#  青霉菌标准操作程序目录

|  |  |
| --- | --- |
| 编号 | 名称 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-325-01 | 青霉菌菌株接收标准操作程序 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-325-02 | 青霉菌菌株复苏标准操作程序 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-325-03 | 青霉菌菌株冻存标准操作程序 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-325-04 | 青霉菌菌株培养标准操作程序 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-325-05 | 青霉菌菌株收集标准操作程序 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-325-06 | 青霉菌菌株鉴定标准操作程序 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-325-07 | 青霉菌菌株转运标准操作程序 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-325-08 | 青霉菌菌株质量控制标准操作程序 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-325-09 | 青霉菌个人防护要求和标准操作程序 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-325-10 | 紫色毛癣菌实验后清场及污物、废物处理标准操作程序 |

**青霉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**

青霉菌从接收区接收，传递到BSL-2实验室并分装或冻存的过程中。

**3 职责**

从事青霉菌实验活动的实验人员按照标准操作程序进行操作。

**4 内容**

4.1青霉菌的接收：

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实验员按照文件《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。

**青霉菌菌种复苏的标准操作程序**

**1 目的**

加强青霉菌菌种的安全管理，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**

青霉菌菌种的日常管理。

**3 职责**

青霉菌菌种实验操作人员按照标准操作程序进行操作。

**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《结核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《青霉菌菌种的转运标准操作程序》，将菌种转运到BSL-1实验操作区进行复苏培养。

**7 菌种的复苏培养**

按照《青霉菌菌种培养的标准操作》，在生物安全柜中取出取出5-8×107个孢子/ml真菌储备液1mL，接种于YPD或沙堡固体培养基中培养，放28℃恒温培养箱中培养一周，复苏菌种，可按照《红色毛癣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，参照文件中《废物处理作程序》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。

**青霉菌菌种冻存的标准操作程序**

**1 目的**

加强青霉菌菌种的安全管理，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**

青霉菌菌种的日常管理。

**3 职责**

青霉菌菌种实验技术人员按照标准操作程序进行操作。

**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将青霉菌充分悬浮于冻存溶液（马丁氏培养基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青霉菌分装到冻存管，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《青霉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》

 **青霉菌菌种培养的标准操作程序**

**1 目的**

正确地进行青霉菌菌种培养，避免菌种污染，以及防止青霉菌泄漏，保证环境和人员的安全。

**2 适用范围**

进入实验区的青霉菌，由于传代或鉴定的需要进行培养。

**3 职责**

从事青霉菌实验操作的人员按照操作程序要求进行实验操作。

**4 试剂和材料**

4.1培养基

4.1.1 固体培养基：察氏培养基（Czapek–Dox Medium）

成分：

硝酸钠　 3g

磷酸氢二钾　 1g

硫酸镁(MgSO4·7H2O)　 0.5g

氯化钾　 0.5g

硫酸亚铁　 0.01g

蔗糖　 30g

琼脂　 20g

蒸馏水　 1000mL

4.1.2 液体培养基：马丁氏培养基

KH2PO4  1g

MgSO4.7H2O 0.5g

蛋白胨 5g

葡萄糖 10g

水 1000ml

**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 100ml 培养瓶

**7 实验前准备**

7.1 进入专用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消毒标准操作程序》执行。

7.4准备废弃物容器及消毒液。

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制法

 将察氏培养基和马丁氏各成分混匀 溶解，121℃灭菌20min高压灭菌。

 将配制好的的察氏培养基进行高压灭菌，混匀后倒入225cm2的培养瓶中（体积170-180ml）。放入生物安全柜之前和拿出生物安全柜之后，真菌培养瓶盖必须保持封闭。

8.2 从单独存放于-80度冰箱青霉菌库中取出5-8×107个孢子/ml真菌储备液1mL，置于生物样本运输容器中，运输到BSL-2实验室，置于生物安全柜中融化。利用含滤芯的1mL枪头将融化后的真菌储备液转移至含配好的培养基中，拧紧盖子，将固态培养基置于28℃培养箱内培养。

 用移液器将少许的5-8×107个孢子储存液转接于100ml马丁氏培养基中，28℃，200rpm在摇床中进行培养2-5天。实验过程中用到的真菌冻存管、Tip头、移液管等全部进行高压灭菌处理（121℃，20分钟）。在真菌培养传代和此后的收获过程中，应更严格地执行BSL-2生物安全实验室的操作规范。

**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《废物处理程序》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，并随后用75%的酒精再次擦拭，放置损伤台面，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）。

