# 假结核耶尔森氏菌标准操作程序目录

|  |  |
| --- | --- |
| 编号 | 名称 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-315-01 | 假结核耶尔森氏菌菌种接收的标准操作 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-315-02 | 假结核耶尔森氏菌菌种复苏的标准操作 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-315-03 | 假结核耶尔森氏菌菌种冻存的标准操作 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-315-04 | 假结核耶尔森氏菌菌种培养的标准操作 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-315-05 | 假结核耶尔森氏菌菌种收集的标准操作 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-315-06 | 假结核耶尔森氏菌菌种种鉴定的标准操作 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-315-07 | 假结核耶尔森氏菌菌种转运的标准操作 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-315-08 | 假结核耶尔森氏菌菌种的质量控制标准操作 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-315-09 | 假结核耶尔氏菌个人防护要求和标准操作程序 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-315-10 | 假结核耶尔氏菌实验后清场及污物、废物处理标准操作程序 |

**假结核耶尔森氏菌菌种接收的标准操作程序**

**1 目的**

准确地传递目标菌种，并防止菌种在接收过程中的泄漏，保证环境和人员的安全。

**2 适用范围**

假结核耶尔森氏菌从接收区接收，传递到BSL-2实验室并分装或冻存的过程中。

**3 职责**

从事假结核耶尔森氏菌实验活动的实验人员。

**4 内容**

4.1假结核耶尔森氏菌的接收：

4.1.1填写菌种交接单：包括双方单位名称、地址、电话，菌种的名称、数量等，双方交接人签字。

 检查样品外包装材料应满足生物安全防护的要求，应密封，防水、防破损、防外泄。具体要求应满足《微生物菌种资源收集、整理、保存技术规程汇编》相关内容，最外层的容器或包装材料上应具备生物危险标签、标识、运输登记表、警告用语和提示用语。

4.1.2运输容器：

4.1.2.1菌种应置于被承认的、本质安全、防漏的容器中，运输过程需要有专用的运输箱。

4.1.2.2实验室内运输使用带盖塑料桶，附有明显的生物安全标志。

4.1.2.3实验室外运输使用特殊结构的运输容器。

4.1.3步骤：

4.1.3.1在接收区填写菌种交接单。

4.1.3.2将运输箱放入传递窗中。

4.1.3.3实验员按照支持文件《假结核耶尔森氏菌实验人员防护要求和标准操作程序》及安全操作手册中《工作人员进出实验室程序》，进入到BSL-2实验室内缓冲走廊。

4.1.3.4打开传递窗，运输箱表面用75%酒精消毒后，打开密码锁。

4.1.3.5打开运输箱外盖，可见内部装有菌种的塑料桶。喷洒75%酒精消毒塑料桶表面。

4.1.3.6缓慢取出塑料桶，75%酒精消毒塑料桶整个外表面后，将桶拿进BSL-2核心区生物安全柜内。

4.1.3.7缓慢打开塑料桶盖，取出装有菌种的冻存管的塑料袋。

4.1.3.8用75%酒精消毒塑料袋外部，打开塑料袋，用长镊子夹出菌种管，用75%酒精消毒外部，在生物安全柜内打开液体或冻干菌种，按需要分装或冻存。

**5 支持性文件**

5.1世界卫生组织《实验室生物安全手册》（第三版），日内瓦，2004

5.2中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局、中国国家标准化管理委员会

发布。《实验室生物安全通用要求》(GB19489-2008)

