

ICS 11.220

CCS B 41

# DB 6501

乌鲁木齐市地方标准

DB 6501/T 044—2023

## 动物源肺炎克雷伯菌检验

Examination of *Klebsiella pneumoniae* of animal origin

2023 - 05 - 25 发布

2023 - 06-01 实施

乌鲁木齐市市场监督管理局 发布



## 目 次

前言 .....	III
1 范围 .....	1
2 规范性引用文件 .....	1
3 术语和定义 .....	1
4 设备和材料 .....	1
5 培养基和试剂 .....	2
5.1 要求 .....	2
5.2 培养基 .....	2
5.3 试剂 .....	2
6 标准菌株 .....	2
7 生物安全要求 .....	3
8 样品采集与保存运输 .....	3
8.1 鼻拭子、直肠/泄殖腔拭子 .....	3
8.2 生鲜乳样品 .....	3
8.3 组织样品 .....	3
9 检验程序 .....	3
10 增菌 .....	4
11 分离纯化 .....	4
12 革兰氏染色镜检 .....	4
13 鉴定 .....	4
13.1 生化鉴定 .....	4
13.2 质谱鉴定 .....	5
13.3 PCR 鉴定 .....	5
14 结果与报告 .....	6
15 菌株保藏 .....	6
附录 A (规范性) 培养基和试剂 .....	7
A.1 营养肉汤 (NB) .....	7
A.2 麦康凯肌醇阿东醇羧苄青霉素琼脂 (MIAC) .....	7
A.3 营养琼脂 (NA) .....	7
A.5 羧苄青霉素 .....	8
A.6 氧化酶试验试剂 .....	8
A.7 无菌 0.85 %生理盐水 .....	8
A.8 5%蔗糖脱脂乳保护剂 .....	8

附录 B（资料性） 肺炎克雷伯菌 Khe 基因 PCR 扩增目标片段测序序列..... 10

## 前 言

本文件按照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》的规定起草。

本文件由乌鲁木齐市动物疾病控制与诊断中心提出。

本文件由乌鲁木齐市农业农村局（乌鲁木齐市乡村振兴局）归口并组织实施。

本文件起草单位：乌鲁木齐市动物疾病控制与诊断中心、新疆农业大学动物医学学院、新疆畜牧科学院兽医研究所（新疆畜牧科学院动物临床医学研究中心）、乌鲁木齐市疾病预防控制中心、新疆农业科学院农业质量标准与检测技术研究所、乌鲁木齐市米东区畜牧兽医站、乌鲁木齐市米东区三道坝镇农业畜牧业发展服务中心、乌鲁木齐县畜牧兽医站、乌鲁木齐市达坂城区畜牧兽医站、新疆中科基因科技有限公司。

本文件主要起草人：蔡扩军、夏俊、陈国利、赵红琼、王兵、徐敏、王涛、杨毅、韩海燕、吴星星、任皓、贾立敏、周继萍、尚月梅、杨艳梅、马佳妮、马卫平、李建玲、李兆新、姜玉婷、王六合、吾斯曼·吾曼尔、赵艳坤、陈贺、彭华刚、方新元、贾伟、帕提玛·努合曼、李丽、陈懿、马晓燕、赵文年、齐姗姗、宋震宇、赵春山。

本文件实施应用中的疑问，请咨询乌鲁木齐市动物疾病控制与诊断中心。

对本文件的修改意见建议，请反馈至乌鲁木齐市动物疾病控制与诊断中心（乌鲁木齐市南湖西路15号）。

乌鲁木齐市动物疾病控制与诊断中心 联系电话：0991-4643100；传真：0991-4668587；邮编：830063



# 动物源肺炎克雷伯菌检验

## 1 范围

本文件规定了动物源肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)检验的设备和材料、培养基和试剂、标准菌株、生物安全要求、样品采集与保存运输、检验程序、增菌、分离纯化、革兰氏染色镜检、鉴定、结果与报告、菌株保藏等技术要求。

