ICS 07.100.99

B 41

|  |
| --- |
|  |

DB15

内蒙古自治区地方标准

DB 15/T XXXXX—XXXX

|  |
| --- |
|  |

动物垫料中肺炎克雷伯氏菌检测方法

Method of detection for Klebsiella pneumonia in animal bedding

点击此处添加与国际标准一致性程度的标识

|  |  |
| --- | --- |
|  |  |

XXXX - XX - XX发布

XXXX - XX - XX实施

内蒙古自治区市场监督管理局   发布

前  言

本标准按照GB/T 1.1-2009给出的规则起草。

本标准由中华人民共和国呼和浩特海关提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国呼和浩特海关。

本标准主要起草人：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。

动物垫料中肺炎克雷伯氏菌检测方法

1. 范围

本标准规定了动物垫料中肺炎克雷伯氏菌的分离鉴定定性检测法。

本标准适用于动物垫料中肺炎克雷伯氏菌定性检测。

1. 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 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

GB/T 33682 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱鉴别微生物方法通则

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

1. 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

动物垫料 animal bedding

用于吸收动物排泄物，使动物保持舒适生活环境的铺垫物。包括动物笼内非直接与动物机体接触的铺垫物。

4 设备和材料

4.1 冰箱：2 ℃～5 ℃。

4.2 恒温培养箱：36 ℃±1 ℃。

4.3 均质器。

4.4 漩涡振荡器。

4.5 电子天平：感量0.1 g。

4.6 全自动微生物生化鉴定系统。

4.7 飞行时间质谱仪。

4.8 二级生物安全柜。

4.9 显微镜：10 ～100 倍。

4.10 水浴装置：36 ℃±1 ℃。

4.11 pH 计。

4.12 无菌锥形瓶：容量500 mL，250 mL。

4.13 无菌吸管：1 mL(具0.01 mL刻度)、10 mL(具0.1 mL刻度)或微量移液器及吸头。

4.14 无菌培养皿：15 mm×90 mm。

4.15 无菌试管：18 mm×180 mm。

4.16 无菌棉签。

4.17 无菌镊子。

4.18 无菌剪刀。

4.19 无菌勺。

4.20 无菌玻片。

4.21 无菌接种环。

5 培养基和试剂

5.1 实验用水：符合GB/T 6682的要求。

5.2 SCDLP液体培养基：见附录 A 中 A.2。

5.3 胆硫乳琼脂（DHL)：见附录 A 中 A.3。

5.4 营养琼脂培养基：见附录 A 中 A.4。

5.5 革兰氏染色液：见附录 A 中 A.5。

5.6 动力半固体琼脂：见附录 A 中 A.6。

5.7 氧化酶试剂：见附录 A 中 A.7。

5.8 无菌0.85 %生理盐水：见附录 A 中 A.8。

5.9 生化鉴定试剂盒或生化鉴定卡。

5.10 飞行质谱仪靶板。

5.11 肺炎克雷伯氏菌肺炎亚种 ATCC 35657或等效菌株。

6 检验程序

肺炎克雷伯氏菌检验程序见图1。

样品制备

样品稀释液

检样25 g或25 cm2样液+225 mL SCDLP增菌

划线接种DHL琼脂平板

挑取可疑菌落接种动力半固体琼脂和营养琼脂

革兰氏染色镜检/氧化酶试验

确定鉴定

36 ℃±1 ℃，18 h～24 h

36 ℃±1 ℃，18 h～24 h

36 ℃±1 ℃，18 h～24 h

生化鉴定和/或全自动检测设备鉴定

报 告

1. 肺炎克雷伯氏菌检验程序

7 操作步骤

7.1 采样和增菌

7.1.1 采样原则

样品采集应遵循随机性、代表性的原则。采样过程遵循无菌操作程序，防止一切可能的外来污染。

7.1.2 颗粒状或粉末样品

对送检样品包装内不同部位样品进行随机多点取样至少250 g，充分混匀后称取25 g颗粒状或粉末状垫料样品，加入225 mL SCDLP，充分振摇或均质1 min～2 min，置36 ℃±1 ℃培养18 h～24 h进行增菌。

7.1.3 平面样品

无菌操作将灭菌规格板（5 cm🞨5 cm）放在平面垫料表面，用浸有无菌稀释液（无菌0.85 %生理盐水）的棉拭子，在规格板内来回均匀涂抹整个方格 3 次，并随之转动棉拭子，然后用灭菌剪刀剪去棉拭子与手接触的部分，将棉拭子头置入装有 25 mL无菌稀释液（无菌0.85 %生理盐水）的无菌锥形瓶中，根据样品面积大小重复取样1～4个规格板面积，相应地将棉拭子头置入25 mL～100 mL的无菌稀释液（无菌0.85 %生理盐水）中，充分振摇制成样品原液（1 mL原液对应的样品面积为1 cm2）。取25 mL样品原液加入225 mL SCDLP，充分振摇或均质1 min～2 min，置36 ℃±1 ℃培养18 h～24 h进行增菌。

