

# SN

## 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2552.9—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

Microbiological examination method for milk and milk products hygiene—  
Part 9: Detection of *Klebsiella* spp.

2010-05-27 发布

2010-12-01 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

SN/T 2552《乳及乳制品卫生微生物学检验方法》分为十三个部分：

- 第1部分：取样指南；
- 第2部分：检验样品的制备与稀释；
- 第3部分：酵母、霉菌菌落计数；
- 第4部分：嗜冷菌微生物菌落计数；
- 第5部分：沙门氏菌检验；
- 第6部分：柠檬酸杆菌检验；
- 第7部分：阴沟肠杆菌检验；
- 第8部分：普通变形杆菌和奇异变形杆菌检验；
- 第9部分：克雷伯氏菌检验；
- 第10部分：阪崎肠杆菌检验 免疫荧光法；
- 第11部分：蜡样芽孢杆菌的分离与计数；
- 第12部分：单核细胞增生李斯特氏菌检测与计数；
- 第13部分：假单胞菌属的分离与计数。

本部分是 SN/T 2552 的第 9 部分。

本部分按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本部分由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本部分起草单位：中国检验检疫科学研究院、中华人民共和国天津出入境检验检疫局。

本部分主要起草人：张霞、高旗利、赵贵明、张海滨、黎径、刘培、张海英。

## 引 言

克雷伯氏菌(*Klebsiella*)为肠杆菌科的一个属。根据伯杰氏细菌分类法,将克雷伯氏菌属分成5个种:肺炎克雷伯氏菌(*K. pneumoniae*)、产酸克雷伯氏菌/催娩克雷伯氏菌(*K. oxytoca*)、植生克雷伯氏菌(*K. planticola*)、土生克雷伯氏菌(*K. terrigena*)和解鸟氨酸克雷伯氏菌(*K. ornithinolytica*)。其中肺炎克雷伯氏菌又分成3个亚种:肺炎克雷伯氏菌肺炎亚种(*K. subsp. pneumoniae*)、肺炎克雷伯氏菌臭鼻亚种(*K. subsp. azaenae*)和肺炎克雷伯氏菌鼻硬结亚种(*K. subsp. rhinoscleromatis*),为了方便,习惯上称谓肺炎克雷伯氏菌、臭鼻克雷伯氏菌和鼻硬结克雷伯氏菌。由于植生克雷伯氏菌、土生克雷伯氏菌和解鸟氨酸克雷伯氏菌不具有卫生学意义,因此,本部分界定的克雷伯氏菌仅包括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和产酸克雷伯氏菌。

克雷伯氏菌是最重要条件致病菌之一。对人类,特别是免疫力低下的人群,易引发肺炎、肝脓肿、脑膜炎、脊髓炎、败血症、结肠炎及食物中毒等疾病。FAO/WHO于2004年在日内瓦召开的“婴儿配方奶粉中阪崎肠杆菌和其他微生物”的联席会议将克雷伯氏菌列为婴儿配方奶粉中的病原菌,要求成员国实施有效的监控措施,保障婴儿配方奶粉哺喂婴儿的安全。据调查报告表明婴儿配方奶粉中污染肺炎克雷伯氏菌和产酸克雷伯氏菌的含量较低,肺炎克雷伯氏菌含量为0.19 CFU/100 g~46.22 CFU/100 g,产酸克雷伯氏菌污染程度为0.36 CFU/100 g~1.47 CFU/100 g,为此,定性检测取样量确定为3×100 g,定量检测取样量确定为333 g,以尽可能检测出样品中含量少目标菌。

