# 非结核分枝杆菌标准操作程序文件

|  |  |
| --- | --- |
| 编号 | 名称 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-316-01 | 非结核分枝杆菌菌种接收的标准操作 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-316-02 | 非结核分枝杆菌菌种复苏的标准操作 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-316-03 | 非结核分枝杆菌菌种冻存的标准操作 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-316-04 | 非结核分枝杆菌菌种培养的标准操作 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-316-05 | 非结核分枝杆菌菌种收集的标准操作 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-316-06 | 非结核分枝杆菌菌种鉴定的标准操作 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-316-07 | 非结核分枝杆菌菌种转运的标准操作 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-316-08 | 非结核分枝杆菌菌种的质量控制标准操作 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-316-09 | 非结核分枝杆菌个人防护要求和标准操作程序 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-316-10 | 非结核分枝杆菌实验后清场及污物、废物处理标准操作程序 |

**非结核分枝杆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**

结核菌从接收区接收，传递到BSL-2实验室并分装或冻存的过程中。

**3 职责**

3.1实验人员向分中心主任提出非结核分枝杆菌操作的申请，经批准后，到菌株保管责任人处领取相应实验材料。

3.2 不同的实验严格按照实验要求到不同的实验室进行操作。

3.3 严格按照操作规程进行操作，如实填写申请、使用和销毁的记录。

**4 内容**

4.1非结核分枝杆菌的接收：

4.1.1菌株保存时进行登记备案，记录名称、数量、提供单位、来源、状态、接收日期、菌株编号等。

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菌种保存管上应有牢固的标签，标明样本名称、代次、批号、传代日期等。固定的标签或标牌应可耐受水汽浸泡或超低温冷冻，始终保持标注的内容清晰可辨。

4.1.3进行保存的样本应至少保存2份，一份供定期移种或传代，一份供经常移种或传代用，传代时间、代次均须详细记录。

4.1.4保存的样本传代或冻存均应填写专用记录。每年对样本进行整理，核查。

4.1.5对新引进的样本，至少备份2份，分别储存在两个适宜贮存条件的专用区，以防因设备故障导致样本的变异和死亡。

4.1.2运输容器：

就地转送的（从一个实验楼携带到另一个实验楼等的短距离移动）病原微生物或含病原微生物的样品、容器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。

长途运输的病原微生物或含病原微生物的样品、容器需满足《微生物菌种资源收集、整理、保存技术规程汇编》相关内容。航空运输的含病原微生物和生物样本的容器或包装材料应满足国际民航组织《危险品航空安全运输技术细则》规定的B类包装要求。最外层的容器或包装材料上应具备生物安全警示标识。

4.1.3步骤：

4.1.3.1检查包装，如完好，将样本包装箱通过传递窗送入BSL-2实验室，并将样本清单带入实验室；如有破损，应立即报告安全员，由安全员评估后决定处理措施。

4.13.2样本二级包装应在生物安全柜中打开，检查标本完整性和保存状态，按清单清点样本种类、数量和性状，记录并签字确认。

4.1.3.3根据样本性质和检验目的，样本打开后应及时进行检测。不能立即检测的，应放入专用容器中，储存在指定的位置。若内包装已破损，应决定样本是否尚能挽救，并采取规定方法立即进行检验。无法挽救者，进行销毁并做好记录。撤除的包装一并放入医用废物袋中统一进行销毁。

4.1.3.4若为培养物，应及时进行转种，进行必要的鉴定并转化成保存状态。撤除的包装一并放入医用废物袋中统一进行销毁。

4.1.3.5实验室内样本和培养物的取放都应按规定置于专用容器内，才能取出生物安全柜，放入冰箱、培养箱或其他指定位置。

4.1.3.6实验结束后，按照《废物处理标准操作程序》进行清场。

**5 支持性文件**

5.1《实验室生物安全基础知识》

5.2《实验室生物安全管理规范》

5.3《BSL-2实验室管理规范》

5.4《实验室生物安全分级操作管理规范》

5.5《生物材料危害评估规范》

5.6《生物材料管理规范》

**非结核分枝杆菌菌种复苏的标准操作程序**

**1 目的**

加强非结核分枝杆菌菌种的安全管理，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**

非结核分枝杆菌菌种的日常管理。

**3 职责**

非结核分枝杆菌菌种实验操作人员。

**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菌种的使用需要主任批准，填写《菌种交接单》。具体操作见SOP《结核菌菌种的接收标准操作程序》

5.2使用时填写《菌毒种冻存及使用记录》

**6 菌种的运输**

6.1选择菌种运输桶，检查包装，如完好，将样本包装箱通过传递窗送入BSL-2实验室，并将样本清单传真入实验室；如有破损，应立即报告生物安全员，由生物安全员评估后决定处理措施。

