ICS 11.020.20
CCS C59

DB65

新 疆 维 吾 尔 自 治 区 地 方 标 准

DB65/T 5129—2026

三恩氏培养基制备操作规范

Specification for preparation of Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) medium

（征求意见稿）

XXXX－XX－XX 发布　　XXXX－XX－XX 实施

新疆维吾尔自治区市场监督管理局　　发 布

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。

本文件由新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心提出。

本文件由新疆维吾尔自治区卫生健康委员会归口并组织实施。

本文件起草单位：新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心。

本文件主要起草人：亚里昆·买买提依明、阿迪力·司马义、赵江山、张仪、张燕、骆骋、玉苏布江·塞提瓦尔、史光忠、张海亭、王蒴、曹雪卉、伊力努尔·艾力、何海波、买买提江·吾买尔、阿依夏木·克尤木、开赛尔·吐尔逊江。

本文件实施应用中的疑问，请咨询新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心。

对本文件的修改意见及建议，请反馈至新疆维吾尔自治区卫生健康委员会（乌鲁木齐市龙泉街191号)、新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心（乌鲁木齐市碱泉一街380号）、新疆维吾尔自治区市场监督管理局（乌鲁木齐市新华南路167号）。

新疆维吾尔自治区卫生健康委员会　联系电话：0991-8561122；传真：0991-8561122；邮编：830001

新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心　联系电话：0991-2615081；传真：0991-2625962；邮编：830002

新疆维吾尔自治区市场监督管理局　联系电话：0991-2818750；传真：0991-2311250；邮编：830004

三恩氏培养基制备操作规范

1 范围

本文件规定了三恩氏培养基制备的通用要求、制备操作、质量控制与管理等内容。

本文件适用于开展利什曼原虫复苏、分离、体外培养、病原学检测和传代等工作。

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 35892 实验动物 福利伦理审查指南

GB/T 39760 实验动物 安乐死指南

HJ 421 医疗废物专用包装袋、容器和警示标志标准

WS 233 病原微生物实验室生物安全通用准则

WS/T 10043 寄生虫病名词术语

3 术语和定义

WS/T 10043－2025界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

三恩氏培养基 Novy－MacNeal－Nicolle medium；NNN medium

一种用于利什曼原虫体外培养的双相培养基，由含脱纤维兔血的琼脂固相斜面和上层液相组成，可为利什曼原虫生长提供适宜的营养和液相环境。

3.2

脱纤维兔血 defibrillated rabbit blood

从家兔采集的新鲜血液，经机械方法去除纤维蛋白后获得的无凝块血液，是 NNN 培养基重要成分，可提供利什曼原虫生长所需营养物质。

3.3

洛克氏液 Locke’s solution

是一种含氯化钠、氯化钾、氯化钙、碳酸氢钠和葡萄糖等成分的电解质溶液，在本文件中作为 NNN 培养基上层液相使用，用于维持培养环境 pH 和电解质平衡。

3.4

琼脂斜面 agar slant

培养基在试管或培养管内倾斜放置并冷却凝固后形成的斜面状固体表面，可提供较大固体表面积，便于利什曼原虫的接种与培养。

3.5

超净工作台 laminar flow cabinet

是一种通用型局部净化设备，通过过滤空气形成局部洁净操作环境，用于 NNN 培养基制备过程中的无菌操作。

3.6

双抗（青霉素-链霉素混合液） Penicillin－Streptomycin mixture

由青霉素和链霉素组成的抗生素混合液，用于配制含双抗洛克氏液，以降低 NNN 培养基制备、保存和使用过程中细菌污染的风险。

4 通用要求

4.1 实验室要求

4.1.1 实验室应符合 GB 19489 和 WS 233 的有关要求。实验器具灭菌、NNN 培养基制备、无菌性检验、保存及管理等相关操作，应在生物安全一级（BSL-1）及以上实验室内完成，并具备相应的无菌操作、消毒灭菌、个人防护和废弃物规范处置条件。

4.1.2 实验室应合理划分清洁操作区与一般操作区。实验环境温度宜控制在 18 ℃～26 ℃；操作台面在使用前后应采用 75%乙醇擦拭或紫外照射等方式进行消毒处理，并保持环境整洁，减少环境污染和交叉污染风险。