5.3王宇主编。实验室生物安全国内外法规和标准汇编。北京大学医学出版社，2007。

5.4实验室生物安全基础知识。中国计量出版社，2004。

**假结核耶尔森氏菌菌种复苏的标准操作程序**

**1 目的**

加强假结核耶尔森氏菌菌种的安全管理，从复苏、使用、销毁等各个环节杜绝生物感染物质可能对环境和人员造成的危害。

**2 适用范围**

假结核耶尔森氏菌菌种的日常管理操作。

**3 职责**

结假结核耶尔森氏菌菌种管理人员及实验操作人员。

**4 菌种的取出**

4.1菌种取出要在两个菌种管理人员同在时才可打开冰箱。

4.2在《-80℃冰箱保存记录》和《菌毒种使用记录》上作记录。

注意：菌株应专人保管，保存菌种的冰箱要加锁，菌株的引进和使用均应得到实验室主任的批准，并有完备可用的背景资料。

**5 菌种的使用与交接**

5.1菌种的使用需要项目负责人批准，填写《菌种交接单》。具体操作见SOP《假结核耶尔森氏菌菌种的接收标准操作程序》

5.2使用时填写《菌毒种使用记录》

**6 菌种的运输**

选择菌种运输桶，具体操作见SOP《假结核耶尔森氏菌菌种的转运标准操作程序》，将菌种转运到BSL-2实验操作区进行复苏培养。

**7 菌种的复苏培养**

按照《假结核耶尔森氏菌菌种培养的标准操作》，在生物安全柜中取出100μl菌液，加到盛有生理盐水的EP管中，以10-1，10-2，10-3，10-4，10-5连续10倍倍比稀释，从 10-1，10-2，10-3，10-4，10-5稀释的菌液中各取100μl接种于普通LB培养基中培养，放30℃恒温培养箱中培养24h，复苏菌种，可按照《假结核耶尔森氏菌菌种收集标准操作程序》收集复苏的菌种。

按照体系文件中《生物安全柜的标准操作程序》，清理柜内物品。

**8 菌种的销毁**

剩余菌种需要全部销毁时，根据程序要求进行菌种的销毁申请，审批后由专人参照《感染材料的销毁操作程序》处理操作，将菌种装入生物安全垃圾袋，封口用75%的酒精进行外部消毒，外层再套一层生物安全型垃圾袋，放入高压锅中高压。填写《高压锅使用记录》和《感染性材料流向表》及《清场记录表》。

**9 支持性文件**

9.1世界卫生组织《实验室生物安全手册》（第三版），日内瓦，2004

9.2中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局、中国国家标准化管理委员会发布。《实验室生物安全通用要求》(GB19489—2004)

9.3王宇主编。实验室生物安全国内外法规和标准汇编。北京大学医学出版社，2007。

9.4实验室生物安全基础知识。中国计量出版社，2004。

**假结核耶尔森氏菌菌种冻存的标准操作程序**

**1 目的**

加强假结核耶尔森氏菌菌种的安全管理，杜绝保存环节生物感染物质可能对环境和人员造成的危害。

**2 适用范围**

假结核耶尔森氏菌菌种的日常管理。

**3 职责**

假结核耶尔森氏菌菌种管理人员及实验操作人员。

**4 毒种保藏**

4.1每一个冻存菌株必须编制独立的的冻存号码。

4.2填写菌株发现分离来源的资料：包括标本种类、标本性状、前处理方法、分离培养基种类、分离培养接种时间、孵育温度、可视菌落出现时间、菌落经染色后的镜检情况、结果报告时间、分离培养的实施者。

4.3将假结核耶尔森氏菌充分悬浮于冻存溶液（LB液体培养基100mL/15%丙三醇溶液）中，保藏在-80℃冰箱中。

 注意事项：此法的关键是使用密封性能好的螺旋口菌种管和封口膜密封管口，防止水分的蒸发。

4.4在实验室的生物安全柜中将假结核耶尔森氏菌分装到冻存管，每管1mL。

4.5管贴上低温冻存用标签，标明细菌种类、冻存号、时间等信息。

4.6菌种外部用75%酒精消毒后转入内部转运箱的塑料桶，75%酒精消毒后放入生物安全运输箱，按照《假结核耶尔森氏菌菌种的转运标准操作》，放入保藏区内的-80℃冰箱或液氮中。两位菌种管理人员负责-80℃冰箱或液氮罐及钥匙保管，两人同在时才可打开。

**5 参考文献**

5.1世界卫生组织《实验室生物安全手册》（第三版），日内瓦，2004

5.2中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局、中国国家标准化管理委员会发布。《实验室生物安全通用要求》(GB19489—2004)