# 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

### 1 范围

SN/T 2552 的本部分规定了乳粉中克雷伯氏菌(肺炎克雷伯氏菌、产酸克雷伯氏菌)的检验方法。

本部分适用于乳粉中克雷伯氏菌(肺炎克雷伯氏菌、产酸克雷伯氏菌)的检验,其他乳及乳制品可参照使用。

### 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。

SN/T 2552.1 乳及乳制品卫生微生物学检验方法 第1部分:取样指南

SN/T 2552.2 乳及乳制品卫生微生物学检验方法 第2部分:检验样品的制备与稀释

### 3 术语与定义

下列术语和定义适用于本文件。

#### 3.1

**克雷伯氏菌** *Klebsiella* spp.

克雷伯氏菌拉丁学名 *Klebsiella*, 为肠杆菌科的一个属,符合肠杆菌科定义,具荚膜、无鞭毛的革兰氏阴性球杆菌,大小(0.5 μm~0.8 μm)×(1 μm~2 μm),单独、成双或短链状排列。发酵肌醇或阿东醇,不产生 H<sub>2</sub>S 和鸟氨酸脱羧酶。

### 4 培养基和试剂

4.1 肠杆菌增菌肉汤(EE 肉汤):见附录 A 第 A.1 章。

4.2 麦康凯肌醇阿东醇羧苄青霉素琼脂(MIAC):见附录 A 第 A.2 章。

4.3 氧化酶试验试剂:见附录 A 第 A.3 章。

4.4 营养琼脂(NA):见附录 A 第 A.4 章。

4.5 动力试验培养基:见附录 A 第 A.5 章。

4.6 吲哚试验培养基及试剂:见附录 A 第 A.6 章。

除另有规定外,所用试剂均为分析纯,水为蒸馏水。

### 5 设备和材料

5.1 水浴箱:45℃±0.2℃。

5.2 温度计:1℃~55℃,分刻度 0.1℃。

5.3 培养箱:36℃±1℃。

- 5.4 吸管:10 mL,分刻度 0.1 mL。
- 5.5 试管:15 mm×100 mm。
- 5.6 灭菌平皿:15 mm×150 mm。
- 5.7 接种环:3 mm 直径。
- 5.8 天平:量程 2 kg,感量 0.1 g。
- 5.9 灭菌的样品处理器具:取样勺,剪刀,开罐器。
- 5.10 样品稀释瓶:125 mL,250 mL 和 2 L 样品稀释瓶。
- 5.11 克雷伯氏菌质控菌株:ATCC 13883。
- 5.12 API 20 E 肠杆菌和其他革兰氏阴性杆菌鉴定试剂盒或类似产品。
- 5.13 VITEK 全自动微生物分析系统或类似设备。

## 6 检测

### 6.1 方法提要

乳粉中克雷伯氏菌的定性检验方法是通过对 3 份 100 g 检样进行预增菌、选择性增菌、分离及生化鉴定等步骤对乳粉中可能存在的克雷伯氏菌进行定性检验。定量检验采用“三管”增菌的 MPN 法,至少需要 333 g 样品以检验样品中含量少得目标菌。

### 6.2 检验程序

克雷伯氏菌的检验程序见图 1。

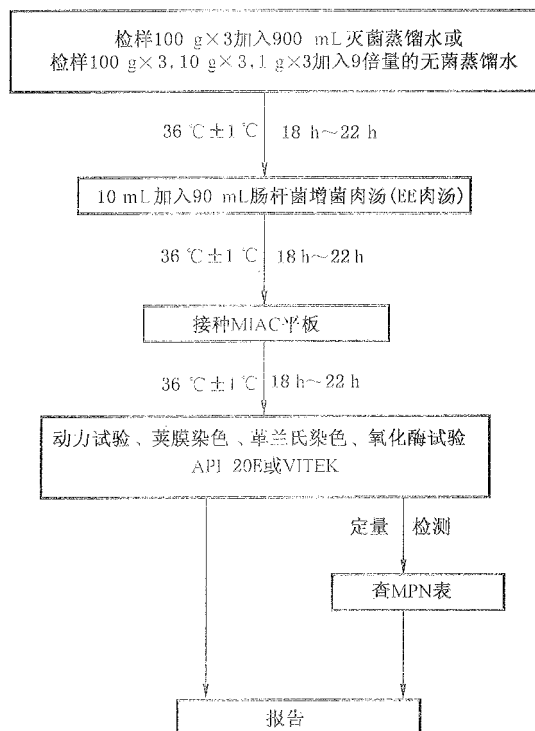


图 1 克雷伯氏菌的检验程序

### 6.3 定性检验

6.3.1 取样和制备按 SN/T 2552.1 和 SN/T 2552.2 执行。按无菌操作称量 3 份 100 g 检样分别置于 3 瓶 2 L 样品稀释瓶中,加入 900 mL 预热到 45 °C 的灭菌蒸馏水中,或者将检品直接称量到装有 9 倍预热到 45 °C 的灭菌蒸馏水的样品稀释瓶中,振摇,使检样充分混匀。36 °C ± 1 °C 培养 18 h~22 h。