本文件适用于动物鼻拭子、直肠/泄殖腔拭子、生鲜乳、组织等样品中肺炎克雷伯菌的检验。

## 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）适用于本文件。

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

#### 肺炎克雷伯菌 *Klebsiella pneumoniae*

肺炎克雷伯菌属肠杆菌科克雷伯氏菌属，为革兰氏染色阴性的粗短杆菌，大小 $0.5\ \mu\text{m}\sim 0.8\ \mu\text{m}\times 1\ \mu\text{m}\sim 2\ \mu\text{m}$ ，单个、成双或短链状排列，无芽胞，无鞭毛，不运动，有明显荚膜。该菌广泛存在于自然界、人和动物的肠道、上呼吸道，是重要的人畜共患条件性致病菌，耐药性较强，可引起肺炎、脑膜炎，尿路感染、肝脓肿、败血症、奶牛乳房炎等感染性疾病。肺炎克雷伯菌有三个亚种，分别为肺炎亚种、臭鼻亚种、鼻硬结亚种，其中肺炎亚种危害最为严重。

## 4 设备和材料

- 4.1 冰箱： $2\ ^\circ\text{C}\sim 8\ ^\circ\text{C}$ ， $-20\ ^\circ\text{C}$ 或以下；
- 4.2 恒温培养箱： $36\ ^\circ\text{C}\pm 1\ ^\circ\text{C}$ ；
- 4.3 电子天平：感量  $10\ \text{mg}$ ；
- 4.4 全自动微生物生化鉴定系统；
- 4.5 基质辅助激光解吸飞行时间质谱仪（MALDI-TOF-MS）；
- 4.6 PCR 仪；
- 4.7 二级生物安全柜；
- 4.8 显微镜；
- 4.9 核酸电泳仪：配水平电泳槽；
- 4.10 电泳凝胶成像分析系统；

- 4.11 高压灭菌器；
- 4.12 电热炉；
- 4.13 pH 计或精密 pH 试纸。
- 4.14 微量移液器
- 4.15 菌种冷冻保存管或磁珠保存管；
- 4.16 无菌吸管或移液器吸头；
- 4.17 无菌培养皿；
- 4.18 无菌试管或离心管；
- 4.19 无菌采样袋；
- 4.20 其他微生物实验室常规设备及材料。

## 5 培养基和试剂

### 5.1 要求

除另有规定外，所有试剂均为分析纯，水为符合GB/T 6682规定的三级水，培养基按附录A配制或用商品化产品。

### 5.2 培养基

- 5.2.1 营养肉汤（NB）：见附录 A.1，商品化培养基则按说明书配制；
- 5.2.2 麦康凯肌醇阿东醇羧苄青霉素琼脂（MIAC）：见附录 A.2，商品化培养基则按说明书配制；
- 5.2.3 营养琼脂：见附录 A.3，商品化培养基则按说明书配制；
- 5.2.4 半固体琼脂：见附录 A.4，商品化培养基则按说明书配制；

### 5.3 试剂

- 5.3.1 羧苄青霉素：见附录 A.5，商品化羧苄青霉素溶液则按说明书配制；
- 5.3.2 革兰氏染色液：商品化革兰氏染色液套装；
- 5.3.3 生化鉴定卡（全自动微生物生化鉴定系统用）或商品化生化鉴定试剂；
- 5.3.4 基质液（飞行时间质谱仪用）：取  $\alpha$ -氰-4-羟基肉桂酸(HCCA)，按说明书配制溶液；或用市售商品；
- 5.3.5 氧化酶试剂：见附录 A.6；
- 5.3.6 0.85%生理盐水：见附录 A.7；
- 5.3.7 5%蔗糖脱脂乳保护剂：见附录 A.8；
- 5.3.8 聚合酶链式反应预混液（2×PCR Master Mix）；
- 5.3.9 TAE 缓冲液；
- 5.3.10 琼脂糖；
- 5.3.11 甘油；
- 5.3.12 碘伏。

