# 仙台病毒标准操作程序目录

|  |  |
| --- | --- |
| 编号 | 名称 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-313-01 | 仙台病毒毒株（样本）接收操作流程 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-313-02 | 仙台病毒毒株（样本）收集操作程序 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-313-03 | 仙台病毒毒株（样本）实验室内传递操作程序 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-313-04 | 仙台病毒毒株（样本）的鉴定保存操作程序 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-313-05 | 仙台病毒毒株（样本）培养标准操作程序 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-313-06 | 仙台病毒毒株（样本）保藏质量控制 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-313-07 | 仙台病毒毒株（样本）实验后清场及污物、废物处理标准操作程序 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-313-08 | 仙台病毒毒株（样本）实验人员防护要求和标准操作程序 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-313-09 | 仙台病毒实验意外事故处理标准操作程序 |

CAMS-CCPM-C-Ⅲ-313-10 仙台病毒毒株（样本）红细胞凝集实验标准操作程序

**仙台病毒毒株（样本）接收标准操作程序**

**1 目的**

明确仙台病毒（Sendai virus，SV）毒株(样本)接收相关实验技术的操作。

**2 适用范围**

适用于进行SV病毒毒株（样本）接收的相关实验人员。

**3 防护要求**

3.1生物安全二级实验室（BSL-2）。

3.2 实验人员防护装备：一次性帽子、医用一次性口罩、一次性手套、工作服、鞋套。

**4 包装要求**

就地转送的（从保藏区到实验室等的短距离移动）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。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，其中第三类微生物菌（毒）种包装和运输应满足《汇编》中《国家自然科技资源平台三、四类微生物菌（毒）种包装、运输和开启技术规程》要求。

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，其中第三类微生物菌（毒）种包装和运输应满足《汇编》中《国家自然科技资源平台三、四类微生物菌（毒）种包装、运输和开启技术规程》要求。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危险标签、标识、运输登记表、警告用语和提示用语。

**5 信息要求**

1. 毒株（样本）保存时进行登记备案，记录毒株名称、数量、提供单位、毒株来源、状态、接收日期、毒株编号等。
2. 毒株保存管上应有牢固的标签，标明毒株（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。
3. 进行保存的毒株（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. 保存的毒株（样本）传代或冻存均应填写专用记录。每年对毒株（样本）进行整理，核查。
5. 对新引进的毒株（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毒株（样本）的变异和死亡。

**6 操作步骤**

6.1 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，并将样本清单传真入实验室；如有破损，应立即报告实验室负责人，由实验室负责人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《生物安全二级实验室实验后清场及污物、废物处理标准操作程序》进行清场。

**7 文件支持**

1. 《实验室生物安全管理条例》，国务院令第424号
2. 《病原微生物实验室生物安全》，人民卫生出版社，2006年5月1日
3. 《生物安全实验室安全手册》，人民卫生出版社， 第1版
4. 《危险品航空安全运输技术细则》，2011-2012 版国际民航组织
5. 《微生物菌种资源收集、整理、保存技术规程汇编》，源自国家自然科技资源平台项目《自然科技资源收集整理保存技术规程研究制定》项目组，二〇〇五年二月十日
6. 《国家自然科技资源平台三、四类微生物菌（毒）种包装、运输和开启技术规程》，源自国家自然科技资源平台项目《自然科技资源收集整理保存技术规程研究制定》项目组，二〇〇四年十二月十日
7. 《仙台病毒风险评估文件》

**仙台病毒毒株（样本）收集标准操作程序**

**1 目的**

明确仙台病毒（Sendai virus，SV）毒株（样本）收集的相关实验技术的操作。

**2 适用范围**

适用于进行SV病毒毒株（样本）收集的相关实验人员。

**3 防护要求**

1. 生物安全二级实验室（BSL-2）。
2. 实验人员防护装备：一次性帽子、医用一次性口罩、面罩、一次性手套、工作服、鞋套、工作鞋。

**4 包装要求：**

就地转送（从保藏区携带到实验室的短距离移动）的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。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，其中第三类微生物菌（毒）种包装和运输应满足《汇编》中《国家自然科技资源平台三、四类微生物菌（毒）种包装、运输和开启技术规程》要求。

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，其中第三类微生物菌（毒）种包装和运输应满足《汇编》中《国家自然科技资源平台三、四类微生物菌（毒）种包装、运输和开启技术规程》要求。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。

**5 信息要求**

1. 毒株采用种子批系统。
2. 毒株（样本）编号应在国家或国际同一名称的基础上进行，一经编号不得私自更改。
3. 毒株（样本）的保存应有严格的登记制度，建立详细的总帐和分类帐。收到毒株（样本）后应立即进行编号登记，详细记录毒株（样本）的学名、株名、历时、来源、特性、用途、批号、传代冻干日期、数量。在保管过程中，凡传代、冻干及分发，均应及时登记，并定期核对库存数量。
4. 收到毒株（样本）后应即使及时进行鉴定，所有毒株（样本）鉴定结果应及时记入毒种及样本专用记录内。
5. 毒株（样本）鉴定后根据其特性选用适当方法及时保存。最好低温保存。毒株（样本）应保存2份或保存于2种培养基，一份供定期移种或传代用，另一份供经常移种或传代用。保存的毒株（样本）传代应填写专用记录。毒株管上应有牢固的标签，标明毒株（样本）编号、代次、批次、日期。
6. 销毁毒株（样本）时须经相应部门领导批准，并在记录上注销，注明销毁原因和方式。