4.2 操作人员要求

4.2.1 操作人员应具备医学检验、微生物学、寄生虫学等相关专业基础，熟悉无菌操作、生物安全防护和实验动物操作基本要求。

4.2.2 操作人员上岗前应接受无菌操作、生物安全防护、实验动物操作、动物福利伦理、仪器设备使用及废弃物处置等培训，考核合格后方可上岗。

4.3 生物安全要求

4.3.1 实验全过程应遵循无菌操作和生物安全要求，操作人员应根据操作内容穿戴实验服或隔离衣、医用外科口罩、工作帽、一次性医用手套；涉及动物采血、血液处理、培养基分装等可能产生血液、体液飞溅或气溶胶的操作时，应佩戴护目镜或防护面屏。

4.3.2 使用酒精灯、压力蒸汽灭菌器时，应采取防火、防烫伤措施。废弃物分类收集、包装、暂存和处置应符合国家有关医疗废物管理规定；医疗废物专用包装袋、容器和警示标志应符合 HJ 421 的有关要求。

4.4 设施设备要求

4.4.1 所需设施设备包括超净工作台、普通工作台、立式压力蒸汽灭菌器、冷藏设备、分析天平、恒温水浴锅、电热板或磁力搅拌加热器、pH 计或精密 pH 试纸、试管架、移液器（1 mL～10 mL）、温度计（0 ℃～100 ℃）等。

4.4.2 设施设备应处于正常工作状态。对结果准确性或操作安全有影响的设施设备，应按规定进行检定、校准、维护和保养。

4.5 供血动物要求

4.5.1 选取体质量≥3 kg、健康状况良好、无明显临床异常表现的成年实验用家兔，用于采集脱纤维兔血。供血家兔应具有实验动物质量合格证明、检疫合格证明或其他相关质量证明材料；动物来源、品种或品系、健康状况及相关证明材料名称或编号等信息应记录完整，并能够追溯。

4.5.2 家兔采血应符合 GB/T 35892 的有关要求。采用心脏采血等终末采血方式或采血后需实施动物处置的，应符合 GB/T 39760 的有关要求。开展家兔采血等动物实验活动的机构，应具备与实验动物使用和动物实验活动相适应的资质条件。

5 制备操作

5.1 材料与耗材

5.1.1 试剂及材料

氯化钠（NaCl）、氯化钙（$CaCl_2$）、氯化钾（KCl）、碳酸氢钠（$NaHCO_3$）、葡萄糖、去离子水或蒸馏水、琼脂粉、滤纸、青霉素（10 000 U/mL）、链霉素溶液（10 mg/mL 或 10 000 μg/mL）、0.1 mol/L 盐酸溶液、0.1 mol/L 氢氧化钠溶液。

5.1.2 辅助用品

酒精灯、75%乙醇、消毒棉球、碘伏、牛皮纸、标签纸、锡纸、耐高温灭菌指示胶带或耐高温扎带。

5.1.3 防护用品

实验服或隔离衣、医用外科口罩、工作帽、一次性医用手套、护目镜或防护面屏、耐热防护手套等。

5.1.4 玻璃器具及容器

适于压力蒸汽灭菌的锥形瓶或三角烧瓶（100 mL、300 mL、1000 mL，或其他适宜容量）、玻璃试管或玻璃培养管（10 mL，或长度约 15.0 cm、外径约 1.5 cm，配套棉塞、橡胶塞或适宜密封管盖）、三角漏斗（约 90 mm）、烧杯（1000 mL）、量筒或容量瓶（1000 mL）、玻璃棒、玻璃珠（直径约 4 mm，每个脱纤维容器约 100 颗）、可密闭且适于压力蒸汽灭菌的玻璃试剂瓶或其他玻璃容器等。