表1 不同面积平面类垫料样品采样量

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 样品面积  m2 | 采样量  cm2 | 规格板数 |
| 小于0.25（含） | 25 | 1 |
| 0.25～0.5（含） | 50 | 2 |
| 0.5～0.75（含） | 75 | 3 |
| 大于0.75 | 100 | 4 |

7.2 分离培养

将增菌液划线接种DHL琼脂平板，36 ℃±1 ℃培养 18 h～24 h，观察菌落形态。在DHL平板上肺炎克雷伯氏菌菌落呈淡粉红色，大而隆起，光滑湿润，粘液状，相邻菌落容易融合成脓汁样，接种针挑取菌落时呈丝状粘连。

7.3 鉴定

7.3.1 分纯培养

挑取5个（如小于5个则全选）可疑菌落分别接种到营养琼脂平板，36 ℃±1 ℃培养 18 h～24 h。

7.3.2 革兰氏染色镜检

挑取营养琼脂平板上培养的可疑菌落染色镜检。肺炎克雷伯氏菌为革兰氏染色阴性短杆菌,单个、成双或成短链排列，有荚膜。

7.3.3 动力试验

挑取营养琼脂平板上培养的可疑菌落穿刺于动力半固体琼脂，36 ℃±1 ℃培养 18 h～24 h。肺炎克雷伯氏菌无动力。

7.3.4 氧化酶试验

挑取营养琼脂平板上培养的可疑菌落进行氧化酶试验。肺炎克雷伯氏菌氧化酶试验阴性。

7.3.5 生化鉴定

挑取纯培养的菌落进行肺炎克雷伯氏菌生化鉴定，具体操作依据肺炎克雷伯氏菌生化鉴定试剂说明书进行。

表2 肺炎克雪伯氏菌生化特性

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 试验项目 | 肺炎克雷伯氏菌肺炎亚种 | 肺炎克雷伯氏菌臭鼻亚种 | 肺炎克雷伯氏菌鼻硬结亚种 |
| 尿素酶 | + | d | - |
| 靛基质 | - | - | - |
| MR | -/+ | + | + |
| VP | + | - | - |
| 西蒙氏构橡酸盐 | + | d | - |
| D-酒石酸盐 | +/- | -/+ | - |
| 丙二酸盐 | + | - | + |
| ONPG | + | + | - |
| 赖氨酸脱羚酶 | + | d | - |
| 分解葡萄糖产气 | + | d | - |
| 乳糖 | + | d | - |
| 卫矛醇 | -/+ | - | - |
| 注：“+”≥90 %阳性，“+/-”75-88 %阳性，“d”为不定，“一/+”75-89 %阴性，“一”≥90 %阴性。 | | | |

7.3.6 辅助设备鉴定

根据实验室情况，可选用全自动微生物生化鉴定系统或飞行时间质谱仪等对典型或可疑菌落进行鉴定，具体操作依据设备操作规范和标准GB/T 33682进行。

8 结果与报告

8.1 经生化鉴定和/或全自动生化鉴定系统鉴定或飞行质谱仪鉴定为阳性的样品，报告每 25 g（cm2）动物垫料样品中检出肺炎克雷伯氏菌。

8.2 经生化鉴定和/或全自动生化鉴定系统鉴定或飞行质谱仪鉴定为阴性的样品，报告每 25 g（cm2）动物垫料样品中未检出肺炎克雷伯氏菌。

9 生物安全措施

为了保护实验室人员安全，应由具备资格的工作人员检测致病菌，所有培养物应小心处置，应按照GB 19489 的有关规定执行。

10 废弃物处理和防治污染的措施

检测过程中的废弃物需经121 ℃高压灭菌处理至少30 min后再弃置。

1. （规范性附录）  
   培养基和试剂

A.1 培养基制备及质量保证

按照SN/T 1538.1和SN/T 1538.2执行，并对制备好的培养基进行性能测试，如使用等效的脱水合成培养基，使用前对其进行验收并按其说明书使用。

A.2 SCDLP液体培养基

A.2.1 成分

胰蛋白胨 17.0 g

大豆蛋白胨 3.0 g

氯化钠 5.0 g

磷酸二氢钾（无水） 2.5 g

葡萄糖 2.5 g

卵磷脂 1.0 g

吐温-80 7.0 g

蒸馏水 1000.0 mL

A.2.2 制法

将卵磷脂在400 mL蒸馏水中加热至完全溶解，再将其他成分混合加人600 mL蒸馏水中，加热完全溶解。将上述两种溶液混合后，充分搅拌均匀。调pH为7.2～7.3分装，121 ℃ 20 min高压灭菌。注意振荡，使沉淀于底层的吐温-80充分混合，待冷却至25 ℃左右使用。

