一、工作简况**

本标准根据《内蒙古自治区市场监督管理局关于下达2019年第一批内蒙古自治区地方标准制修订项目计划的通知》[内市监标准字〔2019〕170号]，本标准是由呼和浩特海关提出并归口，项目计划编号为2。呼和浩特海关牵头成立由相关领域的专业技术人员和具有标准化专业知识的人员组成的标准起草组。起草组在充分调查研究、综合分析和试验验证的基础上，起草标准初稿和编制说明，并广泛征求意见。对意见进行汇总整理，修改完善标准初稿，形成地方标准送审稿。

起草单位：中华人民共和国呼和浩特海关。主要起草人：王海艳、靳木子、赵治国、郝广福、敖威华、云华、崔强、陈林军、延涵、郭文秀、陈宇飞。

**二、标准制定的背景及意义**

**动物垫料与动物关系密切。**近年来随着生物科学研究的飞速发展，动物作为其研究中不可缺少的重要组成部分，备受各国政府的重视和科学家的关注。垫料是为动物营造舒适的人工环境，进行环境控制的基础条件和必要材料，是对动物产生直接作用和影响的环境因素。动物垫料与动物健康、福利息息相关，同时也对养殖业、动物及其相关科研方面甚至社会经济发展有十分重大的影响。因此，垫料的质量评定与控制非常必要。

**我国动物垫料标准化、商品化尚处于初级阶段。**欧美等发达国家早已实行垫料商品化生产，有专业的工厂，并且各道工序的质量要求非常严格。而我国对动物垫料的研究还处于初级阶段，与垫料相关的文献报道甚少，垫料生产监管环节薄弱，检测标准缺乏。近年来我国政府及从业人员逐渐认识到动物垫料中存在的问题，开始对垫料质量评价方面的问题进行改进。因此要想使动物的质量管理与国际接轨，动物垫料生产的标准化管理就变得至关重要。

**我国动物垫料标准化和质量管理相对滞后，影响相关行业发展。**我国对动物垫料的研究才刚刚起步，现行的国家标准和实验动物相关管理条例中，对动物垫料的标准化规定几乎空白，稀数资料对于垫料的规定只有：应选用吸湿性好、尘埃少、无异味、无毒性、无油脂的材料；须经消毒、灭菌后方可使用。如此笼统的规定在一定程度上制约了我国动物垫料标准不能紧跟国际标准，同时限制了药品、生物制品、动物等产品的出口，还使科研论文将不能被同行接受。因此要想提高相关学科竞争力，就必须加强垫料标准化和质量管理，从动物垫料微生物指标监测入手。

**我国动物垫料微生物检测标准几乎空白，亟待建立相关标准。**近年来，我国政府及从业人员逐渐认识到动物垫料对动物健康及下游产业的重大意义，垫料相关研究报道逐年增多，积累了一定的理论基础。但目前，我国尚未对国内垫料质量建立统一评价体系、风险分析、国家标准及配套法规。其中，垫料中微生物特别是致病微生物对动物健康、福利和产品等影响重大，但目前动物垫料中微生物检测标准属于空白，亟待建立科学完善的动物垫料微生物检测标准，该工作将对国内垫料建立统一质量评价体系、风险分析及产品标准等有力促进。

**动物垫料中肺炎克雷伯菌对动物的危害极大。**肺炎克雷伯菌是肠杆菌科克雷伯氏菌属中最为重要的一类菌（俗称肺炎杆菌），其所致疾病占克雷伯氏菌属感染的95%以上。肺炎克雷伯菌广泛分布于自然界，近年来成为仅次于大肠杆菌的最重要的条件致病菌,主要存在于人和动物肠道、呼吸道、泌尿生殖道，肺炎克雷伯菌可在全身各部位发生感染，但最高的发病率在尿路和呼吸道。当机体免疫力降低或长期大量使用抗生素导致菌群失调时可引起感染，引发肺炎、脑膜炎、肝脓肿、眼内炎、泌尿系统发炎、伤口感染、全身败血症等，给临床治疗带来了很大困难，发病死亡率极高,肺炎克雷伯菌是新生儿、免疫低下宿主、经外科途径感染的易感患者、糖尿病、肿瘤患者的主要危胁。肺炎克雷伯菌是医院获得性肺炎（HAP)的常见致病菌。马来西亚槟城肺炎克雷伯菌为医院获得性肺炎的第二大致病菌，占7.2%。我国肺炎克雷伯菌医院获得性肺炎发病率高，占3.33%,重症加强护理病房是肺炎克雷伯菌肺部感染的高发区，尤其是机械通气的患者，研究表明机械通气相关肺炎（VAP)发生率为9%-45%。南美发展中国家重症加强护理病房内肺炎克雷伯菌肺炎发病率高达27%,俄罗斯早产儿机械通气相关肺炎克雷伯菌检出率更高达31%,新生儿病区也易于发生和流行肺炎克雷伯菌肺炎。在我国台湾地区，造成化脓性肝脓肿的菌株中，以肺炎克雷伯菌最为常见。在糖尿病患者合并肝脓肿的致病菌株分析中发现，肺炎克雷伯菌占所有分离菌株的97%,而大肠杆菌与其他的肠内菌分别只占2%与1%。各种动物均可感染肺炎克雷伯菌，动物体内排出的肺炎克雷伯氏菌，可通过食物食物链传染给人，动物垫料中肺炎克雷伯氏菌对动物的危害极大，是影响动物健康和动物实验结果的国际公认的重要环境因素之一，因此动物垫料中肺炎克雷伯氏菌的检测十分重要。