6.2 样本二级包装应在生物安全柜中打开，检查标本完整性和保存状态，按清单清点样本种类、数量和性状，记录并签字确认。

6.3 根据样本性质和检验目的，样本打开后应及时进行检测。不能立即检测的，应放入专用容器中，储存在指定的位置。若内包装已破损，应决定样本是否尚能挽救，并采取规定方法立即进行检验。无法挽救者，进行销毁并做好记录。撤除的包装一并放入医用废物袋中统一进行销毁。

6.4若为培养物，应及时进行转种，进行必要的鉴定并转化成保存状态。每份培养物都必须登记增殖数量、分装支数、鉴定结果和鉴定后培养物的销毁时间。若不能立即转种，应登记后将原培养物储存在菌（毒）种保藏分中心指定位置。若培养皿或试管已破损，应决定是否尚能挽救，并及时进行转种。无法挽救者，进行销毁并做好记录。撤除的包装一并放入医用废物袋中统一进行销毁。

6.5 实验室内毒株（样本）和培养物的取放都应按规定置于专用容器内，才能取出生物安全柜，放入冰箱、培养箱或其他指定位置。

6.6实验结束后，按照《实验后清场及污物、废物处理标准操作程序》进行清场。

**7 菌种的复苏培养**

在生物安全柜中取出100μl菌液，加到盛有生理盐水的EP管，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，菌阴静置30分钟后，从中各取100μl接种于罗氏培养基或7H9液体培养基中培养，放37℃恒温培养箱中培养3-4周，复苏菌种。

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，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《实验室生物安全基础知识》

9.2《实验室生物安全管理规范》

9.3《BSL-2实验室管理规范》

9.4《实验室生物安全分级操作管理规范》

9.5《生物材料危害评估规范》

9.6《生物材料管理规范》

**10 参考文献**

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- 2004)

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。

**非结核分枝肝菌菌种冻存的标准操作程序**

**1 目的**

加强非结核分枝杆菌菌种的安全管理，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**

非结核分枝杆菌菌种的日常管理。

**3 职责**

非结核分枝杆菌菌种管理人员。

**4 菌种保藏**

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、孵育前抗酸染色菌体形态（直接涂片镜检是阳性结果的标本）、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、菌落经抗酸染色后的镜检情况（包括菌体形态、细菌菌体索状聚集情况、菌体易染颗粒情况）、结果报告时间、分离培养的实施者。

4.3将非结核分枝杆菌充分悬浮于冻存溶液（6g胰蛋白胨溶于100mL /15%丙三醇水溶液）中，保藏在-80℃冰箱中。使用该方法，大部分分枝杆菌能保存5年以上。

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结核分枝杆菌分装到冻存管，每管1mL。

4.5 管上用记号笔标明细菌种类、冻存号、时间等信息。

4.6菌种外部用75%酒精消毒后转入生物安全运输箱的塑料桶，75%酒精消毒后放入生物安全运输箱，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。

1. **支持性文件**

5.1《实验室生物安全基础知识》

5.2《实验室生物安全管理规范》

5.3《BSL-2实验室管理规范》

5.4《实验室生物安全分级操作管理规范》

5.5《生物材料危害评估规范》

5.6《生物材料管理规范》

**6 参考文献**

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—2004)

