

肺炎克雷伯菌分离标准操作流程

第一天

一、肺炎克雷伯菌分离琼脂培养基的准备

按照 1000mL 培养基进行制备，如配制更大量，请按照此操作流程扩大配制体积和准备耗材。

1、选择法国科马嘉 ESBLs 显色培养基进行肺炎克雷伯菌初筛培养基的配制，按照说明书，准确称取整瓶培养基干粉放入至含 1000mL 蒸馏水（或去离子水）的容器中，用玻璃棒充分搅拌均匀后，高压蒸汽灭菌，121 °C，15 分钟。

2、将上述培养基放入到温度预先调整为 56°C 的水浴箱中，平衡 1 个小时，在平衡过程中可以每隔 15 分钟轻轻上下翻转培养基瓶，以保证培养基中琼脂分散均匀。

3、在无菌操作台中准备一次性无菌平皿若干，如制备直径 6cm 培养基平皿，请准备 100 个相对应平皿，如制备直径 9cm 培养基平皿，请准备 35 个相对应平皿。

4、取出平衡至 56°C 的培养基，开始制作平板。如果使用的为直径为 9 cm 的平皿，每个平皿中加入的培养基为 15 mL，如果使用的为直径为 6 cm 的平皿，每个平皿中加入的培养基为 5 mL。

5、培养基倾倒完成后，平皿正置扣盖，在无菌操作台中放置 2-3 个小时（依据室温高低不同而定，室温较高的话可适当延长放置时间）后，用密封盒或塑料袋装好，整齐码放于 4 °C 避光环境备用。制作好的肺炎克雷伯菌初筛培养基应在 2-8 °C 避光环境放置 14 天内使用。

二、脑心浸液琼脂培养基的制备

按照 500mL 培养基进行制备，如配制更大量培养基，请按照此操作流程扩大配制体积和准备耗材。

1、选择北京陆桥技术股份有限公司生产的脑心浸液培养基基础（货号：

CM917) 进行培养基的配制, 按照说明书, 准确称取 18.5g 培养基干粉放入至 1000mL 锥形瓶或蓝盖瓶中, 按照 2%的琼脂浓度加入琼脂粉, 即 500mL 加入 10g 琼脂粉, 使用量筒准确称量的 500 mL 蒸馏水 (或去离子水), 用玻璃棒搅拌均匀后, 将锥形瓶瓶口捆扎好 (使用蓝盖瓶进行操作的, 应保持瓶盖螺旋瓶口旋松状态), 高压蒸汽灭菌, 121 °C, 15 分钟。

2、高压完毕后, 放入到温度预先调整为 56°C 的水浴箱中 (使用蓝盖瓶进行操作的, 应将培养基蓝盖瓶瓶口旋紧), 平衡 1 个小时, 在平衡过程中可以每隔 15 分钟轻轻上下翻转培养基瓶, 以保证培养基中琼脂分散均匀。

3、在无菌操作台中准备一次性无菌平皿若干, 如制备直径 6cm 培养基平皿, 请准备 100 个相对应平皿, 如制备直径 9cm 培养基平皿, 请准备 35 个相对应平皿。

4、取出平衡至 56°C 的培养基, 进行培养基平板制备。如果使用的为直径为 9 cm 的平皿, 每个平皿中加入的培养基为 15 mL, 如果使用的为直径为 6 cm 的平皿, 每个平皿中加入的培养基为 5 mL。

5、培养基倾倒完成后, 平皿正置扣盖, 在无菌操作台中放置 2-3 个小时 (依据室温高低不同而定, 室温较高的话可适当延长放置时间) 后, 用密封盒或塑料袋装好, 整齐码放于 4 °C 环境备用。制作好的脑心浸液琼脂培养基最多可在 2-8 °C 避光环境放置 3 个月内使用。

三、含 20%甘油-脑心浸液保菌肉汤的配制

按照 500 个含 20%甘油-脑心浸液保菌肉汤管进行制备, 如配制更大量保菌管, 请按照此操作流程扩大配制体积和准备耗材。

1、选择北京陆桥技术股份有限公司生产的脑心浸液培养基基础 (货号: CM917) 进行培养基的配制, 按照说明书, 准确称取 18.5g 培养基干粉放入至 1000mL 干净烧杯中, 按照 20%的比例加入甘油和蒸馏水 (或去离子水), 用玻璃棒搅拌均匀后, 定容到 500 mL。