5.3王宇主编。实验室生物安全国内外法规和标准汇编。北京大学医学出版社，2007。

5.4实验室生物安全基础知识。中国计量出版社，2004。

5.5《生物安全柜标准操作程序》

5.6《意外事故应急预案》

**假结核耶尔森氏菌菌种培养的标准操作程序**

**1 目的**

正确地进行假结核耶尔森氏菌菌种培养，避免菌种污染，以及防止菌液泄漏，保证环境和人员的安全。

**2 适用范围**

进入实验区的假结核耶尔森氏菌，由于传代或鉴定的需要进行培养。

**3 职责**

从事假结核耶尔森氏菌实验操作的人员。

**4 试剂和材料**

4.1 LB液体培养基

4.2 LB固体培养基

**5 仪器设备**

5.1 低温冰箱

5.2 生物安全柜

5.3 恒温箱

**6 耗材**

6.1 1ml、5ml和10ml一次性无菌吸管

6.2 移液器

6.3 100毫升培养瓶

**7 实验前准备**

7.1 进入BSL-2级实验室之前，按照清单事先准备好所需试剂、耗材和样品，一次性带入。

7.2 确认实验区已消毒后，带入实验物品，登记，进入实验区。

7.3 凡在生物安全柜内进行的操作均须按照《生物安全柜的使用及标准操作程序》执行。

7.4 准备废弃物容器及消毒液（见《废物处理程序》）。

7.5 在生物安全柜内铺好一次性垫纸，在其上放置用有效氯含量为0.55%的84消毒液浸泡过的纱布。

**8 步骤**

8.1 低温保存液体菌种接种操作步骤：

8.1.2 在安全柜内打开菌种管包装，检查菌种管是否破裂，并在安全柜内室温下解冻备用。溶解后用1ml吸管吹吸菌液使菌液均匀，然后一次性吸取菌液100μl。

8.1.3 加到盛有900μl生理盐水的EP管中，以10-1，10-2，10-3，10-4连续倍比稀释。

8.1.4 取已凝固的琼脂平板，取10-3或10-4稀释菌液0.1-0.2ml，用无菌L型玻璃棒将菌液在平板上涂抹均匀，将涂抹好的平板平放于桌上20-30 min，使菌液渗透入培养基内，然后将平板倒转，30℃保温培养。培养过程中注意观察菌体生长及污染情况。

8.2 冻干菌种接种操作步骤：

8.2.1 在安全柜台内打开菌种管外包装，检查菌种管是否破裂，在外表擦拭酒精，用砂轮或玻璃刀划口，用纱布垫手掰开菌种管, 用1ml移液管汲取1.0ml生理盐水或稀释LB培养基，缓慢加入菌种管, 轻轻吹吸菌液使菌液均匀，避免形成气泡，然后一次性吸取菌液。加到盛有生理盐水的24板孔中，以10-1，10-2，10-3，10-4连续倍比稀释。

8.2.2 取已凝固的琼脂平板，取10-3或10-4稀释菌液0.1ml，用无菌L型玻璃棒将菌液在平板上涂抹均匀，将涂抹好的平板平放于桌上20-30 min，使菌液渗透入培养基内，然后将平板倒转，30℃保温培养。培养过程中注意观察菌体生长及污染情况。