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，2007。

6.4实验室生物安全基础知识。中国计量出版社，2004。

**非结核分支杆菌菌种培养的标准操作程序**

**1 目的**

正确地进行非结核分枝杆菌菌种培养，避免菌种污染，以及防止非结核分枝杆菌泄漏，保证环境和人员的安全。

**2 适用范围**

此SOP适用于本实验室内操作非结核分枝杆菌的所有实验人员。

**3 职责**

从事非结核分枝杆菌实验操作的人员。

**4 试剂和材料**

4.1非结核分枝杆菌

4.2罗氏培养基斜面

4.3 7H9培养基

**5 仪器设备**

5.1－80 ℃冰箱

5.2普通冰箱

5.3生物安全柜

5.4 相应的消毒灭菌设备

**6 场所：**

BSL-2实验室，需要在生物安全柜中无菌操作。

**7 实验前准备**

7.1进入实验场所之前，要事先准备好所需试剂，样品。预约BSL-2实验室，

并看前一位实验者是否已经清场，是否有记录。

7.2确认实验区已消毒后，消毒所带入物品，登记，进入实验区。

**8 步骤**

6.1 菌株的接种：

（1）划线法：

此法主要用于菌种分离纯化，获得单菌落。由接种环沾取少许待分离的材料，在罗氏培养基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，可在平板表面得到单菌落。

（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经不同稀释倍数稀释后的10-3-10-4 倍数的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37℃培养，至长出菌落后即可计数。

（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。

8.2 菌株的培养：

挑取单菌落接种在7H9培养基中，37 ℃有氧或无氧条件下200 rpm培养两周后收取。（固体培养基为酸性罗氏培养基1.5 %琼脂培养基）。

8.3 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。

**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BSL-2支持文件《结核分枝杆菌（实验室菌株）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，再次用75%的酒精擦拭，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，如实填写实验记录并用传真机传出。

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。

9.2填写实验室和仪器使用记录和清场记录

**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）。

**非结核分枝杆菌菌种收集的标准操作程序**

**1 目的**

正确地收集非结核分枝杆菌，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**

海分枝杆菌传代过程中的收集和分装。

**3 职责**

从事非结核分枝杆菌实验操作的人员。

**4 内容**

4.1 从非结核分枝杆菌的培养斜面上收集菌种

4.2 制备成单细胞悬液，确定菌浓度

**5 试剂和材料**

5.1培养基

5.1.1罗氏培养基斜面

5.1.2 稀释苏通综合培养基

5.1.3 生理盐水

**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玻璃株（塑料）研磨器，磨菌瓶

7.21ml、5ml和10ml一次性无菌吸管

7.3冻存管

7.4 0.5%的次氯酸钠消毒液，含75%的喷壶

7.5 废液缸，生物安全垃圾袋

**8 步骤**

8.1检查培养物是否污染，在安全柜台内拔出胶塞，加入生理盐水或稀释苏通培养基2ml，用1ml移液管涂抹斜面培养物，使其由斜面脱落。

8.2用1ml吸管吹吸菌液，将菌液转入玻璃研磨器，研磨使菌液均匀，静置30分钟后进行下一步实验。

8.3 制备单细胞悬液：将上述研磨后的上清转入另一个磨菌瓶中中，用生理盐水调整体积，麦氏浊度仪测得浊度，1OD为含有107 个细胞。

8.4 将同批次收集的单细胞悬液分装成1ml/管，制备种子批。

8.5计数：从分装的单细胞悬液中取出100ul菌液，在EP管中进行10-1,10-2,10-3，10-4，10-5的梯度稀释，从10-4，10-5稀释度的菌液中取100μl，接种于L-J罗氏固体培养基的试管，拔出胶塞，加入菌液0.1mL。37℃培养3-4周，培养过程中注意观察菌体生长及污染情况。