6.3.2 分别移取培养 18 h~22 h 的悬液各 10 mL 加入到 90 mL EE 肉汤中,36 °C ± 1 °C 培养 18 h~22 h。

6.3.3 轻轻混匀 EE 增菌液,用直径 3 mm 的接种环按四区法接种于 MIAC 平板,36 °C ± 1 °C 培养 18 h~22 h。观察平板上的菌落形态,在 MIAC 平板上,克雷伯氏菌的菌落形态为圆形、突起、湿润、光滑的红色菌落,直径为 2 mm~4 mm。

6.3.4 从 MIAC 平板上挑取 5 个可疑菌落分别做动力试验,并接种到 NA 平板上,36 °C ± 1 °C 培养 18 h~22 h。

6.3.5 将 6.3.4 中 NA 平板上的纯培养物做革兰氏染色、荚膜染色、氧化酶试验。无动力,革兰氏染色阴性,有荚膜,氧化酶试验阴性者,按表 1 进行生化鉴定。也可应用 API 20E 生化鉴定试剂盒或 VITEK 生化鉴定系统进行生化鉴定。

6.3.6 克雷伯氏菌属细菌生化特性见表 1。

表 1 克雷伯氏菌属细菌生化特性

生化特性	肺炎克雷伯氏菌肺炎亚种	肺炎克雷伯氏菌鼻亚种	肺炎克雷伯氏菌硬结亚种	产酸克雷伯氏菌
吲哚	—	—	—	+
甲基红	—	+	+	—
VP	+	—	—	(+)
柠檬酸盐	+	(—)	—	+
丙二酸盐	(+)	—	+	(+)
尿素酶	(+)	—	—	(+)
赖氨酸脱羧酶	+	d	—	+
鸟氨酸脱羧酶	—	—	—	—
果胶酸酶	—	—	—	+
ONPG	+	+	—	+
10 °C 生长	—	—	—	+

注: +: ≥90% 阳性; (+): 75%~89% 阳性; d: 不同菌株不定; (—): 75%~89% 阴性; —: ≥90% 阴性。

### 6.4 定量检验

6.4.1 按无菌操作取 100 g、10 g、1 g 检样各 3 份,分别置于 2 L、250 mL、125 mL 的样品稀释瓶中,加入 9 倍预热到 45 °C 的灭菌蒸馏水(1:10 稀释),或者将检样直接称量到装有 9 倍预热到 45 °C 的灭菌蒸馏水的样品稀释瓶中,振摇,使检样充分混匀。36 °C ± 1 °C 培养 18 h~22 h。

6.4.2 从上述 9 瓶增菌液中分别移取悬液各 10 mL 加入到 90 mL EE 肉汤中,36 °C ± 1 °C 培养 18 h~22 h。

6.4.3 操作同 6.3.3~6.3.6。

## 7 结果报告

### 7.1 定性检验结果报告

根据生化鉴定结果,若 3 份检样中至少有一份鉴定为阳性,报告每 300 g 样品中检出何种或何亚种

克雷伯氏菌。若 3 份检样均为阴性,报告每 300 g 样品中未检出克雷伯氏菌。

## 7.2 定量检验结果报告

生化鉴定结果符合克雷伯氏菌特性的菌株,按增菌培养阳性管数,应用 MPN 表(见附录 B),查出每 100 g 样品中的克雷伯氏菌 MPN 值。检验结果报告为每 100 g 样品中克雷伯氏菌属具体种或亚种的最近似值。

