#  红色毛癣菌标准操作程序目录

|  |  |
| --- | --- |
| 编号 | 名称 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-320-01 | 红色毛癣菌菌株接收标准操作程序 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-320-02 | 红色毛癣菌菌株复苏标准操作程序 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-320-03 | 红色毛癣菌菌株冻存标准操作程序 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-320-04 | 红色毛癣菌菌株培养标准操作程序 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-320-05 | 红色毛癣菌菌株收集标准操作程序 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-320-06 | 红色毛癣菌菌株鉴定标准操作程序 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-320-07 | 红色毛癣菌菌株转运标准操作程序 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-320-08 | 红色毛癣菌菌株质量控制标准操作程序 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-320-09 | 红色毛癣菌个人防护要求和标准操作程序 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-320-10 | 红色毛癣菌实验后清场及污物、废物处理标准操作程序 |

**红色毛癣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**

红色毛癣菌从接收区接收，传递到专用BSL-2实验室并分装或冻存的过程中。

**3 职责**

从事红色毛癣菌实验活动的实验人员。

**4 内容**

4.1红色毛癣菌的接收：

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》，进入到专用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，将桶拿进专用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。

**红色毛癣菌菌种复苏的标准操作程序**

**1 目的**

加强红色毛癣菌菌种的安全管理，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**

红色毛癣菌菌种的实验操作人员。

**3 职责**

红色毛癣菌菌种实验操作人员按照要求进行操作。

**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《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，双人双锁，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《红色毛癣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《红色毛癣菌菌种的转运标准操作程序》，将菌种转运到专用BSL-2实验操作区进行复苏培养。

**7 菌种的复苏培养**

按照《红色毛癣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《废物处理程序》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。

**红色毛癣菌菌种冻存的标准操作程序**

**1 目的**

加强红色毛癣菌菌种的安全管理，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**

红色毛癣菌菌种的实验操作人员。

**3 职责**

红色毛癣菌菌种实验操作人员按照要求进行操作。

**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、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、菌落的镜检情况、结果报告时间、分离培养的实施者。

4.3将红色毛癣菌充分悬浮于冻存溶液（PBS100mL/30%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红色毛癣菌分装到冻存管，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《红色毛癣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》

 **红色毛癣菌菌种培养的标准操作程序**

**1 目的**

正确地进行红色毛癣菌菌种培养，避免菌种污染，以及防止红色毛癣菌泄漏，保证环境和人员的安全。

**2 适用范围**

进入实验区的红色毛癣菌，由于传代或鉴定的需要进行培养。

**3 职责**

从事红色毛癣菌实验操作的人员。

**4 试剂和材料**

4.1 菌株

红色毛藓菌临床分离株（BMU01672）

4.2培养基

4.2.1 YPD培养基（蛋白胨20g，酵母提取物10g，D-葡萄糖20g）

4.2.2 PDA培养基（马铃薯葡萄糖琼脂培养基39g）

4.3 氯霉素（25mg/ml）

4.4 一次性培养用品与耗材（225cm2的培养瓶，锥形瓶，10ml的移液管）

4.5 酒精（75%）、次氯酸钠等消毒剂

**5 仪器设备**

5.1低温离心机

5.2－80℃冰箱

5.3四度冰箱

5.4生物安全柜

5.5 恒温培养箱

5.6 摇床

5.7 消毒灭菌设备

**6 耗材**

6.1 1ml、5ml和10ml一次性无菌吸管

6.2 移液器

**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文件《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。

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 红色毛藓菌的准备与培养：

 培养红色毛藓菌主要用到的株系为BMU01672，来源于北京大学真菌和真菌病研究中心保藏的红色毛癣菌临床分离株。常用的培养基为PDA培养基和YPD培养基。PDA培养基（固体培养基）：将配制好的的PDA培养基进行高压灭菌，待冷却到60℃时添加入氯霉素，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密闭。