**9 实验后操作**

实验结束后，按照《实验后清场及污物、废物处理标准操作程序》进行清场。

1. **支持性文件**

10.1《实验室生物安全基础知识》

10.2实验室生物安全管理规范》

10.3《BSL-2实验室管理规范》

10.4《实验室生物安全分级操作管理规范》

10.5《生物材料危害评估规范》

10.6《生物材料管理规范》

**11 参考文献**

11.1中国防痨协会基础专业委员会《结核病诊断实验室检验规程》，中国教育文化出版社，2006

11.2结核病防治 王陇德主编 中国协和医科大学出版社

11.3 现代结核病学 谢惠安等主编 人民卫生出版社

11.4世界卫生组织《实验室生物安全手册》（第三版），日内瓦，2004

11.5实验室生物安全基础知识。中国计量出版社，2004。

11.6《实验室生物安全通用要求》（GB19489－2008）

11.7《结核病学》（严碧涯主编，2003年北京出版社出版）

11.8《结核病学实验技术》（闰国蕊主编，2001年郑州大学出版社出版）

11.9《结核病诊断实验室检验规程》（中国防痨协会基础专业委员会，2006）

11.10《分枝杆菌病实验诊断规范》（王金良主编，2006年上海科学技术出版社）

**非结核分支杆菌菌种鉴定的标准操作程序**

**1 目的**

对接收的菌种进行种间和种内鉴定，明确菌种。

**2 适用范围**

已接收的非结核分支杆菌菌种进行鉴定。

**3 职责**

进行非结核分支杆菌菌种操作的实验人员。

**4 内容**

实验室采用的菌种鉴定实验流程如下：

4.1 经抗酸染色镜检确定是抗酸菌的培养阳性菌株，必须首先接种改良罗氏培养基进行增菌传代。

4.2 进行分枝杆菌菌种鉴定，首先经对硝基苯甲酸（PNB）生长试验，28℃生长试验、耐热触酶试验、观察细菌的生长速度、菌落形态和菌落颜色确定该菌株属于结核分枝杆菌复合群还是非结核分枝杆菌。

4.3 经菌群鉴定试验确定属于非结核分枝杆菌菌株，需要继续进行菌种鉴定。

4.4 属于NTM的菌株，首先根据生长速度的快慢确定属于快速生长还是缓慢生长的分枝杆菌。快速生长的分枝杆菌可通过生长特征和生化试验进行菌种鉴定；缓慢生长的分枝杆菌经色素产生试验确定菌株的产色特征后，再通过生长特征和生化试验确定菌株的种类。

4.5 上述实验仍然不能鉴定的菌株，可以采用分子生物学方法分析16S rRNA序列和16S-23S rRNA转录间隔区（ITS)序列来鉴定。

**5 实验材料和仪器**

5.1 PCR引物和测序引物

16S rRNA序列分析法所用上游引物为5′-ACCAACGATGGTGTGTCCAT-3' ，下游引物为5′-CTTGTCGAACCGTATACCCT -3'，测序引物与扩增引物相同。

5.2仪器与试剂

低温培养箱、CO2培养箱、恒温培养箱、高压灭菌锅、电子天平、生物安全柜。孔雀石绿、KH2PO4、马铃薯粉、丙三醇、硝酸、苦味酸、NaCl等试剂均由国药化学试剂公司提供，味精由沈阳红梅味精股份有限公司生产，柠檬酸镁由北京旭东化工有限公司生产，MgSO4由上海美兴化工有限公司提供。7H9培养基由BD公司提供，噻吩-2-羧酸肼（TCH）、硝基苯甲酸（PNB）等由Sigma公司生产。

5. 3 改良罗氏培养基的配制

配置量1000mL：天冬素2.25g或味精4.5g；

KH2PO4 1.5g；

柠檬酸镁 0.325g；

硫酸镁 0.15g；

马铃薯粉 18.8g。

加入7.5mL的甘油，375mL蒸馏水，100℃水浴，不断摇晃至液体变成半透明状，转移到高压灭菌锅115℃灭菌20min。

将鸡蛋用酒精灭菌处理以后，蛋液打入搪瓷杯中，取出打蛋器将蛋液打匀。然后将蛋液通过两层纱布滤入L-J基质中，加入10%的浓度为2%的孔雀绿溶液以后摇匀，转入下口瓶中。充分混匀以后分装于每支试管中，每管约7~8mL。88℃烘烤45min，至斜面完全凝固，转移培养基至37℃培养24~48h，观察培养基是否污染，没有污染的转移到2~8℃冷库中保存备用。

### 6 分枝杆菌菌种鉴定

6.1 分枝杆菌菌群鉴定试验

6.1.1 对硝基苯甲酸（PNB）生长试验

结核分枝杆菌复合群在含有PNB的培养基中生长受到抑制；大多数NTM菌种对一定浓度的PNB有耐受性。试验采用PNB培养基（含PNB500mg/mL的改良罗氏培养基）和改良罗氏培养基作为对照培养基，每支培养基接种10-3mg细菌，37℃孵育，每周观察一次结果，同时记录PNB培养基和改良罗氏培养基上菌落生长情况直至孵育4周。

6.1.2 28℃生长试验

NTM菌群的大部分可以在28℃生长。试验采用2支改良罗氏培养基，每支培养基中接种10-3mg细菌；1支置于28℃，1支置于37℃孵育，每周观察一次结果，同时记录罗氏培养基上菌落生长情况直至孵育4周。