**9 实验后操作**

9.1 操作结束后，及时清理生物安全柜内的物品，用75％酒精擦拭外表面后，移出生物安全柜放入冰箱中，并开启紫外灯照射30分钟。

9.2 将实验区内的污染材料按文件《假结核耶尔森氏菌实验室清场及污物、废物处理标准操作程序》高压处理后拿出实验室，置缓冲走廊生物安全垃圾桶内，集中高压处理。

9.3 用新鲜配制的有效氯含量为0.5%的次氯酸钠消毒液（原液：水=1：9）擦拭工作台面、生物安全柜内壁及台面,继续运行20min后关闭风机，填写设备运行记录。

9.4 确定实验区内无本次操作遗留的物品、标签、记录等物，如实填写实验记录。

9.5 检查实验室内负压系统及设备运行是否正常、安全，并填写完各种登记表格后退出。

**10 支持性文件**

10.1世界卫生组织《实验室生物安全手册》（第三版），日内瓦，2004

10.2实验室生物安全基础知识。中国计量出版社，2004。

10.3《实验室生物安全通用要求》（GB19489－2008）。

**假结核耶尔森氏菌菌种收集的标准操作程序**

**1 目的**

正确地收集假结核耶尔森氏菌，并且防止在收集过程中产生泄漏，保证环境和人员的安全。

**2 适用范围**

假结核耶尔森氏菌传代过程中的收集和分装。

**3 职责**

从事假结核耶尔森氏菌实验操作的人员。

**4 内容**

4.1 从假结核耶尔森氏菌的培养平板上收集菌种

4.2 制备成单细胞悬液，确定菌液浓度

**5 试剂和材料**

5.1.1 CIN琼脂（Cefsulondin-lrgasan-Novobioein Agar）培养基平板

5.1.2 CIN（Cefsulondin-lrgasan-Novobioein）液体培养基

**6 仪器设备**

6.1 低温冰箱

6.2 生物安全柜

6.3 恒温箱

**7 耗材**

7.1 一次性垫纸、稀释用1.5毫升离心管

7.21ml、5ml和10ml一次性无菌吸管

7.3 2ml注射器、冻存管

7.4 0.5%次氯酸钠消毒液，含75%的喷壶

7.5 废液缸，生物安全垃圾袋

**8 步骤**

8.1 菌株的接种：菌株的接种在生物安全柜进行。

8.1.1 划线法：

此法主要用于菌种分纯，获得单菌落。由接种环沾取少许待分离的材料，在无菌平板表面进行平行划线、扇形划线或其他形式的连续划线，微生物细胞数量将随着划线次数的增加而减少，并逐步分散开来，如果划线适宜的话，微生物能一一分散，经培养后，可在平板表面得到特征性单菌落。

8.1.2 涂布法：

此法主要用于菌落总数计数。先将培养基熔化后趁热倒入无菌平板中，然后用无菌吸管吸取0.1 mL菌液接种在已凝固的琼脂平板上。再用无菌L型玻璃棒将菌液在平板上涂抹均匀，将涂抹好的平板平放于桌上20-30 min，使菌液渗透入培养基内，然后将平板倒转，保温培养，至长出菌落后即可计数。

8.1.3 液体培养基接种法：

此法主要用于菌液比浊实验。用灭菌接种环挑取菌落或标本，在试管内壁与液面交界处轻轻研磨，使细菌均匀得散落在液体培养基中。

8.1.4 菌株的培养：将以上中生长的单菌落接种到CIN液体培养基中，30℃有氧条件下200 rpm培养，过夜。（固体培养基为琼脂培养基）

8.1.5 分装冻存培养液，每管1ml。按照要求填《菌毒种入库标准》、《入库流程》编写冻存管编号，冻存位置。

**9 支持文件**

9.1《实验室生物安全分级操作管理规范》

9.2《生物安全柜标准操作程序》

9.3《意外事故应急预案》

**假结核耶尔森氏菌菌种鉴定的标准操作程序**

**1 目的**

对接收的假结核耶尔森氏菌菌种进行种间和种内鉴定和分型，明确菌种。

**2 适用范围**

已接收的假结核耶尔森氏菌菌种进行鉴定。

**3 职责**

进行假结核耶尔森氏菌操作的实验人员。

**4 内容**

实验室采用的菌种鉴定实验流程如下：

4.1 生化鉴定

（1）按照《假结核耶尔森氏菌培养的标准操作程序》接种培养菌种至CIN液体培养基。

（2）将培养1天的菌液划线接种于麦康凯和CIN琼脂平板，置平板于30℃培养箱培养1天。

（3）检查麦康凯琼脂平板，假结核耶尔森氏菌的菌落为小的（直径1-2mm）、偏平、无色的或淡粉红色菌落。同时检查CIN平板，假结核耶尔森氏菌的菌落为具有紧红色中心整个边缘明显无色的小菌落(类牛眼，直径1-2mm）。