**建立动物垫料肺炎克雷伯氏菌检测标准，保障动物健康急不可待。**动物垫料与动物粪便直接接触，容易滋生细菌，尤其是肠道致病微生物，致使垫料被肺炎克雷伯氏菌污染，从而威胁动物的健康与福利，并且对养殖业的发展与国际间动物及产品贸易带来巨大的影响，甚至威胁到人类社会的生产与生活。但是对于动物垫料肺炎克雷伯氏菌检测标准几乎空白，还没有统一的标准和方法，所以建立动物垫料肺炎克雷伯氏菌检测标准已刻不容缓。

本实验室具有多年微生物检测的经验，本方法的开发和应用，在检测技术方面填补我区的空白、弥补了自治区没有现行标准的不足，能够使动物垫料中肺炎克雷伯氏菌的检测更加高效、准确、安全。本方法的开发和应用将会使我区在动物垫料中肺炎克雷伯氏菌的检测先进性方面达到国内领先水平，为我区动物垫料质量安全管理部门更快更好的管控提供可靠保障。因此，加强动物垫料中肺炎克雷伯氏菌的检测对确保全区农业持续、健康发展具有重要的现实意义。

**三、主要起草过程**

2019.05-2019.07 地标前期基础工作：收集动物垫料样本，查阅肺炎克雷伯氏菌资料，检索肺炎克雷伯氏菌检测的相关文献及标准。

2019.08-2019.11 前期实验条件的摸索：包括前处理方法的优化、对照，不同垫料中肺炎克雷伯氏菌的检出率，最终确定实验方案，编写编制说明。

2019.12-2020.02 编写地标并定初稿并征求意见，验证单位进行验证。

2020.03 意见汇总并完善标准，完成标准送审稿送审。

**四、现行法律、法规和强制性标准的关系**

本标准遵循GB/T 1.1-2009 《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写》和GB/T 20001.4-2015 《标准编写规则 第4部分：试验方法标准》的规则编写。还参照相关国家标准编写指南的要求。

在编制本标准的过程中参考了以下标准：GB 14925-2010《实验动物环境及设施》、GB/T 14926.13-2001《实验动物脑炎克雷伯杆菌检测方法》、SN/T 1962-2007《食品中克雷伯氏菌检测方法》、SN/T 25529-2010《乳及乳制品卫生微生物学检验方法 第9部分：克雷伯氏菌检验》、SN/T 27548-2011《出口食品中数病菌环介导检温扩增（LAMP)检测方法》、SN/T 2206.3-2009《化妆品微生物检验方法 第3部分：肺炎克雷伯氏菌》；综合参考了现行与肺炎克雷伯杆菌检测相关的检测标准，力求该标准能够高效准确的检测垫料中脑炎克雷伯杆菌，同时兼顾标准的广泛应用。

本标准完全符合现行法律法规和强制性标准规定，不存在任何与现行法律法规和强制性标准相违背之处。相关强制性标准2项：GB 14925-2010 《实验动物 环境及设施》，本标准规定了实验动物及动物实验设备和环境的技术要求及检测方法，同时规定了垫料、饮水和笼具的原则要求。但针对垫料该标准仅规定了“垫料的材质应符合动物的健康和福利要求，应满足吸湿性好、尘埃少、无异味、无毒性、无油脂、耐高温、耐高压等条件；垫料必须经灭菌处理后方可使用” 。本地标适用于垫料中肺炎克雷伯氏菌检测，明确规定了不同类别垫料取样方法，标准中肺炎克雷伯氏菌鉴定过程增加了新的鉴定手段，确保检测结果更加准确。

1. **主要内容及检测方法的确定**

**5.1** **取样方法的确定及优化**

根据动物垫料的物理性状将其分为颗粒状/粉末状垫料和平面状垫料，针对不同性状的垫料采取不同的取样方法。

**5.1.1 颗粒状或粉末垫料样品取样方法**

国内外食品和饲料中肺炎克雷伯氏菌检测法中常用的取样方法为称取法，本标准中针对颗粒状或粉末垫料样品（木屑、玉米芯、秸秆、纸屑等）参考通用做法采用称取25 g的方法进行取样。