6.1.3 耐热触酶试验

多数NTM经68℃处理一定时间后，其过氧化氢酶仍然保持活性，可分解过氧化氢。

试剂：A 1/15M PBS（pH7.0） B30%双氧水 C10%吐温-80水溶液

试验方法：取在改良罗氏培养基上生长旺盛的细菌约5mg，在装有1.5mL试剂A的试管中研磨成菌悬液；放于68℃水浴20min，取出后立即冷却；缓缓加入等量混合的B、C反应液0.5mL。

6.2结核分枝杆菌复合群菌种鉴定试验

一定浓度的TCH对牛结核分枝杆菌和少数结核分枝杆菌有抑制作用，而对大多数结核分枝杆菌无抑制作用。试验采用TCH培养基（含5mg/mLTCH的改良罗氏培养基）和改良罗氏培养基各1支做对照，每支培养基中接种10-3mg细菌；37℃孵育4周时观察结果，同时记录TCH培养基和改良罗氏培养基上菌落的生长情况。

6.3 非结核分枝杆菌菌群生长特征鉴定试验

经菌群鉴定试验被划归NTM菌群的分枝杆菌，如需进行菌种鉴定，应首先进行生长特征鉴定试验。

6.3.1 生长速度试验

传代培养4周的NTM菌株，制备菌悬液并进行稀释；接种2支改良罗氏培养基（10-3mg/支）后，分别置于28℃、37℃孵育；在3天和7天观察结果，以后每周观察一次。

6.3.2色素产生试验

传代培养4周菌龄的NTM菌株，制备菌悬液并进行稀释；然后接种4支改良罗氏培养基（10-3mg/支），其中2支培养基以锡纸或黑纸包裹密封，另2支不包。取2支培养基（1支包纸和1支不包纸）于37℃培养，另2支于28℃培养。

6.3.3 苦味酸培养基生长试验

培养基成分：谷氨酸钠（0.4g）、枸橼酸钠（0.2g）、KH2PO4（0.05g）、苦味酸（0.2g）、MgSO4·7H2O（0.05g），丙三醇（3mL），溶解于97mL蒸馏水中，以10%NaOH调PH至7.0~7.2，加琼脂3g，121℃20min高压蒸汽灭菌，分装试管制成斜面使用。

接种0.1mg细菌至培养基斜面，37℃孵育2周。有菌落生长者为快速生长菌。

6.4 非结核分枝杆菌菌种鉴定用生化特征试验

6.4.1尿素酶试验

试剂：PBS（pH6.7,1/15M），121℃灭菌20min，4℃保存。取PBS配制0.12%尿素，以0.22mm滤膜除菌，每支试管分装3mL。取酚红0.1g加NaOH（1/20M）5.7mL溶解后，加水至100mL，113℃灭菌10min。

试验方法：用吸管挑取在改良罗氏培养基上生长旺盛的细菌约5mg，置于装有3mL0.12%尿素的试管中，每管加入1滴酚红，37℃孵育3天观察结果。

6.5 采用16S rRNA序列分析法对分枝杆菌模式株进行确认

6.5.1 DNA制备：将实验菌株接种于改良罗氏培养基斜面上，慢生长分枝杆菌培养2~3周，快生长分枝杆菌培养5~7 d。将培养物混悬于1ml 0.9%生理盐水中，12000 r/min离心5 min弃上清，加入200 μL TE缓冲液，100℃煮沸15 min，12000 r/min4℃离心20 min，取含有DNA的上清液置于另一灭菌EP管中于－20℃保存备用。

6.5.2 PCR扩增：在50 μL反应体系内PCR扩增，10×PCR buffer 5 μL，上游引物和下游引物终浓度各0.2 μmol/L，4×dNTP终浓度各为0.2 mmol/L，rTaq DNA聚合酶2 U，DNA模板10~15 ng，加双蒸水至50 μL。94℃预变性5 min，扩增条件94℃1 min，64℃1 min，72℃1 min，共30个循环，72℃延伸7 min。

6.5.3 DNA纯化与测序：使用Takara公司生产的DV805A纯化试剂盒回收纯化目的DNA、所有DNA样品送上海生工生物工程公司做上、下游测序并将双向结果拼接后得到最准确序列。

6.5.4 核苷酸序列分析：对所测定序列用Clustalx 1.83软件进行同源性多序列比对，并用邻位相连法（Neighbour Joining, N-J法）绘制16S rRNA 基因序列聚类分析树状谱，使用 DNAStar的MegAlign软件计算相似性百分比。