（4）用接种针将所选菌落穿刺接种于赖氨酸精氨酸铁琼脂（LAIA）斜面，室温培养48小时。在LAIA中的培养物会产生碱性斜面，酸性底层，不产生气体和H2S的反应，被认为是尿素酶阳性的可疑耶氏菌。

（5）将LAIA上的菌落接种于生化试验培养基，置室温培养3天。结果为尿素、甘露醇阳性，H2S、吲哚、山梨醇、VP、枸橼酸盐、赖氨酸、鸟氨酸阴性者，鉴定为假结核耶尔森氏菌。

4.2 经革兰氏染色为阴性。

4.3 分子生物学方法分析16S rRNA序列来鉴定。

 以上实验在BSL-2实验区进行，实验人员按照《假结核耶尔森氏菌培养的标准操作程序》进行实验。

（1） PCR引物和测序引物：

16S rRNA序列分析法，16S rDNA的通用引物如下：上下游引物序列分别为:5′-GGAGTTAGCCGGTGCTTCTT-3′和5′-TGCCTGATGGAGGGGGATAA-3′，测序引物与扩增引物相同。

（2） 仪器与试剂

37°恒温培养箱、高压灭菌锅（Tomy公司）、PCR仪、生物安全柜。

（3）实验方法

（1） 菌株的操作：

所有实验活动应严格避免使用玻璃仪器和注射针头。操作动作要轻柔勿剧烈操作，以防止产生气溶胶和液体溅出。

（2）按照《假结核耶尔森氏菌培养标准操作》培养，并观查菌落形态，并进行革兰氏染色方法染色。

（3） 菌DNA的提取：

 参考 DNA提取试剂盒说明书。菌液的操作在生物安全柜中进行，残余菌液进行灭菌处理。菌液的操作在生物安全柜中进行，残余菌液进行灭菌处理。

（4）PCR 扩增，在培养平板上无菌挑取单个菌落直接加入到反应体系中进行菌落PCR扩增，反应体系(50μL)：

2×Taq PCR Master Mix 20μL

引物各 0.5μL

超纯水 29μL

 反应条件：

95℃预变性3min，

95℃循环变性30s

53℃退火复性30s 30个循环

72℃延伸1min30s

 72℃终延伸8min，最后4℃保存。

 反应结束后产物经1%琼脂糖凝胶电泳，长度382bp。用琼脂凝胶回收试剂盒将PCR产物回收后，送上海英骏生物技术有限公司测序。

**5 支持性文件**

5.1世界卫生组织《实验室生物安全手册》（第三版），日内瓦，2004

5.2中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局、中国国家标准化管理委员会发布。《实验室生物安全通用要求》(GB19489-2008)

5.3王宇主编.实验室生物安全国内外法规和标准汇编.北京大学医学出版社

5.4实验室生物安全基础知识。中国计量出版社，2004。

﻿5.5 GB4789.5 2012国家标准法检验程序。

**假结核耶尔森氏菌菌种转运的标准操作程序**

**1 目的**

确保菌种正确转运，并防止菌种在转运过程中的泄漏，保证环境和人员的安全。

**2 适用范围**

假结核耶尔森氏菌从接收区转运到实验操作区，及从实验操作区转运到保藏区的过程中。

**3 职责**

从事假结核耶尔森氏菌实验操作的人员。

**4 内容**

4.1 菌种从接收区到实验区及保藏区之间的转运

4.2 做好相关的感染性材料的记录

4.3 步骤

4.1.3.1 将运输箱放入传递窗中。

4.1.3.2 实验员按照BSL-2支持文件《实验人员防护要求和标准操作程序》及BSL-2的实验室安全操作手册中《工作人员进出实验室程序》，进入到BSL-2实验室内从缓冲走廊，打开传递窗打开传递窗，内部转运箱表面用75%酒精消毒后，