**青霉菌菌种收集的标准操作程序**

**1 目的**

正确地收集青霉菌，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**

青霉菌传代过程中的收集和分装。

**3 职责**

从事青霉菌实验操作的人员按照程序要求进行实验操作。

**4 内容**

4.1 从青霉菌的培养斜面上收集菌种

4.2 制备成单细胞悬液，确定菌液浓度

**5 试剂和材料**

5.1培养基

5.1.1固体培养基：察氏培养基

5.1.2液体培养基：马丁氏培养基

**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 冻存管

7.4 84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。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菌株的培养：将以上中生长的单菌落接种到察氏培养基中，25℃200 rpm培养1-2周。（固体培养基为察氏培养基）

8.1.4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》

**青霉菌菌种鉴定的标准操作程序**

**1 目的**

对接收的青霉菌菌种进行种间和种内鉴定和分型，明确菌种。

**2 适用范围**

已接收的青霉菌菌种进行鉴定。

**3 职责**

进行青霉菌操作的实验人员按照操作要求进行实验操作。

**4 内容**

实验室采用的菌种鉴定实验流程如下：

4.1形态鉴定：

将各致病菌株分别利用点植法接种到察氏平板培养基上，25°C培养2-5天后，可形成典型的隐球菌菌落，取菌做墨汁负染色，进行显微观察及制作切片镜检，可见有荚膜无假菌丝。观察描述其产孢方式及分生孢子梗、产孢细胞和分生孢子的形态特征，结合培养特性作为鉴定菌种依据。

参照《真菌鉴定手册》及《中国真菌志》青霉属分册，主 要 以 Pitt和 Samson (1993)的资料为依据对各致病菌株进行形态鉴定。

4.2分子生物学方法分析rDNA-ITS序列来鉴定

4.2.1 rDNA-ITS序列的引物

上游引物 ITS1(5’-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3’)，下游引物 ITS4(5’-tcc

tccgcttattgatatgc-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。

4.4.2 仪器与试剂

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）。

4.4.3实验方法

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。

4.4.3.1真霉菌基因组DNA的提取

从完成形态鉴定的各种青霉菌中选取一个单孢菌株，采用液体静置培养方法收集菌丝体，用液氮充分研磨菌至粉末后装入1.5mL离心管中，参照试剂盒使用说明,用真菌 DNA提取试剂盒(北京天根生物科技有限公司)提取其基因组DNA。

（1）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。

Taq（1U/uL） 0.5μL

10xPCR Buffer 2.5μL

Mg2+ Plus 2.5 μL

引物各 1μL

DNA模板 2μL

超纯水 13.5μL

 总体系： 25μL

（2）反应条件：95℃预变性3min，95℃循环变性1min，52℃退火复性40s，72℃延伸2min，进行35个循环，72℃终延伸10min，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。

**青霉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**

青霉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**

从事青霉菌实验操作的人员按照操作程序进行操作。

**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BSL-2实验室的传递窗中。

4.3.2 实验员按照文件《实验人员防护要求》及《实验室准入程序》，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 缓慢取出保温桶，75%酒精消毒保温桶外表面后，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。

4.3.6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，装入运输箱的保温桶，外部用75%酒精消毒。

4.3.8 参考文件《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 《实验室准入程序》。

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》。

**青霉菌菌种保藏的质量控制标准操作程序**

**1 目的**

加强青霉菌菌种的安全管理，确保菌种保藏的活性和纯度。

**2 适用范围**

青霉菌菌种的日常管理。

**3 职责**

青霉菌菌种相关工作人员按照标准操作程序进行操作。

**4 材料**

4.1 LB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

6.2 24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 进入专用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0.55%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《感染材料的转运程序》，将菌种从冷冻区转运至专用BSL-2实验区。

8.2 接种于YPD或沙堡培养基斜面上，28℃培养一周，观察菌丝的形态和活性。

8.3 -80℃最长保存6个月，每6个月活化一次，之后须按高压灭菌销毁原有菌种。

**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《人员准入程序》。

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》

### 青霉菌实验人员防护要求和标准操作程序

**1 目的**

青霉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**

人员进入青霉菌实验室的个人防护装备的选择、使用和消毒。

**3 职责**

从事青霉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 专用BSL-2实验室的专用工作服

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 提前换上专用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，正常方可进入专用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**

6.1 专用BSL-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出专用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

### 青霉菌实验后清场及污物、废物处理标准操作程序

**1 目的**

保证从事青霉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**

青霉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**

从事青霉菌实验的实验人员按照标准操作程序进行操作。

**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 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