## 6 标准菌株

肺炎克雷伯菌 ATCC 700603。



## 7 生物安全要求

实验室设施设备、人员防护、实验安全操作、实验废弃物及菌株处理应符合GB19489的要求。

## 8 样品采集与保存运输

### 8.1 鼻拭子、直肠/泄殖腔拭子

取灭菌棉签，分别插入动物鼻腔、直肠、泄殖腔，边擦拭边旋转慢慢取出，迅速放入盛有5 mL~10 mL营养肉汤培养基的离心管中。0 °C~4 °C保存、运输，不宜超过24 h。

### 8.2 生鲜乳样品

#### 8.2.1 个体样品

先用碘伏擦拭消毒动物乳头及周边，弃前3把乳汁，挤取10 mL~20 mL乳汁于无菌容器。0 °C~4 °C保存、运输，不宜超过24 h。若超过24 h，-20 °C冷冻保存、运输。

#### 8.2.2 混合样品

灼烧储奶罐出料口，打开出料阀，弃去前段生鲜乳，接取10 mL~20 mL于无菌容器。0 °C~4 °C保存、运输，不宜超过24 h。若超过24 h，-20 °C冷冻保存、运输。

### 8.3 组织样品

无菌操作取动物组织，置于无菌采样袋或其他无菌密闭容器。0 °C~4 °C保存、运输，不宜超过24 h。若超过24 h，-20 °C冷冻保存、运输。

## 9 检验程序

肺炎克雷伯菌检验程序见图1。

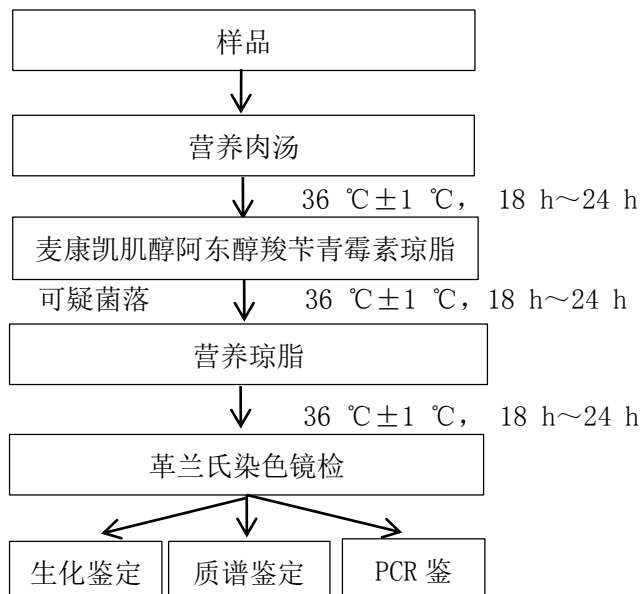




图1 肺炎克雷伯菌检验程序

## 10 增菌

鼻拭子、直肠/泄殖腔拭子样品运输至实验室后在 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h；生鲜乳样品摇匀后取液体乳样1 mL~2 mL加入盛有5 mL~10 mL营养肉汤培养基的试管中， $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h；组织样品取内部组织1 g~2 g放入盛有5 mL~10 mL营养肉汤培养基的试管中， $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h。

## 11 分离纯化

将增菌液划线接种麦康凯肌醇阿东醇羧苄青霉素琼脂平板， $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h。观察平板菌落形态，肺炎克雷伯菌呈圆形、凸起、湿润、光滑的红色大菌落，有沉淀环。挑取可疑菌落接种到营养琼脂平板， $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h。

## 12 革兰氏染色镜检

挑取营养琼脂平板上培养的纯化菌落进行革兰氏染色镜检。肺炎克雷伯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。符合镜检特征的可疑菌落进行下一步鉴定。