将桶拿进BSL-2核心区生物安全柜内。

4.1.3.3 缓慢打开保温桶盖，用长柄镊子夹出装有细菌的冻存管或其他形式样品管。

4.1.3.4 用75%酒精消毒细菌管外部，按需要在生物安全柜中分装。填写菌种分装记录。

4.1.3.5 用75%酒精消毒分装好的菌种冻存管，装入运输箱的保温桶，外部用75%酒精消毒。

4.1.3.6 参考体系文件《实验生物安全柜使用和消毒标准操作程序》，清理生物安全柜内物品，废弃物进行高压灭菌，按《高压锅灭菌标准操作程序》操作，并记录。操作者手部和全身酒精喷洒消毒后，将保温桶拿出到缓冲走廊。

**5 支持性文件**

5.1世界卫生组织《实验室生物安全手册》（第三版），日内瓦，2004。

5.2中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局、中国国家标准化管理委员会

发布。《实验室生物安全通用要求》(GB19489-2008) 。

5.3王宇主编。实验室生物安全国内外法规和标准汇编。北京大学医学出版社，2007。

5.4实验室生物安全基础知识中国计量出版社，2004。

**假结核耶尔森氏菌菌种保藏的质量控制标准操作程序**

**1 目的**

加强假结核耶尔森氏菌菌种的安全管理，确保菌种保藏的活性和纯度。

**2 适用范围**

混悬液保存在-80℃和液氮的假结核耶尔森氏菌菌种的日常管理。

**3 职责**

假结核耶尔森氏菌菌种管理人员。

**4 材料**

4.1CIN液体和CIN琼脂培养基平板

4.2 生理盐水

**5 仪器设备**

5.1 低温冰箱

5.2 生物安全柜

5.3 恒温生化培养箱

**6 耗材**

6.1 一次性垫纸

6.2 EP管

6.3 100μl，1ml的带滤芯的加样枪头，及100μl，1ml加样枪

**7 实验前准备**

7.1 进入BSL-2级实验室之前，按照清单事先准备好所需试剂、耗材和样品，一次性带入。

7.2 确认实验区已消毒后，带入实验物品，登记，进入实验区。

7.3 凡在生物安全柜内进行的操作均须按照BSL-2实验室标准操作《实验生物安全柜标准操作程序》执行。

7.4 准备废弃物容器及消毒液（见《消毒剂配制》）。

7.5 在生物安全柜内铺好一次性垫纸，在其上放置用有效氯含量为0.5%的次氯酸钠消毒液浸泡过的纱布。

**8 步骤**

8.1 取出悬浮液保存在-80℃菌种。按照《菌种的转运标准操作》，将菌种从冷冻区转运至BSL-2实验区。

8.2 取5个EP管，向管中加入900μl生理盐水，连续加5个孔。

8.3 开启生物安全柜，铺好一次性垫纸

8.4 取出保存在 4℃的菌悬液（15%丙三醇），在生物安全柜中用100μl加样枪取出100ul菌悬液，加到盛有生理盐水的板孔中，以10-1，10-2，10-3，10-4，10-5连续10倍倍比稀释。

8.5 从 10-1，10-2，10-3，10-4，10-5稀释的菌液中各取100μl接种于LB固体培养基，放30℃恒温培养箱中培养，观察并计数菌落数。

8.6 每6个月做一次活性验证，根据活性情况，或-80℃最长保存3年后，须按高压灭菌销毁并复苏新的菌种。

**9 实验后操作**

9.1 操作结束后，及时清理生物安全柜内的物品，用75％酒精擦拭外表面后，移出生物安全柜，并开启紫外灯照射30分钟。

9.2 将需要销毁的剩余菌种和实验区内的污染材料按《实验室清场及污物、废物处理标准操作程序》高压处理后拿出实验室，置缓冲走廊生物安全垃圾桶内，集中高压处理。填写《感染性材料流向表》及《高压锅使用记录》。