YPD培养基（液体培养基）：未添加氯霉素。

8.2红色毛藓菌的培养：

 从单独存放于-80度冰箱红色毛藓菌库中取出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PDA（固态培养基）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YPD液体培养基中，28℃，200rpm在摇床中进行培养3-4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84消毒液（原液：水=1：9）擦拭工作台面、生物安全柜内壁及台面，5分钟后并用清水进行清洗台面，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）。

**红色毛癣菌菌种收集的标准操作程序**

**1 目的**

正确地收集红色毛癣菌，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**

红色毛癣菌传代过程中的收集和分装。

**3 职责**

从事红色毛癣菌实验操作的人员按照操作程序要求进行操作。

**4 内容**

4.1 从红色毛癣菌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 YPD培养基（蛋白胨20g，酵母提取物10g，D-葡萄糖20g）

5.1.2 PDA培养基（马铃薯葡萄糖琼脂培养基39g）

5.2氯霉素（25mg/ml）

5.3 一次性培养用品与耗材（225cm2的培养瓶，锥形瓶，10ml的移液管）

5.4酒精（75%）、次氯酸钠等消毒剂

**6 仪器设备**

6.1低温离心机

6.2－80℃冰箱

6.3四度冰箱

6.4生物安全柜

6.5恒温培养箱

6.6 摇床

6.7消毒灭菌设备

**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 培养平板

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真菌固体培养2-3周后，在生物安全柜内收取孢子，用生理盐水冲洗培养基表面，并用拭子轻轻刮培养基表面，使孢子和培养基分离，收取孢子。

8.2 孢子和菌丝的混合物过100目滤网，除去大的菌丝和培养基碎屑，然后用70μm的滤膜除去小的菌丝片段。

8.3获得的孢子显微镜下用血球计数板计数，用双蒸水调整浓度到5-8×107个孢子/ml，4℃保存备用。

8.4收取的孢子分装于防裂的细胞冻存管内。

需要注意的是：因为冷冻过程中液体体积会膨胀，因此不要将冻存管装得过满，达到2/3满即可。同时准备含有不低于0.5%次氯酸钠的溶液的废液缸作为废弃感染材料的消毒剂。

8.5 对液体培养的菌丝体，3000rpm，5mins离心收集菌体，PBS洗涤2次，洗净培养基，晾干水分后置于冻存管中，储存于-80度冰箱的红色毛藓菌库中。

8.6 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 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》

**红色毛癣菌鉴定的标准操作程序**

**1 目的**

分离和鉴定红色毛癣菌（*Trichophyton rubrum*， *T. rubrum*）的相关实验技术的操作。

**2 范围**

适用于红色毛癣菌鉴定的相关实验技术的操作。

**3 职责**

3.1实验人员的资质：实验人员必须具有生物安全二级实验室上岗证并严格按照标准操作程序进行操作。

3.2 BSL-2实验室申请：凡要进入专用BSL-2实验室的工作人员按照进出BSL-2实验室个人防护操作规范做好个人防护。

3.3感染性材料的领取：实验人员应根据支持文件《毒种使用审批程序》向主任提出使用感染性材料的申请，经书面批准后，由指定人员到真菌库领取感染性材料。

**4 安全级别说明与菌株鉴定操作规程目录**

红色毛藓菌在实验室的主要传播途径为接触传染。因此，所有实验必须穿实验服，戴乳胶手套。为了加强病原微生物实验室生物安全管理，规范病原微生物实验活动，根据《病原微生物实验室生物安全管理条例》的规定，卫生部制定了《人间传染的病原微生物名录》，红色毛藓菌按照第三类病原微生物进行管理，凡涉及红色毛藓菌的分离、培养、未经培养的感染材料等操作应当在生物安全二级（BSL-2）实验室进行；灭活材料和无感染性材料的操作可在生物安全一级（BSL-1）实验室进行。

