# 肺炎克雷伯氏菌标准操作程序目录

|  |  |
| --- | --- |
| 编号 | 名称 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-317-01 | 肺炎克雷伯氏菌菌株（样本）接收的操作流程 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-317-02 | 肺炎克雷伯氏菌菌株（样本）复苏的操作程序 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-317-03 | 肺炎克雷伯氏菌菌株（样本）冻存的操作程序 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-317-04 | 肺炎克雷伯氏菌菌株培养的操作程序 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-317-05 | 肺炎克雷伯氏菌菌株收集的标准操作程序 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-317-06 | 肺炎克雷伯氏菌菌株（样本）鉴定的标准操作程序 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-317-07 | 肺炎克雷伯菌菌种转运的标准操作 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-317-08 | 肺炎克雷伯氏菌质量控制准操作程序 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-317-09 | 肺炎克雷伯氏菌个人防护要求和标准操作程序 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-317-10 | 肺炎克雷伯氏菌实验后清场及污物、废物处理标准操作程序 |

**肺炎克雷伯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**

肺炎克雷伯氏菌从接收区接收，传递到BSL-2实验室并分装或冻存的过程中。

**3 职责**

从事肺炎克雷伯氏菌实验活动的实验人员。

**4 内容**

4.1肺炎克雷伯氏菌的接收：

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 实验室内运输使用内部转运箱，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《肺炎克雷伯氏菌实验人员防护要求和标准操作程序》及《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，运输箱外盖。

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。

**肺炎克雷伯氏菌菌种复苏的标准操作程序**

**1 目的**

加强肺炎克雷伯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**

肺炎克雷伯氏菌菌种的日常管理。

**3 职责**

肺炎克雷伯氏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菌种的使用主任批准，填写《菌种交接单》。具体操作见SOP《肺炎克雷伯氏菌菌种的接收标准操作程序》

5.2使用时填写《菌毒种使用记录表》

**6 菌种的运输**

选择菌种运输桶，具体操作见SOP《肺炎克雷伯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《肺炎克雷伯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24板孔中，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37℃恒温培养箱中培养24h，复苏菌种，可按照《肺炎克雷伯氏菌菌种收集标准操作程序》收集复苏的菌种。

按照BSL-2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，参照支持文件中《实验后清场及污物、废物处理标准操作程序》中实验废弃物的处理操作，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《高压锅使用记录表》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。

**肺炎克雷伯氏菌菌种冻存的标准操作程序**

**1 目的**

加强肺炎克雷伯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**

肺炎克雷伯氏菌菌种的日常管理。

**3 职责**

肺炎克雷伯氏菌菌种实验操作人员。

**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、菌落经革兰氏染色后的镜检情况、结果报告时间、分离培养的实施者。

4.3将肺炎克雷伯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肺炎克雷伯氏菌分装到冻存管，每管1mL。

4.5 管上贴上打印好的标签，并标明细菌种类、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，按照《肺炎克雷伯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》

**肺炎克雷伯氏菌菌种培养的标准操作程序**

**1 目的**

正确地进行肺炎克雷伯氏菌菌种培养，避免菌种污染，以及防止该菌泄漏，保证环境和人员的安全。

**2 适用范围**

进入实验区的肺炎克雷伯氏菌，由于传代或鉴定的需要进行培养。

**3 职责**

从事肺炎克雷伯氏菌实验操作的人员。

**4 试剂和材料**

4.1培养基

4.1.1 LB(Luria-Bertan)液体培养基/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按照支持文件《生物安全柜的使用及消毒标准操作程序》执行。

7.4准备废弃物容器及消毒液（《消毒剂配制及使用标准操作程序》）。

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，标签，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。

8.1.3 加到盛有生理盐水的24板孔中(EP管），以10-1，10-2，10-3，10-4连续倍比稀释。

8.1.4取空白平皿，拔出胶塞，每个平皿接种10-3或10-4稀释菌液0.1ml，用一次性涂棒涂匀，倒置，放37℃恒温箱内培养过液。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生理盐水或稀释苏通培养基，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空白平皿，拔出胶塞，每个平皿接种10-3或10-4稀释菌液0.1ml，用一次性涂棒涂匀，倒置，放37℃恒温箱内培养过液。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《肺炎克雷伯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，再次用75%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。