5.1.5 金属器械

镊子、外科剪刀、金属灭菌盒（铝制或不锈钢）等。

5.1.6 一次性无菌用品

一次性无菌注射器（≥30 mL）、一次性无菌注射针头（0.7 mm）、一次性无菌移液管或与移液器配套的一次性无菌吸头（1 mL～10 mL）等。

5.1.7 辅助器具

动物剪毛器、斜面架或可调角度试管架、冰水浴容器或冷却槽等。

5.2 实验器具预处理和灭菌

5.2.1 本文件 5.1.4 所列玻璃器具及容器，使用前应清洗、干燥，可采用锡纸、牛皮纸或其他适宜包装材料包裹，并用耐高温灭菌指示胶带或耐高温扎带固定，置入立式压力蒸汽灭菌器，121 ℃压力蒸汽灭菌 15 min 后备用。

5.2.2 本文件 5.1.5 所列金属器械，使用前应清洗、干燥，宜置于金属灭菌盒内，可采用牛皮纸包裹，并用耐高温灭菌指示胶带或耐高温扎带固定后，置入压力蒸汽灭菌器，121 ℃压力蒸汽灭菌 15 min 后备用。

5.2.3 本文件 5.1.6 所列一次性无菌用品，应在有效期内使用。使用前应检查包装完整性和灭菌标

识；包装破损、受潮、超过有效期或标识不清的，不应使用。一次性无菌用品不应重复使用。

5.2.4 本文件 5.1.7 所列辅助器具，使用前应清洁、干燥、无可见污染物。动物剪毛器使用前后应对刀头及可能污染部位进行清洁和消毒；需置入超净工作台内使用的辅助器具，应采用 75%乙醇擦拭表面，待乙醇挥发后使用。

5.2.5 灭菌结束后，压力蒸汽灭菌器压力自然降至 0 MPa 后，应佩戴耐热防护手套，取出灭菌物品。灭菌物品应保持包装完整，置于清洁、干燥处备用；发现包装破损、受潮或灭菌指示异常的，不应使用。

5.3 配制洛克氏液

5.3.1 按以下配比配制：每 1000 mL 含 NaCl 9.0 g、KCl 0.4 g、$NaHCO_3$ 0.2 g、葡萄糖 2.5 g、$CaCl_2$ 0.2 g。配制其他体积时，各组分用量按上述配比等比例折算。

5.3.2 配制时宜先将 NaCl、KCl、$NaHCO_3$ 和葡萄糖溶解于适量蒸馏水或去离子水中，再将 $CaCl_2$ 单独溶解后在搅拌条件下缓慢加入，避免产生沉淀；混匀后补加蒸馏水或去离子水至接近目标体积，使用 pH 计或精密 pH 试纸测定，控制溶液 pH 值为 7.2～7.4；超出范围时，可使用 0.1 mol/L 盐酸溶液或 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液调节至规定范围。调节完成后，定容至目标体积，使用三角漏斗和滤纸过滤，并转入洁净、可密闭且适于压力蒸汽灭菌的玻璃容器中。

5.3.3 将盛装洛克氏液的玻璃容器封口后，置于压力蒸汽灭菌器，121 ℃压力蒸汽灭菌 15 min。灭菌结束后，待压力自然降至 0 MPa 时取出，冷却至室温。

5.3.4 在超净工作台内，按每 1000 mL 灭菌冷却后的洛克氏液分别加入青霉素溶液 1 mL（10 000 U/mL）和链霉素溶液 1 mL（10 mg/mL 或 10 000 μg/mL）的比例，制成含双抗洛克氏液；配制其他体积时，青霉素溶液和链霉素溶液加入量按上述比例等比例折算。加入后轻轻混匀，密封，置于 2 ℃～8 ℃保存备用，有效期为 30 d。

5.4 制备脱纤维兔血

5.4.1 采血

在麻醉状态下将家兔仰卧固定于操作台，剃除左胸部被毛，对采血部位可使用碘伏或 75%乙醇棉球进行消毒。触摸第 3～4 肋间心搏明显处作为穿刺区域，使用一次性无菌注射器（≥30 mL）及一次性无菌注射针头（0.7 mm），以适宜角度刺入心脏，采集血液 20 mL～25 mL。拔针后压迫止血并消毒，若回血不畅或动物躁动，应停止采血，待麻醉状态、固定状态和穿刺条件符合要求后再进行操作。