4.1红色毛癣菌的形态学鉴定：

常用的培养基为PDA培养基和YPD培养基。PDA培养基（固体培养基）：将配制好的的PDA培养基进行高压灭菌，待冷却到60℃时添加入氯霉素，混匀后倒入225cm2的培养瓶中（体积170-180ml）。

菌株接种在YPD固体培养基，28℃培养2周。收取刮取真菌培养物进行镜检，红色毛癣菌孢子为椭球型，直径2-4μm；菌丝为有隔菌丝，有分支，宽度24μm左右。

4.2 红色毛藓菌的分子生物学方法鉴定

真菌的核糖体DNA（rDNA）的转录间隔区（ITS）是中度保守区域，在种内相对一致，种间差异明显，因此被用于真菌菌种的分子鉴定。ITS区PCR鉴定也是红色毛癣菌菌株鉴定的可靠方法。

红色毛癣菌的rDNA的非转录区（NTS）内有2个串联重复单位Trs-1区和Trs-2区，不同菌株拷贝数不同则可以用于不同菌株的鉴定。

4.2.1 引物合成：

 真菌rDNA的大亚基28S rDNA中的D1，D2区通用引物NL1(5′-CGCATATCAA-3′)、NL4（5′-GGTCCGTGTTTCAGAGCGG-3′）扩增产物为550bp。

 ITS 区扩增引物采用通用引物ITS1（5′-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3′）（5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′），扩展产物大约600bp。

4.3 实验方法

4.3.1材料和设备：

4.3.1.1实验材料 ：

红色毛藓菌菌株、PDA培养基、YPD培养基、氯霉素、一次性真菌培养用品与耗材、次氯酸钠、酒精（75%）等消毒剂

4.3.1.2实验设备

低温离心机、－80℃冰箱、普通冰箱、生物安全柜、二氧化碳培养箱、Mini离心机、相应的消毒灭菌设备、PCR仪器

4.3.1.3场所：

 BSL-2实验室，需要在生物安全柜中无菌操作。

4.3.2操作步骤：

4.3.2.1实验准备：

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。

确认实验区已消毒后，消毒所带入物品，登记，进入实验区。

4.3.2.2操作步骤：

(1)核酸的提取，参见DNA提取试剂盒（QIAGEN）。

(2) PCR条件

一步法PCR扩增反应条件：95℃变性1min，95℃15s+55℃30s+72℃1min，35cycles，72℃延伸10min。

4.4清场

填写实验室和仪器使用记录和清场记录

**5支持性文件**

5.1 《毒种使用管理标准程序》

5.2 《菌毒种使用管理规定》

5.3 《生物安全柜标准操作程序》

5.4 《Megnetic核酸提取标准操作程序》

5.5 《人间传染的病原微生物名录》

**红色毛癣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**

红色毛癣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**

从事红色毛癣菌实验操作的人员按照操作要求进行操作。

**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 将运输箱放入传递窗中。

4.3.2 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BSL-2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，将桶拿进专用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《实验人员防护要求和标准操作程序》。

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《高压锅灭菌使用标准操作程序》。

**红色毛癣菌菌种保藏的质量控制标准操作程序**

**1 目的**

加强红色毛癣菌菌种的安全管理，确保菌种保藏的活性和纯度。

**2 适用范围**

混悬液保存在-80℃和液氮的红色毛癣菌菌种的日常管理。

**3 职责**

红色毛癣菌菌种管理人员根据操作要求进行操作。

**4 材料**

4.1 沙堡或YPD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 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《菌种的转运标准操作》，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 《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》

### 红色毛癣菌实验人员防护要求和标准操作程序

**1 目的**

红色毛癣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**

人员进入红色毛癣菌实验室的个人防护装备的选择、使用和消毒。

**3 职责**

从事红色毛癣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**

6.1 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

### 红色毛癣实验后清场及污物、废物处理

### 标准操作程序

**1 目的**

保证从事红色毛癣实验活动的实验室，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**

红色毛癣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**

从事红色毛癣实验的实验人员。

**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 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