附 录 A  
(规范性附录)  
培养基和试剂

### A.1 肠杆菌增菌肉汤(EE肉汤)

#### A.1.1 成分

蛋白胨	10.0 g
葡萄糖	5.0 g
磷酸氢二钠	8.0 g
磷酸二氢钾	2.0 g
牛胆盐	20.0 g
煌绿	0.015 g
蒸馏水	1 000 mL

#### A.1.2 制法

应使用纯净的牛胆盐和煌绿,减少对受损伤且数量极少的肠杆菌的生长抑制。将各成分加入蒸馏水中,加热煮沸,调节 pH 至  $7.2 \pm 0.1$ ,分装适宜容器。115 °C 高压灭菌 15 min,制成的培养基为绿色,可放置 2 °C~8 °C 冷藏柜保存,4 周内使用。

### 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
蒸馏水	1 000 mL

#### A.2.2 制法

将各成分加入蒸馏水中,加热溶解,调节 pH 至  $7.1 \pm 0.2$ ,加入 0.1% 结晶紫水溶液 1 mL,1% 中性红水溶液 5 mL,分装适当容器,115 °C 高压灭菌 15 min,温度降至 60 °C 左右,加入 100 mg/mL 羧苄青霉素(经 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤除菌)1 mL,充分混匀,制成平板备用。

### A.3 氧化酶试验试剂

#### A.3.1 成分

四甲基对苯二胺	1.0 g
---------	-------



蒸馏水 100 mL

#### A.3.2 制法

将四甲基对苯二胺溶于蒸馏水即可,现配现用。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.4 营养琼脂(NA)

##### A.4.1 成分

蛋白胨	10.0 g
牛肉浸膏	3.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL

##### A.4.2 制法

将各成分加入蒸馏水中,加热溶解,调节 pH 至  $7.3 \pm 0.1$ , 121℃高压灭菌 15 min,制成平板备用。

#### A.5 动力试验培养基

##### A.5.1 成分

胰蛋白胨	10.0 g
氯化钠	5.0 g
琼脂	5.0 g
蒸馏水	1 000 mL

##### A.5.2 制法

将各成分加入蒸馏水中,加热溶解,调节 pH 至  $7.3 \pm 0.1$ ,分装 15 mm×100 mm 试管,121℃高压灭菌 15 min,制成半固体高层。

#### A.6 吲哚试验培养基及试剂

##### A.6.1 吲哚试验培养基

胰蛋白胨	10.0 g
氯化钠	5.0 g
蒸馏水	1 000 mL

##### A.6.2 制法

将各成分加入蒸馏水中,加热溶解,调节 pH 至 7.4,分装 15 mm×100 mm 试管,121℃高压灭菌 15 min。

## A.6.3 吡啶试验试剂

对二甲基氨基苯甲醛	10.0 g
纯戊醇	150 mL
纯浓盐酸	50 mL

## A.6.4 制法

将对二甲基氨基苯甲醛先溶于戊醇中,再缓慢加入浓盐酸,混匀,保存于 2℃~8℃ 冰箱。

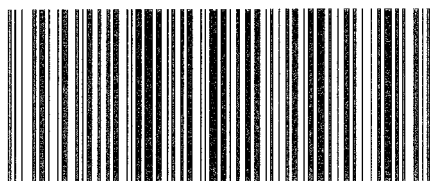
附录 B  
(规范性附录)

## 克雷伯氏菌最可能数(MPN)检索表

表 B.1 接种量分别为 10.0 g、1.0 g 和 0.1 g 时九管法的 MPN 表及 95% 可信区间

阳性管数			MPN/100 g	可信限		阳性管数			MPN/100 g	可信限	
10.0	1.0	0.1		低	高	10.0	1.0	0.1		低	高
0	0	0	<3.0	—	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1 000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1 000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2 000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1 100	180	4 100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1 100	420	—

注：如果接种量扩大 10 倍，分别为 100.0 g、10.0 g 和 1.0 g 时，表中的数字相应缩小 10 倍。  
如果接种量缩小 10 倍，分别为 1.0 g、0.1 g 和 0.01 g 时，表中的数字相应扩大 10 倍。



SN/T 2552.9-2010

书号：155066·2-21211

定价：16.00 元