5.4.2 脱纤维处理

采集的新鲜兔血应立即注入预先放置约 100 颗灭菌玻璃珠的无菌锥形瓶或三角烧瓶中，密闭后沿同一方向轻柔旋转或摇动约 5 min，使血液中纤维蛋白析出并附着于玻璃珠表面或形成纤维蛋白团块。待纤维蛋白充分分离后，在无菌条件下避开纤维蛋白团块和玻璃珠，收集无凝块血液作为脱纤维兔血备用。

5.4.3 保存与使用

脱纤维兔血应现采现用；不能立即使用时，应置于 2 ℃～8 ℃密闭保存，保存时间不应超过 24 h。

5.5 琼脂基液的制备

5.5.1 琼脂基液按以下配比制备：每 90 mL 蒸馏水或去离子水中加入琼脂粉 1.4 g、NaCl 0.6 g。配制其他体积时，各组分用量按上述配比等比例折算。

5.5.2 将琼脂粉、NaCl 和蒸馏水或去离子水按 5.5.1 的配比置于烧瓶或其他适宜耐热容器中，加热

至 90 ℃～100 ℃ 并持续搅拌，直至琼脂充分溶化，液体均匀、无明显琼脂颗粒；加热过程中应避免局部过热、干烧或烧焦。琼脂完全溶化后，立即分装于洁净、适于压力蒸汽灭菌的玻璃试管、玻璃培养管或三角烧瓶中；试管或培养管可每管分装 3 mL，三角烧瓶可按实际需要分装。分装后用棉塞或其他适宜方式封口，经 121 ℃压力蒸汽灭菌 15 min 后备用。

5.6 NNN 培养基制备

5.6.1 将 5.5 制备并经压力蒸汽灭菌的琼脂基液取出后，放入预先设定为 50 ℃ 的水浴锅中保温，待温度降至 45 ℃～50 ℃ 并保持熔融状态时，在超净工作台内按照无菌操作要求，按琼脂基液与脱纤维兔血体积比 3:1 加入 5.4 制备的脱纤维兔血。每支玻璃试管或玻璃培养管含琼脂基液 3 mL 时，加入脱纤维兔血 1 mL；三角烧瓶内含琼脂基液 10 mL 时，加入脱纤维兔血约 3.3 mL。加入后立即轻柔旋转或缓慢倒转容器，使脱纤维兔血与琼脂基液充分混匀，避免剧烈振摇和产生气泡。

5.6.2 混匀后，将试管或培养管置于斜面架上斜置，试管或培养管与水平面夹角宜为 15°～30°，形成均匀、完整的血琼脂斜面；斜面长度宜占试管或培养管内培养基所在管段的 1/2～2/3，斜面上端不应接触管塞或管盖。三角烧瓶直立放置，使培养基凝固形成平面；必要时可短时置于冰水浴中辅助凝固。

5.6.3 培养基凝固完全后，在超净工作台内按无菌操作，打开管塞或瓶塞，加入 5.3.4 制备的含双抗洛克氏液。含双抗洛克氏液加入量应以完全覆盖血琼脂斜面或平面为准。以 10 mL 玻璃试管或玻璃培养管为例，每支加入 2 mL～3 mL；以 100 mL 三角烧瓶为例，每瓶加入 5 mL～10 mL。采用其他规格容器时，可根据血琼脂表面积和液面覆盖情况适当调整加入量，确保液面完全覆盖血琼脂表面，且封口后保留适当气相空间。加液时应沿管壁或瓶壁缓慢加入，避免直接冲击血琼脂斜面或平面。加入洛克氏液后，立即使用无菌橡胶塞或适宜密封管盖封口；必要时，可使用酒精灯辅助无菌操作。

5.7 废弃物处置

5.7.1 实验结束后，接触或可能接触兔血、培养基、培养物、标本或动物组织的废弃物，应在产生地点分类收集；无法判断是否污染的，按已污染物品处理。废弃物包装袋、利器盒和警示标志应符合 HJ 421 的要求。