2、准备 500 支 2mL 保菌管, 整齐摆放在百格冻存盒中, 去掉保菌管管盖。

3、将彻底溶解清亮的含 20%甘油-脑心浸液的保菌肉汤分装至每个保菌管中，每管 1mL。

4、全部分装完毕后将保菌管管盖盖好，并保持悬松状态，盖好百格冰盒盒盖，并保持正置位置进行高压蒸汽灭菌，121℃，15 分钟。

5、高压完毕后，在超净工作台中或生物安全柜中打开百格冰盒盒盖，将保菌管管盖旋紧，整理好，整齐码放于 4℃环境备用。制作好的含 20%甘油-脑心浸液的保菌肉汤管最多可在 2-8℃避光环境放置 3 个月内使用。

四、样本背景资料的预收集

1、对采集样本的总体背景资料，包括采集医院名称和科室名称、样本数量、样本类型进行记录。

2、制作样本采集表及样本采集信息汇总表。

第二天

一、样本的收集

1、地面、物体表面采样：

采样方法：用浸有无菌生理盐水采样液的棉拭子 1 支，在表面选择 4-5 个点，每点约 25cm²横竖往返各涂抹 5 次，并随之转动棉拭子，将棉拭子直接涂布培养皿，35℃~37℃过夜培养。门把手等小型物体则采用棉拭子直接涂抹物体的方法采样。

2、护理人员手采样：

采样方法：被检人五指并拢，将浸有无菌生理盐水采样液的棉拭子 1 支在双手指曲面从指根到指端来回涂擦各两次（一只手涂擦面积 30 cm²），并随之转动棉拭子，将棉拭子直接涂布培养皿后 35℃~37℃过夜培养。

3、病房空气采样：

采样方法：与地面垂直高度 80 cm~150 cm，将培养基在采样点暴露 10 min 后，（平皿盖扣放在旁边，10 min 后立即盖上）35℃~37℃过夜培养。

4、医疗用水的采样：

采样方法：污水直接用棉签沾取污水，涂布培养皿，35℃~37℃过夜培养。
透析液、雾化液等洁净水用无菌吸管取 10ml 液体，>10000rpm 高速离心 2 分钟后，弃上清，0.1 mL 生理盐水重悬沉渣。

5、粪便样本的采样

直接粪便样本：使用一次性无菌便盒进行采集，具体采集方法请参照说明书，注意粪便采集时避免与周围环境的交叉污染。

肛拭子样本：包括人肛拭子样本、动物肛拭子样本及禽泄殖腔样本。使用带棉拭子的一次性样本采集转运管进行采集，采集后的棉拭子插入至相对应的含有转运液的一次性样本采集转运管中。人肛拭子采取侧卧屈膝位或双手支撑桌椅站立前驱位进行样本采集；动物肛拭子样本在注意安全的情况下，站于动物后侧方进行采集；禽泄殖腔样本需将棉拭子转动至棉花头部完全进入泄殖腔内部，再缓慢抽出。

二、样本的接种

1、从 4℃ 环境取出制备好的肺炎克雷伯菌初筛培养基，在环境中放置 1 个小时平衡到室温。

2、在平衡的时间中，将收集到的样本进行信息整理。

1) 按照本实验室标本命名原则将收集样本进行命名，在样本收集器上进行编号，并将对应编号进行人工记录。

2) 将样本编号用记号笔标记在在肠球菌分离培养基平皿。

2、对于地面、物体表面、护理人员手、病房空气等处的样本用 1μL 接种环可直接涂布培养皿；对于医疗用水，按照上述步骤处理后涂布培养皿。

3、病人样本，直接用 1μL 接种环涂布培养皿。

三、样本接种后的培养

样本接种后，将培养皿倒置在 35±2℃ 的培养箱内孵育 18-24 小时。

第三天

疑似肺炎克雷伯菌的判断

- 1、经过夜培养后，观察培养基，接种环挑选菌落为蓝色的单克隆菌落，接种至普通脑心浸液琼脂平板上，分三区划线接种。
- 2、将接种疑似肺炎克雷伯菌的培养皿倒置在 35 ± 2 °C 恒温培养箱中传代过夜培养。
- 3、对生长疑似肺炎克雷伯菌的样本平板进行记录。

第五天

疑似肺炎克雷伯菌的保种

- 1、在装有 20%甘油肉汤的保菌管上做好相应分离菌株的名称标记。
- 2、将过夜传代培养的平板上的所有菌苔用 10 μ L 接种环刮入 20%甘油肉汤中，充分搅拌混匀。 -80°C 保存。