A.3 胆硫乳琼脂（DHL)

A.3.1 成分

蛋白胨 20.0 g

牛肉膏 3.0 g

乳糖 10.0 g

蔗糖 10.0 g

牛胆盐 1.0 g

硫代硫酸钠 2.2 g

柠檬酸钠 1.0 g

柠檬酸铁馁 1.0 g

中性红 0.03 g或5 g/L水溶液 6 mL

琼脂 18.0 g～20.0 g

蒸馏水 1000 mL

A.3.2 制法

除中性红和琼脂外，将其他成分加人100 mL蒸馏水中，搅拌均匀，静置约10 min,加热煮沸至完全溶解，调pH为7.3土0.1，再将琼脂加人600 mL蒸馏水中，搅拌均匀，静置约10 min,加热煮沸至完全溶解。将两种溶液混合后，再加入5 g/L中性红水溶液6 mL,搅拌均匀，待冷却至50 ℃～55 ℃，倾注平皿备用。

A.4 营养琼脂

A.4.1 成分

蛋白陈 10.0 g

牛肉膏 3.0 g

氯化钠 5.0 g

琼脂 15.0 g

蒸馏水 1000 mL

A.4.2 制法

将各成分溶于蒸馏水中，加热溶解，校正pH至7.2～7.4，121 ℃灭菌15 min，待冷却至50 ℃～55 ℃，倾注平皿备用。

A.5 革兰氏染色液

A.5.1 结晶紫染色液基础培养基

A.5.1.1 成分

结晶紫 1.0 g

95%乙醇 20.0 mL

1 %草酸铵水溶液 80.0 mL

A.5.1.2 制法

将结晶紫完全溶解于乙醇中，然后与草酸铵溶液混合。

A.5.2 革兰氏碘液

A.5.2.1 成分

碘 1.0 g

碘化钾 2.0 g

蒸馏水 300.0 mL

A.5.2.2 制法

将碘与碘化钾先进行混合，加入蒸馏水少许充分振摇，待完全溶解后，再加蒸馏水至 300 mL。

A.5.3 沙黄复染液

A.5.3.1 成分

沙黄 0.25 g

95 %乙醇 10.0 mL

蒸馏水 90.0 mL

A.5.3.2 制法

将沙黄溶解于乙醇中，然后用蒸馏水稀释。

A.5.4 染色操作步骤

将涂片在酒精灯火焰上固定，滴加结晶紫染色液，染1 min，水洗；滴加革兰氏碘液，作用1 min，

水洗；滴加 95 %乙醇脱色，约15 s～30 s，直至染色液被洗掉，不要过分脱色，水洗；滴加复染液，复染1 min，水洗后进行干燥，镜检。

A.6 动力半固体琼脂

A.6.1 成分

胰蛋白陈 10.0 g

氯化钠 5.0 g

琼脂 5.0 g

蒸馏水 1000 mL

A.6.2 制法

将各成分加入蒸馏水中，加热溶解，调节pH至7.3土0.1,分装18 mm×180 mm试管，121 ℃高压灭菌15 min,制成半固体高层。

A.7 氧化酶试验试剂

A.7.1 成分

四甲基对苯二胺 1.0 g

蒸馏水 100 mL

A.7.2 制法

将四甲基对苯二胺溶于蒸馏水即可，现用现配。若装入棕色瓶中，放置于2 ℃～8 ℃冰箱保存，可在配制后7 d内使用。

A.8 无菌0.85 %生理盐水

A.8.1 成分

氯化钠 8.5 g

蒸馏水 1000 mL

A.8.2 制法

氯化钠加入1000 mL蒸馏水中，搅拌至完全溶解，分装后，121 ℃灭菌15 min，备用。

附 录 B

（资料性附录）  
肺炎克雷伯氏菌常用培养基与试剂灭菌后保存期限

表B.1 肺炎克雷伯氏菌常用培养基与试剂灭菌后保存期限

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 名 称 | 保存期限 | 保存条件 |
| SCDLP液体培养基 | 6 个月 | 5 ℃ |
| 胆硫乳琼脂（DHL) | 4 周 | 5 ℃，防干燥 |
| 营养琼脂培养基 | 4 周 | 5 ℃，防干燥 |
| 动力半固体琼脂 | 4 周 | 5 ℃，防干燥 |