9.3 确定实验区内无本次操作遗留的物品、标签、记录等物，如实填写实验记录。

9.4 检查实验室内负压系统及设备运行是否正常、安全，并填写完各种登记表格后退出。

**10 支持性文件**

10.1世界卫生组织《实验室生物安全手册》（第三版），日内瓦，2004。

10.2中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局、中国国家标准化管理委员会

发布。《实验室生物安全通用要求》(GB19489-2008) 。

10.3王宇主编。实验室生物安全国内外法规和标准汇编。北京大学医学出版社，2007。

10.4实验室生物安全基础知识中国计量出版社，2004。

### 假结核耶尔森氏菌实验人员防护要求和标准操作程序

**1 目的**

假结核耶尔森氏菌实验个人有效防护，合理选择、使用和正确消毒个人防护装备，保护实验人员免于感染。

**2 适用范围**

人员进入假结核耶尔森氏菌实验室的个人防护装备的选择、使用和消毒。

**3 职责**

从事假结核耶尔森氏菌实验人员必须具有从事病毒实验的工作经验。

**4 材料**

4.1 BSL-2实验室专用工作服

4.2 鞋套

4.3 一次性帽子

4.4防护服

4.5 一次性乳胶手套

4.6口罩

**5 内容**

5.1 提前换上BSL-2实验室专用工作服。

5.2进入一更前观察核心区各室工作状态指示灯，正常方可进入BSL-2实验室。

5.3用磁卡开门从人员入口进入第一更衣室，填写《实验室进出登记表》，打开通风装置，穿上鞋套。

5.3.1戴一次性手术帽，要求遮住头发；

5.3.2从衣柜中取出防护服穿上，带第一层乳胶手套，并用乳胶手套袖端将防护服袖口覆盖；

5.3.3戴口罩，按照操作者流感部尺寸调整口罩的流感金属夹，保证做到呼出和吸入气体确实通过口罩过滤。

5.4进入实验室。

**6 穿戴个人防护装备的方法和注意事项**

6.1BSL-2实验室专用工作服：换上实验室专用工作服。

6.2一次性鞋套穿上一次性鞋套。

6.3一次性帽子：戴帽要求遮住头发。

6.4 一次性乳胶手套：在戴乳胶手套前要先查漏。乳胶手套袖端将隔离服袖口覆盖。

6.5口罩：根据流感部尺寸自行调整生物安全专业防护口罩的流感金属夹，吹一口气，感觉口罩边缘是否漏气，保证做到呼出和吸入气体确实通过口罩过滤。

**7 出实验室步骤**

7.1出BSL-2实验室之前，用75%酒精对手部进行消毒，然后将全身喷洒一遍，包括手套。对使用仪器设备、空气、地面进行消毒。

7.2走到缓冲间，脱去口罩、手套、防护服、帽子，鞋套放到污物桶中。

**8 脱去个人防护装备的方法和注意事项**

8.1一次性乳胶手套：用75%酒精喷手消毒，将手套向外卷脱掉，放到污物桶中。

8.2防护服：用75%酒精将全身喷洒一遍，打开衣扣，脱下防护服，挂到衣柜中。

**9 参考文献**

9.1 WHO实验室生物安全手册（第三版）

9.2 王宇主编.实验室生物安全国内外法规和标准汇编.北京大学医学出版社

9.3 《实验室生物安全基础知识》

9.4 WHO ANIMAL INFLUENZA MANUAL .WHO/CDS/CSR/NCS/2002.5

### 假结核耶尔氏菌实验后清场及污物、废物处理

### 标准操作程序

**1 目的**

保证从事假结核耶尔氏菌实验活动的实验室，在每天实验活动结束后顺序清场，合理处置污物、废物，防止生物有害物质的泄露、污染。

**2 适用范围**

假结核耶尔氏菌实验活动结束当天及整体实验结束后，生物安全柜、仪器设备、实验环境、空气及动物实验废物的消毒处理。

**3 职责**

从事假结核耶尔氏菌实验的实验人员。

**4 材料和准备**

4.1 75%医用消毒酒精及喷壶

4.2 有效氯含量为0.5%的次氯酸钠消毒液

2L有效氯含量为0.5%的次氯酸钠消毒液的配制方法：用塑料量筒量取200mL有效氯含量为5%的 次氯酸钠消毒液原液，将其轻轻倒入准备好的塑料容器内，再量取1800mL水，倒入，混匀备用，包括台面和地面的擦拭。此消毒液必须现用现配。