6.6 采用16S-23S rRNA转录间隔区（ITS)序列分析法对分枝杆菌模式株进行确认。

6.6.1 DNA制备：制备方法与16S rRNA序列分型法相同。

6.6.2 PCR扩增：除引物外，其他与16S rRNA序列分型法相同。

6.6.3 DNA纯化与测序：纯化与测序方法与16S rRNA序列分型法相同。

6.6.4核苷酸序列分析：采用的方法与16S rRNA序列分型法相同。

**7 支持性文件**

7.1《实验室生物安全基础知识》

7.2《实验室生物安全管理规范》

7.3《BSL-2实验室管理规范》

7.4《实验室生物安全分级操作管理规范》

7.5《生物材料危害评估规范》

7.6 Li Weimin, Wang Sumin, Zhang Suxia, et a1.Use of 16SrRNA sepuence analysis methods for identification of Nontuberculosis Mycobacteria. Tuber&Thor Tumor, 2004,3(1):34-37.

7.7 Kirschner P., K Iekenbeck. Genetic heterogeneity within Mycobacterium fortuitum complex species:genotype criteria or identification. J. C lin. Microbiol, 1991, 30:2772-2775.

7.8 Pitulle, C. Phylogeny of rapidly growing members of the genus Mycobacterium. Int. J. Syst. Bacteriol, 1992, 42:337-343.

**非结核分枝杆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**

非结核分枝杆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**

从事非结核分枝杆菌实验操作的人员。

**4 内容**

4.1菌种从接受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

4.3.1将实验用样本从指定保存位置取出，表面喷洒酒精后放入传递窗，再由传递窗拿入实验室；

4.3.2在生物安全柜内将样本取出，认真核实样本信息，确保无误后，将样本重新装入两层带有封口的密封袋或密封装置中，并注明样本名称、数量、状态、毒株编号；

4.3.3表面喷洒75%酒精后，拿出安全柜，送往其他实验室中，并填写菌种流向表。

4.3.4实验结束后按照《实验室生物安全通用要求》进行清场。

**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。

**非结核分枝杆菌菌种保藏的质量控制标准操作程序**

**1 目的**

加强非结核分枝杆菌菌种的安全管理，确保菌种保藏的活性和纯度。

**2 适用范围**

混悬液保存在-80℃和液氮的非结核分枝杆菌菌种的日常管理。

**3 职责**

非结核分枝杆菌菌种管理人员。

**5 仪器设备**

5.1恒温培养箱

5.2 生物安全柜

**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（见实验室标准操作《实验消毒剂配制》）。

7.5实验用品准备，具体见“材料”、“耗材”部分。

7.6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 EP管中加入900μl生理盐水，连续加5个管。

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100μl菌悬液，加到盛有生理盐水的EP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37℃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BSL-2实验室支持文件《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。

9.6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。

10.5《实验人员防护要求和标准操作程序》。

10.6《工作人员进出实验室程序》。

10.7《实验生物安全柜使用和消毒标准操作程序》。

10.8《实验高压锅灭菌使用标准操作程序》

### 非结核分枝杆菌实验人员防护要求和标准操作程序

**1 目的**

非结核分枝杆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**

人员进入非结核分枝杆菌实验室的个人防护装备的选择、使用和消毒。

**3 职责**

从事非结核分枝杆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

9.5 CAMS-CCPM-C-Ⅲ-109&141

### 非结核分枝杆菌实验后清场及污物、废物处理

### 标准操作程序

**1 目的**

保证从事非结核分枝杆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**

非结核分枝杆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、空气及实验废物的消毒处理。

**3 职责**

从事非结核分枝杆菌实验的实验人员。

**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麦氏浊度仪

（1）清理仪器内物品，用75%的酒精喷洒酶标仪内壁，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，擦拭酶标仪表面，重点擦拭手触及部位。

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。

5.2.6生物安全柜

将医用纱布浸泡在新鲜配制的0.5%的次氯酸钠消毒液内，取出，擦洗台面，5分钟后用75%的酒精再次擦拭，继续排风20分钟后，关闭。

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