# 铜绿假单胞菌风险评估文件目录

|  |  |
| --- | --- |
| 编号 | 名称 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-319-01 | 铜绿假单胞菌菌株接收标准操作程序 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-319-02 | 铜绿假单胞菌菌株复苏标准操作程序 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-319-03 | 铜绿假单胞菌菌株冻存标准操作程序 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-319-04 | 铜绿假单胞菌菌株培养标准操作程序 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-319-05 | 铜绿假单胞菌菌株收集标准操作程序 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-319-06 | 铜绿假单胞菌菌株鉴定标准操作程序 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-319-07 | 铜绿假单胞菌菌株转运标准操作程序 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-319-08 | 铜绿假单胞菌菌株质量控制标准操作程序 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-319-09 | 铜绿假单胞菌菌株基因分型标准操作程序 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-319-10 | 铜绿假单胞菌个人防护要求和标准操作程序 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-319-11 | 铜绿假单胞菌实验后清场及污物、废物处理标准操作程序 |

**绿铜假单胞菌菌种接收标准操作程序**

**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**

绿铜假单胞菌从接收区接收，传递到BSL-2实验室并分装或冻存的过程中。

**3 职责**

从事绿铜假单胞菌实验活动的实验人员。

**4 内容**

4.1绿铜假单胞菌的接收：

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《绿铜假单胞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。

**铜绿假单胞菌菌种复苏标准操作程序**

**1 目的**

加强铜绿假单胞菌菌种的安全管理，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**

铜绿假单胞菌菌种的日常管理。

**3 职责**

铜绿假单胞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菌种的使用需要项目负责人批准，填写《菌种交接单》。具体操作见SOP《铜绿假单胞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**

选择菌种运输箱，具体操作见SOP《铜绿假单胞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《铜绿假单胞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100ul接种于普通LB培养基中培养，放37℃恒温培养箱中培养10h，复苏菌种，可按照《铜绿假单胞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，参照支持文件中《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》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。

**铜绿假单胞菌菌种冻存标准操作程序**

**1 目的**

加强铜绿假单胞菌菌种的安全管理，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**

铜绿假单胞菌菌种的日常管理。

**3 职责**

铜绿假单胞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、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将铜绿假单胞菌充分悬浮于冻存溶液（LB(Luria-Bertani)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，按照《铜绿假单胞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 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—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》

 **铜绿假单胞菌菌种培养标准操作程序**

**1 目的**

正确地进行铜绿假单胞菌菌种培养，避免菌种污染，以及防止铜绿假单胞菌泄漏，保证环境和人员的安全。

**2 适用范围**

进入实验区的铜绿假单胞菌，由于传代或鉴定的需要进行培养。

**3 职责**

从事铜绿假单胞菌实验操作的人员。

**4 试剂和材料**

4.1培养基

4.1.1 LB（Luria-Bertan）固体培养基（每升含10g氯化钠，10g蛋白胨，5g酵母提取物，1.5%琼脂糖）

4.1.2 LB液体培养基（每升含10g氯化钠，10g蛋白胨，5g酵母提取物）

**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 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文件《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75%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。

8.1.3 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。

8.1.4取空白平皿，每个平皿接种10-3或10-4稀释菌液0.1ml，用一次性涂棒将接种过的液体涂匀，使菌液均匀铺于斜面上，然后倒置，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取空白平皿，每个平皿接种10-3或10-4稀释菌液0.1ml，用一次性涂棒将接种过的液体涂匀，使菌液均匀铺于斜面上，然后倒置，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。

8.2.3放37℃恒温箱内培养10h。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。

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，并在5分钟后用75%的酒精再次清洗台面，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。

**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）。

**铜绿假胞单菌菌种收集标准操作程序**

**1 目的**

正确地收集铜绿假胞单菌，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**

铜绿假胞单菌传代过程中的收集和分装。

**3 职责**

从事铜绿假胞单菌实验操作的人员。

**4 内容**

4.1 从铜绿假胞单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 LA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

7.21ml、5ml和10ml一次性无菌吸管、100ml培养瓶

7.3 2ml注射器、5μm的一次性滤器、冻存管

7.4 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 ℃有氧或无氧条件下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 支持性文件**