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**

11.1世界卫生组织《实验室生物安全手册》（第三版），日内瓦，2004

11.2实验室生物安全基础知识。中国计量出版社，2004。

11.3《实验室生物安全通用要求》（GB19489－2008）。

**肺炎克雷伯氏菌菌种收集的标准操作程序**

**1 目的**

正确地收集肺炎克雷伯氏菌，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**

肺炎克雷伯氏菌传代过程中的收集和分装。

**3 职责**

从事肺炎克雷伯氏菌实验操作的人员。

**4 内容**

4.1 从肺炎克雷伯氏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

5.1.1LA培养基斜面

5.1.2 LB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离，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LB培养基中，37 ℃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》写冻存编号，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》

**肺炎克雷伯氏菌菌种鉴定的标准操作程序**

**1 目的**

对接收的肺炎克雷伯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**

已接收的肺炎克雷伯氏菌菌种进行鉴定。

**3 职责**

进行肺炎克雷伯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 经革兰氏染色为阴性。

4.2 生物形态学鉴定

4.2.1普通琼脂培养基上形成较大的灰白色粘液菌落，以接种环挑之，易拉成丝，有助鉴别。在肠道杆菌选择性培养基上能发酵乳糖，呈现有色菌落。

以上实验BSL-2实验区进行，实验人员按照《实验室标准操作程序》进行实验。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。

4.2.2 抗原鉴定

具有O抗原与K抗原，后者用以分型。利用荚膜肿胀试验，本属K抗原可82型。肺炎克氏菌属3型和12型；臭鼻克氏菌主要属4型，少数为5型或6型；鼻硬结克氏菌一般属3型，但并非所有3型均为该菌。

4.3分子生物学方法分析16S rRNA序列来鉴定。

4.3.1 实验材料和仪器

（1） PCR引物和测序引物

16S rRNA序列分析法，16SrDNA的通用引物如下：

上下游引物序列分别为:5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′和5′-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3′,测序引物与扩增引物相同。引物均由上海英骏生物技术有限公司合成。

（2）仪器与试剂

37°恒温培养箱（NuAire公司）、高压灭菌锅（Tomy公司）、生物安全柜（NuAire公司）。

（3）实验方法

1）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。

2）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

3）反应条件：95℃预变性10min，95℃循环变性30s，53℃退火复性30s，72℃延伸1min30s，进行30个循环，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，用琼脂凝胶回收试剂盒将PCR产物回收后，送指定测序公司测序。

**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。

**肺炎克雷伯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**

肺炎克雷伯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**

从事肺炎克雷伯氏菌实验操作的人员。

**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

4.1.3.1 将内部运输箱放入传递窗中。

4.1.3.2 实验员按照支持文件《实验人员防护要求和标准操作程序》及《工作人员进出实验室程序》，进入到实验室内从缓冲走廊打开传递窗打开传递窗，运输箱表面用75%酒精消毒后，进入实验区。

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

4.1.3.4 缓慢取出保温桶，75%酒精消毒保温桶整个外表面后，将桶拿进BSL-2核心区生物安全柜内。

4.1.3.5 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。

4.1.3.6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。

4.1.3.7 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。

4.1.3.8 参考体系文件《生物安全柜标准操作程序》，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。

5.5《实验人员防护要求》。

5.6《工作人员进出实验室程序》。

5.7《实验生物安全柜标准操作程序》。

5.8《高压锅灭菌标准操作程序》

**肺炎克雷伯氏菌菌种保藏的质量控制程序**

**1 目的**

加强肺炎克雷伯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℃和液氮的肺炎克雷伯氏菌菌种的日常管理。

**3 职责**

肺炎克雷伯氏菌菌种管理人员。

**4 材料**

4.1 LB（Luria-Bertan）液体和固体培养基平板

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 恒温培养箱

**6 耗材**

6.1 一次性垫纸

6.2 24孔板(或EP管）

6.3 100ul，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《生物安全柜的标准操作程序》执行。

7.4准备废弃物容器及消毒液（见《实验消毒剂配制》）。

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0.55%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 拆开24孔板(或EP管），向板孔中加入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/生理盐水），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5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《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，如实填写实验记录并用传真机传出。

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》。

10.6《工作人员进出实验室程序》。

10.7《实验生物安全柜标准操作程序》。

10.8《高压灭菌器标准操作程序》

### 肺炎克雷伯菌实验人员防护要求和标准操作程序

**1 目的**

肺炎克雷伯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**

人员进入肺炎克雷伯菌实验室的个人防护装备的选择、使用和消毒。

**3 职责**

从事肺炎克雷伯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

### 肺炎克雷伯氏菌实验后清场及污物、废物处理

### 标准操作程序

**1 目的**

保证从事肺炎克雷伯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**

肺炎克雷伯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、空气实验废物的消毒处理。

**3 职责**

从事肺炎克雷伯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 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。

5.2.2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