## 13 鉴定

生化鉴定、质谱鉴定、PCR鉴定3种方法任选其一。

### 13.1 生化鉴定

挑取纯培养的菌落进行肺炎克雷伯菌生化鉴定，全自动微生物生化鉴定系统或手工操作生化鉴定试剂（表1）均按其说明书进行操作和结果判定。

表1 肺炎克雷伯菌生化特性

试验项目	肺炎克雷伯菌肺炎亚种	肺炎克雷伯菌臭鼻亚种	肺炎克雷伯菌鼻硬结亚种
动力试验	-	-	-
氧化酶试验	-	-	-
尿素酶	+	d	-
MR	-	+	+
VP	+	-	-
西蒙氏枸橼酸盐	+	d	-

试验项目	肺炎克雷伯菌肺炎亚种	肺炎克雷伯菌臭鼻亚种	肺炎克雷伯菌鼻硬结亚种
D-酒石酸盐	d	-	-
丙二酸盐	+	-	+
ONPG	+	+	-
赖氨酸脱羧酶	+	d	-
分解葡萄糖产气	+	d	-
乳糖	+	d	-
卫矛醇	d	-	-
靛基质	-	-	-

注：“+” ≥90 %阳性，“+/-” 75 %~88 %阳性，“d”为不定，“-/+” 75 %~89 %阴性，“-” ≥90 %阴性。

## 13.2 质谱鉴定

### 13.2.1 菌样制备

从培养基上挑取合适的菌量转移至靶板上相应的靶点位置，使用一次性接种环或无菌竹签轻轻涂抹，使菌苔在靶点上形成一层均匀的薄膜(菌量太多或太少影响鉴定结果)，室温干燥。吸取 1 μL 基质溶液滴于样品上，混匀，室温干燥。

### 13.2.2 仪器校准

检测样品前，应对飞行时间质谱仪进行校准。

### 13.2.3 测定

取制备好的样品靶板，置质谱仪靶板中，编辑样品信息后，进行谱图的数据采集。

### 13.2.4 结果判定

质谱仪自动完成谱图的比对和鉴定，以不同颜色、不同分值显示结果，菌株鉴定位点显示绿色，鉴定分值达到种水平可信即可。肺炎克雷伯菌标准菌株质谱鉴定谱图见附录 B.1。

## 13.3 PCR 鉴定

### 13.3.1 模板制备

取新鲜菌落，加灭菌水0.5 mL，煮沸10 min，冷却，12 000 r/min离心2 min。取上清液，备用。肺炎克雷伯菌标准菌株作为阳性对照，水为阴性对照。

### 13.3.2 引物

针对肺炎克雷伯菌溶血毒素基因(khe)，引物序列为上游 5' -TGATTGCATTCGCCACTGG-3'，下游 5' -GGTCAACCAACGATCCTG-3'，扩增长度428 bp。

### 13.3.3 扩增

PCR反应体系（25 μL）：2×PCR master Mix 12.5 μL，上游引物（10 μmol/L）0.5 μL，下游引物（10 μmol/L）0.5 μL，水10.5 μL，模板1 μL。PCR反应条件：95 °C 5 min；95 °C 30 s，60 °C 30 s，72 °C 30 s，35个循环；72 °C 10 min，扩增结束后 4 °C 保存。

#### 13.3.4 电泳

取PCR扩增产物，于2%的琼脂糖凝胶中电泳，凝胶成像分析。

#### 13.3.5 结果判定

扩增条带符合428 bp，应将扩增产物测序，并将测定的序列通过NCBI/BLAST 工具 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行序列比对，根据比对结果确定是否为肺炎克雷伯菌。

### 14 结果与报告

根据检验结果报告样品中检出或未检出肺炎克雷伯菌。

### 15 菌株保藏

取新鲜纯化菌，加无菌生理盐水制成菌悬液，与灭菌甘油溶液混合，使甘油终浓度为20%~40%；或加入磁珠保藏管；或加入5%蔗糖脱脂乳保护剂，冻干。-20 °C或以下保藏。