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》

**铜绿假胞单菌菌种鉴定标准操作程序**

**1 目的**

对接收的铜绿假胞单菌菌种进行种间和种内鉴定和分型，明确菌种。

**2 适用范围**

已接收的铜绿假胞单菌菌种进行鉴定。

**3 职责**

进行铜绿假胞单菌操作的实验人员。

**4 内容**

实验室采用的菌种鉴定实验流程如下：

4.1 经抗酸染色镜检确定是革兰阴性菌，必须首先接种肉汤培养基进行增菌传代。

4.2 初步鉴定 根据菌落特征、气味初步确定菌株的种类。

4.3 最后鉴定 通过色素鉴定，生化反应，生长温度，分型等进行菌种鉴定。

4.4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。

以上实验均需在BSL-2实验室进行。实验人员按照《铜绿假单胞菌培养的标准操作程序》进行实验。

5.**初步鉴定**

4.1 染色镜检为革兰阴性菌，菌体细长且长短不一，有时呈球杆状或线状，成对或短链状排列。菌体的一端有一根鞭毛。

4.1分离培养对有正常菌群存在的临床标本或采自环境中的标本应接种选择性培养基如MAC；对无正常菌群存在的临床标本如血液、脑脊液、穿刺液等可接种普通或血琼脂培养基。在普通琼脂培养基上生长18~24h可以见到扁平、湿润的菌落，该菌所产生的带荧光的水溶性青脓素与绿脓素相结合将使得培养基呈亮绿色；在血琼脂平板上生长时可以见到在菌落的周围有溶血环，菌落呈金属光泽；如果是在液体培养基中则呈浑浊状生长，在液体表面形成菌落，而在培养基底部细菌的生长不良。

6**最后鉴定**

培养阳性，并经生化鉴定为假单胞菌可以确诊。可在选择培养基上并产生绿脓色素的即可鉴定为铜绿假单胞菌，若无色素或在鉴别培养基上不发酵乳糖或葡萄糖的革兰阴性杆菌，可行以下方法进一步鉴别。

6.1 色素鉴定 可将细菌接种于King A、B斜面培养基，37℃ 24h或置室温观察5天。

(1) 绿脓色素：在King A斜面上呈深绿色，液体培养基接触空气处绿色明显。若色素不明显或混杂其他色素，可加氯仿于斜面，置室温观察1～24h，如仍不明显，可在氯仿液中滴加[稀盐酸](https://baike.so.com/doc/6740678-6955176.html%22%20%5Ct%20%22_blank)，绿脓色素在酸液层呈红色。

(2) 绿脓荧光色素：铜绿假单胞菌、荧光假单胞菌、恶臭假单胞菌在King B斜面培养基上呈现黄绿色荧光。

(3) 红脓色素：在King A斜面培养基上呈红紫色，如置37℃ 24h红色不明显，可再置室温3～5天观察。铜绿假单胞菌产生红脓毒素者较少见。

(4) 黑脓毒素：铜绿假单胞菌在含蛋白胨培养基中生长时常有黑脓毒素产生。嗜麦芽窄食单胞菌也有黑脓毒素产生。

6.2 生长温度 生长实验该菌在4℃不生长，而在42℃可以生长。

6.3其他鉴定 铜绿假单胞菌和其他假单胞菌的主要鉴别是葡萄糖氧化分解、氧化酶、精氨酸双水解、乙酰胺酶、葡萄糖酸氧化、硝酸盐还原产氨试验均为阳性。

6.4 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序列来鉴定。

**7. 采用16S rRNA序列分析法对铜绿假单胞菌进行确认**

7.1 PCR引物和测序引物：

16S rRNA序列分析法所用上游引物为5′-GGGGGATCTTCGGACCTCA-3' ，

下游引物为5′-TCCTTAGAGTGCCCACCCG-3'，测序引物与扩增引物相同。

7.2仪器与试剂

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

7.3实验方法

7.3.1按照《铜绿假单胞菌培养标准操作》培养，并观查菌落形态，并进行革兰氏染色方法染色。

7.3.2 铜绿假单胞菌DNA的提取：

参考《铜绿假单胞菌基因分型标准操作程序》的实验操作。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。

7.3.3 PCR 扩增，分别将DNA模板、引物对、预混反应液按照如下所示加入至PCR管内。

2×Taq PCR Master Mix 25μL,

引物各 0.5μL,

DNA模板 1μL，

超纯水 23μL;