5.7.2 剩余兔血、废弃培养基、无菌性检验不合格培养基、保存或使用前检查异常的 NNN 培养基，以及接触兔血、培养基、培养物或标本的一次性用品、擦拭材料和废弃容器等，应经 121 ℃压力蒸汽灭菌 30 min 处理后，按医疗废物收集、包装、暂存和处置。

5.7.3 一次性注射针头、破损玻璃器具、破损玻璃珠等能够刺伤或割伤人体的物品，应置入利器盒，不应徒手分拣、挤压或倒出。

5.7.4 非终末采血后仍存活的供血家兔，不作为废弃物处置；应对采血部位压迫止血并消毒，观察至动物苏醒且状态稳定。出现持续出血、衰竭、不能恢复清醒或其他不宜继续饲养情形时，应按 GB/T 39760 的要求实施安乐死。

5.7.5 终末采血、安乐死或死亡后的供血家兔尸体及组织，属于《医疗废物分类目录（2021 年版）》中规定的废弃医学实验动物组织和尸体，应使用符合 HJ 421 要求的专用包装袋收集，防渗漏包装后交由医疗废物集中处置单位处置。

5.7.6 可重复使用的玻璃器具、金属器械和辅助器具，使用后如接触兔血、培养基、培养物、标本或动物组织，应先消毒或灭菌，再进行清洗、干燥和备用。操作结束后，应对操作台面和可能污染区域进行消毒。

6 质量控制与管理

6.1 NNN 培养基无菌性检验

NNN 培养基制备完成并封口后，应进行无菌性检验；确不能立即进行时，应置 2 ℃～8 ℃临时保存，并于 24 h 内完成检验。将培养基置 37 ℃ 条件下培养 24 h～48 h，观察血琼脂表面有无菌落、霉菌生长，洛克氏液有无浑浊、絮状物或沉淀。发现污染迹象的培养基不得使用，并按 5.7.2 的要求处置。

6.2 NNN 培养基保存

无污染迹象的 NNN 培养基应置 2 ℃～8 ℃ 冷藏设备内密闭保存，避免倒置、剧烈震荡、反复开盖和长时间暴露于室温环境。保存期不宜超过 30 d。保存期间应对冷藏设备温度进行日常监测并记录。应至少每周检查 1 次培养基外观、封口状态和液面情况；发现污染、浑浊、干裂、失水、异味、封口松动或漏液等异常时不得使用，并按 5.7.2 的要求处置。

6.3 批次管理与日常使用

6.3.1 每次制备 NNN 培养基应作为一个独立批次进行管理，并赋予唯一批号。培养基容器或外包装上应粘贴标签纸，标明批号、制备日期和有效期。同一批次的制备日期、制备人员、供血动物来源单位、相关质量证明材料名称或编号、动物种类或品种、健康状况、采血日期、主要原材料名称及批号、制备数量、保存条件、有效期、无菌性检验结果和领用或使用记录等信息应记录完整、清晰，并能够追溯。

6.3.2 使用前应将 NNN 培养基取出，恢复至室温后使用。使用前应检查培养基外观和封口完整性，确认血琼脂斜面或平面完整，洛克氏液澄清，无污染、浑浊、干裂、失水、异味、封口松动或漏液等异常后，方可用于利什曼原虫培养相关操作；发现异常时不得使用，并按 5.7.2 的要求处置。

6.4 原材料质量控制

用于制备 NNN 培养基的脱纤维兔血、琼脂粉、洛克氏液配制试剂、青霉素和链霉素等应在有效期内使用。不得使用受潮、变质、污染、超过有效期或标识不清的材料。

参 考 文 献

[1] 中华人民共和国传染病防治法
[2] 医疗废物管理条例
[3] 医疗卫生机构医疗废物管理办法
[4] 医疗废物分类目录（2021年版）
[5] 实验动物管理条例
[6] 实验动物许可证管理办法（试行）（国科发财字〔2001〕545号）
[7] 实验动物质量管理办法（国科发财字〔1997〕593号）
[8] 黑热病诊疗方案（2023年版）（国卫办医急函〔2023〕482号）
[9] WS 258—2006 黑热病诊断标准