4.3高压灭菌器

4.4紫外灯

4.5 一次性纸巾

**5 步骤**

实验室实验结束后清理实验室，包括生物安全柜、仪器设备、实验环境、空气等，根据具体实验情况选择清场项目。

5.1 清理生物安全柜

5.1.1需要冷冻保存的标本放入冻存盒，用75%的酒精喷洒冻存盒表面，放入BSL-2级实验室冰箱保存，填写《样品保存记录》。

5.1.2清理生物安全柜内的物品，包括加样器、吸头盒等实验用材料，用75%的酒精喷洒，消毒物品表面，置于生物安全柜左侧。

5.1.3将生物安全柜中固体垃圾桶中的垃圾袋袋口收紧，用高压化学指示带缠绕封口**，**75%的酒精喷洒表面，放入高压灭菌器中的桶内高压。垃圾桶套上干净垃圾袋，置于生物安全柜右侧。

5.1.4 生物安全柜中加有有效氯含量为0.5%的次氯酸钠消毒液的液体垃圾桶，放在生物安全柜中过夜。第二天用高压化学指示带封口**，**75%的酒精喷洒表面，放入高压灭菌器中的桶内高压。

5.1.5轻轻卷起垫纸，装入垃圾袋中，并移入高压灭菌器桶中高压。

5.1.6用新鲜配制的有效氯含量为0.5%的次氯酸钠消毒液擦拭生物安全柜内壁及台面(注意：不要擦拭顶棚!)，继续运行20min后关闭风机，打开紫外灯。填写《仪器设备使用记录》。

5.2 消毒实验室使用的仪器

5.2.1显微镜

将医用纱布浸泡在新鲜配制的有效氯含量为0.5%的次氯酸钠消毒液内，拧干多余的液体，擦拭载物台表面、推动器旋钮、粗动螺旋、微动螺旋、开关等部位。

5.2.2 离心机

（1）清理离心机内物品，用75%的酒精喷洒转头表面、离心机内壁及转头盖子等部位消毒，纸巾擦干，清水重复一次。

（2）关闭离心机上盖，将医用纱布浸泡在新鲜配制的有效氯含量为0.5%的次氯酸钠消毒液内，拧干多余的液体，擦拭离心机外表面，重点擦拭手触及部位。

5.2.3 冰箱（-80℃冰箱及4℃冰箱**）**

将医用纱布浸泡在新鲜配制的有效氯含量为0.5%的次氯酸钠消毒液内，拧干多余的液体，擦拭冰箱外表面，重点擦拭冰箱把手等手触及部位。

5.2.4 核酸提取仪

（1）清理核酸提取仪内物品，用75%的酒精喷洒核酸提取仪内壁，纸巾擦干。

（2）将医用纱布浸泡在新鲜配制的有效氯含量为0.5%的次氯酸钠消毒液内，拧干多余的液体，擦拭核酸提取仪外表面，重点擦拭手触及部位。

（3）打开仪器自动消毒程序，紫外灯管照射。

5.2.5 培养箱

将医用纱布浸泡在新鲜配制的有效氯含量为0.5%的次氯酸钠消毒液内，拧干多余的液体，擦拭 培养箱外表面，重点擦拭内部玻璃门把手及外部门把手等手触及部位。

5.3 地面消毒

用墩布浸泡在新鲜配制的有效氯含量为0.5%的次氯酸钠消毒液内，拧干多余的液体，擦拭地面。

5.4 高压消毒

将实验区内所有需要高压的废物放入高压灭菌器的桶内，放入化学指示条，进行121℃30分钟高压处理后拿出实验室，置工作走廊的生物安全垃圾桶内，集中高压处理。

**6 支持性文件**

6.1 世界卫生组织《实验室生物安全手册》（第三版），日内瓦，2004

6.2中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局、中国国家标准化管理委员会发布。《实验室生物安全通用要求》(GB19489—2008)

6.3 王宇主编.实验室生物安全国内外法规和标准汇编.北京大学医学出版社

6.4 实验室生物安全基础知识