总体系： 50μL

反应条件：95℃预变性3min，95℃循环变性30s，57℃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，长度956bp。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。

**8 支持性文件**

8.1世界卫生组织《实验室生物安全手册》（第三版），日内瓦，2004

8.2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)

8.3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

8.4实验室生物安全基础知识。中国计量出版社，2004。

**铜绿假单胞菌菌种转运标准操作程序**

**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**

铜绿假单胞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**

从事铜绿假单胞菌实验操作的人员。

**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

4.3.1 将运输箱放入传递窗中。

4.3.2 实验员按照《实验人员防护要求》及《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，运输箱表面用75%酒精消毒后，带入实验室。

4.3.3 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。

4.3.4 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。

4.3.5 缓慢打开塑料桶盖，用长柄镊子夹出装有细菌的冻存管或其他形式样品管。

4.3.6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。

4.3.7 用75%酒精消毒分装好的菌种冻存管，装入运输箱的塑料桶，外部用75%酒精消毒。

4.3.8 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《高压灭菌器标准操作程序》操作，并记录。操作者手部和全身酒精喷洒消毒后，将塑料桶拿出到缓冲走廊。

**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《生物安全柜标准操作程序》。

5.8《高压灭菌器标准操作程序》。

**铜绿假单胞菌菌种保藏质量控制标准操作程序**

**1 目的**

加强铜绿假单胞菌菌种的安全管理，确保菌种保藏的活性和纯度。

**2 适用范围**

铜绿假单胞菌菌种的日常管理。

**3 职责**

铜绿假单胞菌菌种管理及实验操作人员。

**4 材料**

4.1 LB（Luria-Bertani）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 恒温生化培养箱

**6 耗材**

6.1 一次性垫纸

6.224孔板

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标准操作《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。

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0.5%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 拆开24孔板，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），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培养基，放37℃恒温培养箱中培养24h，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《生物安全柜标准操作程序》。

10.8《高压灭菌器标准操作程序》

**铜绿假单胞菌基因分型标准操作程序**

**1 目的与原理**

对接收的菌种进行基因分型，区分临床菌株，有助于研究铜绿假单胞菌分子流行病学和传播机制。

 对于铜绿假单胞菌的流行病学调查，现在有许多的分子基因分型方法。但这些方法在辨别能力上还是有差别的。许多研究者认为脉冲场凝胶电泳(PFGE)相对于其它方法来说可作为“金标准”，但缺乏可资鉴别和便于传递比较的系统性,不利于大规模、多区域的基因分析和流行病学调查。多位点序列分型(MLST)在1998年由Maiden等提出，针对管家基因上的变异位点，通过对等位基因片段(allele)核苷酸序列测定，能够准确地提供便携式数据分析。研究者通过互联网访问存放在数据库中的菌株的序列信息，不同国家和实验室分离的相关菌株信息能够被全球各个实验室利用，从而可以进行全球范围内的流行病学调查，也可用于多种真核生物和原核生物的分型和进化分析,正好能弥补PFGE的不足之处，能对大规模的样品进行分析比较,发现其遗传及传播机制。

**2适用范围**

所接收的缺少分型信息的菌种或菌液。

**3职责范围**

负责铜绿假单胞菌保藏的实验人员

**4试剂和材料**

待检测菌种、引物、预混反应液、PCR管，EP管

**5仪器设备**

PCR仪、凝胶电泳仪、凝胶成像仪、恒温水浴锅

**6 实验前准备**

6.1按照清单事先准备好所需试剂、耗材和样品。

6.2确认实验区已消毒后，带入试验物品，在监控室登记，按照BSL-2支持文件《从事铜绿假单胞菌实验人员的防护要求和标准操作》和安全操作手册中《工作人员出入实验室程序》进入BSL-2实验区。