**5.1.2 平面垫料样品取样方法**

针对平面垫料（胶垫、托盘等）采用表面涂抹取样法，无菌操作将涂抹25 cm2～100 cm2平面样品的棉拭子置入装有 25 mL～100 mL 无菌0.85 %生理盐水中，混匀作为原液。

**5.2 培养基的选择**

**5.2.1 选择性增菌培养基**

国内外标准和资料中用到的选择性增菌培养基主要有：SCDLP液体培养基和肠杆菌增菌肉汤（EE肉汤）。SCDLP液体培养基是肺炎克雷伯氏菌检测法中常用的培养基，且是一步增菌法；肠杆菌增菌肉汤（EE肉汤）主要用于食品样品克雷伯氏菌属细菌的检验，是在预增菌之后使用，目的是使食品加工生产过程中亚致死损伤的细菌得到修复；而垫料中的细菌损伤程度没有食品加工生产中细菌的损伤程度大，无需预增菌修复，因此为操作简单方便，本标准采用选用SCDLP液体培养基进行选择性增菌。

**5.2.2 分离培养基**

本标准选用的肺炎克雷伯氏菌分离培养基为目前现行标准通用的胆硫乳琼脂（DHL)，保证检测结果的同时，兼顾所用培养基的一致性，节约实验室成本。

**5.3 典型或可疑菌落的鉴定**

本标准对典型或可疑菌落的鉴定过程，参考了现行肺炎克雷伯氏菌检测标准等成熟做法，综合了生化反应等必要鉴定过程，并囊括了全自动微生物检测系统快速方法，增加了飞行时间质谱检测方法，做到了与国际接轨，缩短检测时间，增加检测通量，减少检测人员工作量。

**5.4 培养时间和温度**

本标准将继续采用我国常用的36 ℃±1 ℃对肺炎克雷伯氏菌进行检测培养。培养基培养时间也与现行标准相统一。

**5.5 其他**

本标准增加了肺炎克雷伯氏菌检测常用培养基保存期限与保存方式，对检测人员具有实际指导意义，确保检测结果质量。

**六、方法验证**

为验证本方法的有效性和适用性，选择5家不同行业的检测机构对本方法进行验证，验证内容为方法的适用性、准确度、检出率及相关样品的检测，结果显示该方法稳定可靠，符合相关要求。

**七、结论**

综上所述，本标准在制定过程中所涉及到的各项技术指标均经过方法学的验证，并切实可行，完全达到了编制标准的要求。

**八、重大意见分歧的处理依据和结果**

未发生。

**九、国内外情况简要说明**

国内尚没有建立统一的标准检测方法。检索国家标准1项和地方标准2项：GB 14925-2010 《实验动物 环境及设施》、江苏省地方标准DB32/T 2129-2012 《实验动物 垫料》、北京市地方标准DB11/T 1126-2014《实验动物 垫料》。

根据文献报道尚未发现内蒙古自治区内有相关单位从事这项研究。

1. **标准草稿征求意见情况汇总表**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 序号 | 意见 | 提出单位/专家 | 采纳 | 不采纳（说明原因） |
| 1 | 建议在标准适当位置增加检测流程图 | 包头海关技术中心（原包头出入境检验检疫局技术中心）/张鹏翔 | 采纳 |  |
| 2 | 建议将附录A培养基和试剂配制中每种成分的数量单位靠后对齐。 | 赤峰海关技术中心（原赤峰出入境检验检疫局技术中心）/曹旭 | 采纳 |  |
| 3 | 建议文中数量和单位之间空一格 | 兰州海关技术中心（原甘肃出入境检验检疫局技术中心）/张宇霞 | 采纳 |  |
| 4 | 建议按照《标准编写规则》的要求修改标准格式。 | 二连浩特海关技术中心（原二连浩特出入境检验检疫局技术中心）/杨帆 | 采纳 |  |
| 5 | 无修改建议。 | 满洲里海关技术中心（原满洲里出入境检验检疫局技术中心）/杨东来 |  |  |

**参考文献：**

[1] GB/T 1.1-2009, 标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写规则[S].

[2] GB/T 20001.4-2015, 标准编写规则 第4部分：试验方法标准[S].

[3] GB 14925-2010, 实验动物 环境及设施[S].

[4] GB/T 14926.13-2001,实验动物脑炎克雷伯杆菌检测方法[S].

[5] SN/T1962-2007 , 食品中克雷伯氏菌检测方法[S].

[6] SN/T 25529-2010, 乳及乳制品卫生微生物学检验方法 第9部分：克雷伯氏菌检验[S].

[7] SN/T 27548-2011, 出口食品中数病菌环介导检温扩增（LAMP)检测方法[S].

[8] SN/T 2206.3-2009, 化妆品微生物检验方法 第3部分：肺炎克雷伯氏菌[S].

[9] DB32/T 2129-2012, 实验动物 垫料[S].

[10] DB11/T 1126-2014, 实验动物 垫料[S].