**附录 A**  
**(规范性)**  
**培养基和试剂**

**A.1 营养肉汤 (NB)****A.1.1 成分**

蛋白胨	10.0 g
牛肉浸粉	3.0 g
氯化钠	5.0 g
水	1000 mL

**A.1.2 制法**

将A.1.1成分溶解于水中,调节pH值至 $7.2 \pm 0.2$  (25 °C), 121 °C高压灭菌15 min, 备用。

**A.2 麦康凯肌醇阿东醇羧苄青霉素琼脂 (MIAC)****A.2.1 成分**

蛋白胨	20.0 g
肌醇	5.0 g
阿东醇	5.0 g
氯化钠	5.0 g
猪胆盐	5.0 g
琼脂	15.0 g
中性红	0.05 g
结晶紫	0.001 g
水	1000 mL

**A.2.2 制法**

将A.2.1成分加热溶解于水中,调节pH值至 $7.1 \pm 0.2$  (25 °C), 115 °C高压灭菌 15 min, 冷至 50 °C左右时, 每 200 mL 培养基中加入20 mg羧苄青霉素溶液, 混匀, 倾入无菌平皿, 备用。

**A.3 营养琼脂 (NA)****A.3.1 成分**

蛋白胨	10.0 g
牛肉粉	3.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0 g
水	1000 mL

**A.3.2 制法**

将A.3.1成分加热溶解于水中,调节pH值至 $7.3 \pm 0.1$  (25 °C), 121 °C高压灭菌15 min, 备用。

#### A.4 半固体琼脂

##### A.4.1 成分

胰蛋白胨	10.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	5.0 g
水	1000 mL

##### A.4.2 制法

将A.4.1加热溶解于水中，调节pH至 $7.4 \pm 0.1$ ，分装试管， $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌15 min，直立凝固，备用。

#### A.5 羧苄青霉素

##### A.5.1 成分

羧苄青霉素钠

##### A.5.2 制法

将羧苄青霉素钠溶于水中，使有效浓度为 $20\text{ mg/mL}$ ， $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，避光储存，保质期12个月。

#### A.6 氧化酶试验试剂

##### A.6.1 成分

四甲基对苯二胺	1.0 g
蒸馏水	100 mL

##### A.6.2 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 $2\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存，在配制7 d内使用。

#### A.7 无菌 0.85 %生理盐水

##### A.7.1 成分

氯化钠	8.5 g
蒸馏水	1 000 mL

##### A.7.2 制法

氯化钠加入1000 mL蒸馏水中，搅拌至完全溶解，分装， $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 灭菌15 min，备用。

#### A.8 5%蔗糖脱脂乳保护剂

##### A.8.1 成分

脱脂乳	10.0 g
-----	--------

蔗糖	5 g
水	100 mL

#### A. 8.2 制法

取A. 8.1各成分，混合，112 °C高压灭菌15 min，备用。

附录 B  
(资料性)

肺炎克雷伯菌 Khe 基因 PCR 扩增目标片段测序序列

GGTCAACCAACGATCCTGGCGCGTCGCGGCATAGCCGGGATTGAGCGGTAATAAATGCGGTTGTACTTCTTGTGGCCTCGCC  
CACCACCAGCAGACGAACCTCCTGCTCGGTGTTATTGAGAAAGGTGTGGCAGATGCCGTACCAGCGGAAAACCCACGCTGTCGCCGG  
GCTCCAGCTTCCAGAGATAGCCGTTTATCCACACTTCCGGATAGCCCTCCAGCACGTAGATGAACTCTCCTCATCGCTCTCCGCGTGT  
GGATAAGAGGTGCGCCCGCGGCAGCCGCTCGTGGTGGATCCCCAGCCGTTGAGACGTAACCTCGCCCCAGCGGCGCGCCGAT  
TGAAAAACGCTCCGGGCTGTCGGGATAAGTAGCATCGTCGGGCCCTTCCAGTTCGCGCCAGTGGCGAATGCAATCA

---