6.3打开生物安全柜，准备废弃物容器及消毒液，将一次性垫纸铺在生物安全柜的台面上。

**7 实验步骤**

7.1样品制备：取单个菌落加入1.5ml LB液体培养基中，35度、200rpm振荡解育24h。在冰上转移500μl培养物(含0.5-1.5x109细胞)至另一个干净的EP管中。13000g离心5s。轻轻倒去上清。加入300ul细胞裂解液，吹打混勾。80℃孵育5min溶解细胞。加入1.5μl RNaseA溶液，混匀，37度孵育30min在冰上迅速冷却标本。加入100μl蛋白沉淀溶液，剧烈高速振荡20s。13000g离心3 min。另准备干净的EP管，分别加入300μl异丙醇，将前面步骤离心后的上清缓慢加入装有异丙醇的EP管中。轻轻混勾。13000g离心1min。这时可见白色DNA小球。小心倾倒上清，将EP倒置于一张干净的吸水纸上，确保DNA小球还在EP管内。加入100 ml 70%的乙醇，颠倒混勾几次洗漆DNA小球。13000xg离心1 min。小心倾倒上清。将EP管置于一张干净的吸水纸上，风干约5 min(但不要太干，否则DNA难于溶解)。加入100μl水合溶液，中速振荡5s。65℃孵育60 min，溶解DNA。室温下轻微振荡孵育过夜后，转移至另一干净的EP管中储存备用。

7.2假单胞菌ST等位基因选择

按参考文献选择铜绿假单胞菌的7个保守基因acsA、aroE、guaA、mutL、nuoD、ppsA和trpE作为本研究的目的基因。目标片段DNA序列扩增和测序引物设计参考Pseudomonas aeruginosa MLST网站信息。

7.3 反应体系配制：分别将DNA模板、引物对、预混反应液按照如下所示加入至PCR管内。

2xLA Taq Master Mix：10μL

引物L（5μM）： 0.5μL

引物R（5μM）： 0.5μL

样本DNA： 0.5μL

超纯水： 6.5μL

总体系： 22μL

7.4 PCR扩增条件：预变性95℃5分钟，95℃变性30秒，55℃复性30秒，72℃延伸90秒，进行35个循环后72℃延伸10分钟。

7.5 检测：PCR产物经过2%琼脂糖凝胶电泳，成像后观察，并与DNA marker比较确定PCR产物的大小。

7.6 分析：进行BLAST比对验证,序列属性正确后的数据进行ST数据分析。将扩增的60株铜绿假单胞菌7组ST标签序列信息上传至Pseudomonas aeruginosa

MLST Database (http://pubnilst.org/paeruginosa/)进行multiple locus query分析。然后将获得的ST分类数据信息上传至Pub MLST Data Analysis (http;// pubmlst.

org/mlstanalyse)进行 SpUtsTree 和 eBURST 分析，完成基因分型。

7.7 数据库建立：将计算的所有菌株所有位点的重复次数结果输入Excel表格。如下表：

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 菌株号（Key） | 试验编号 | acsA | aroE | guaA | …… |
| ATCC27853 | H |  | 2 |  |  |
| ...... | 1 |  | 3 |  |  |
| ...... | 2 |  | 3 |  |  |

**8 实验后操作**

8.1将实验区内的污染材料高压后统一处理。

8.2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。

8.3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 支持性文件**

9.1《实验人员防护要求》。

9.2《工作人员进出实验室程序》。

9.3《生物安全柜标准操作程序》。

9.4《高压灭菌器标准操作程序》。

### 铜绿假单胞菌实验人员防护要求和标准操作程序

**1 目的**

铜绿假单胞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**

人员进入铜绿假单胞菌实验室的个人防护装备的选择、使用和消毒。

**3 职责**

从事铜绿假单胞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

### 铜绿假单胞菌实验后清场及污物、废物处理

### 标准操作程序

**1 目的**

保证从事铜绿假单胞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**

铜绿假单胞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**

从事铜绿假单胞菌实验的实验人员。

**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

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 恒温培养箱

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 空气消毒

将新鲜配制的3%过氧化氢溶液装入电动喷雾器内，对实验室空气进行喷雾消毒。

5.5 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