**6 文件支持**

1. 《实验室生物安全管理条例》，中华人民共和国国务院令第424号2004年11月12日
2. 《病原微生物实验室生物安全》，人民卫生出版社，2006年5月1日
3. 《生物安全实验室安全手册》，人民卫生出版社， 第1版
4. 《危险品航空安全运输技术细则》，2011-2012 版国际民航组织
5. 《微生物菌种资源收集、整理、保存技术规程汇编》，源自国家自然科技资源平台项目《自然科技资源收集整理保存技术规程研究制定》项目组，二〇〇五年二月十日
6. 《国家自然科技资源平台三、四类微生物菌（毒）种包装、运输和开启技术规程》，源自国家自然科技资源平台项目《自然科技资源收集整理保存技术规程研究制定》项目组，二〇〇四年十二月十日
7. 《仙台病毒风险评估文件》

**仙台病毒毒株（样本）实验室间传递标准操作程序**

**1 目的**

明确仙台病毒（Sendai virus，SV）毒株（样品）实验室间传递的相关操作程序。

**2 适用范围**

参与SV病毒毒株（样本）实验室间传递的工作人员。

**3 防护要求**

1. 生物安全二级实验室
2. 实验人员防护装备：一次性帽子、医用一次性口罩、一次性手套（必要时带双层）、不露脚趾的工作鞋或防水鞋套。

**4 毒株（样本）实验室间的传递**

1. 将实验用毒株（样本）从指定保存位置取出，表面喷洒酒精后放入生物安全柜内；
2. 在生物安全柜内将毒株（样本）取出，认真核实毒株（样本）信息，确保无误后，将毒株（样本）重新装入两层带有封口的密封袋或密封装置中（应密封，防水、防破损、防外泄），并注明毒株（样本）名称、数量、状态、毒株编号；
3. 表面喷洒酒精后，拿出安全柜，装入内部转运箱，送往其他实验室中，并填写（菌）毒种流向表。
4. 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》及《仪器设备污染控制标准程序》进行清场。

**5 文件支持**

1. 《动物病原微生物菌（毒）种保藏管理办法》中华人民共和国农业部令第16号
2. 《病原微生物实验室生物安全》，人民卫生出版社，2006年5月1日
3. 《中国医学科学院病原微生物菌（毒）种保藏中心运行管理办法（试行）》医科院 171号
4. 《危险品航空安全运输技术细则》，2011-2012 版国际民航组织
5. 《国家自然科技资源平台三、四类微生物菌（毒）种包装、运输和开启技术规程》，源自国家自然科技资源平台项目《自然科技资源收集整理保存技术规程研究制定》项目组，二〇〇四年十二月十日
6. 《生物安全二级实验室实验后清场及污物、废物处理标准操作程序》
7. 《生物安全二级实验室主要仪器设备污染控制程序》
8. 相关仪器设备标准操作程序
9. 《仙台病毒风险评估文件》

**仙台病毒毒株（样本）的鉴定标准操作程序**

**1 目的**

明确仙台病毒（Sendai virus，SV）毒株（样本）的鉴定保存相关实验技术的操作。

**2 适用范围**

适用于进行SV病毒毒株（样本）的鉴定保存相关的实验人员。

**3 RT-PCR方法鉴定方法**

* 1. 主要试剂

1. RNA提取试剂盒：QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN，Cat. No. 52904)或其他等效产品。
2. RT-PCR试剂盒：One Step RT-PCR Kit（Solarbio，T2240）或其他等效产品。
3. 无RNase去离子水：经DEPC（焦炭酸乙二酯）处理的去离子水或商品无RNase水。
4. DNA相对分子质量标准：100bp~2000bp。
5. 引物：根据表1的序列合成引物，引物加无RNase去离子水配制成10μmol/L储备液，-20℃保存。

**表1： RT-PCR扩增引物**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 引物名称 | 引物序列（5’→3’） | 产物大小（bp） |
| SV-F-p | CAGAGGAGCACAGTCTCAGTGTTC | 123 |
| SV-R-p | TCTCTGAGAGTGCTGCTTATCTGTGT |

* 1. 主要仪器设备和材料

1. PCR仪。
2. 电泳仪。
3. 凝胶成像分析系统。
4. 高速冷冻离心机。
5. 普通离心机。
6. 恒温水浴锅。
7. 漩涡振荡器。
8. 生物安全柜。
9. 微量移液器（0.1~2μL，1~10μL，10~100μL，100~1000μL）。
10. 无RNase的离心管（1.5mL、2mL、5mL、15mL），无RNase的吸头（10μL，200μL，1mL），无RNase的PCR扩增反应管（0.2 mL，八连管或96孔板）等。
    1. 实验步骤
       1. 样本采样及处理

细胞培养物

方法一：直接刮取样品接种后出现CPE或可疑的细胞培养物于15mL离心管中，3000r/min离心10min，去上清，加1mL灭菌PBS重悬细胞，然后将细胞悬液转移到无菌1.5mL离心管中，编号备用。

方法二：将样品接种后出现CPE或可疑的细胞培养物反复冻融三次，细胞混悬液转移于15mL离心管中，12000r/min离心10min，去细胞碎片，上清液转移到无菌15mL离心管中，编号备用。

* + 1. 样本的存放

采集或处理的样本在2~8℃条件下保存应不超过24h，若需长期保存，须放置-80℃冰箱，但应避免反复冻融（冻融不超过3 次）。

* + 1. 提取RNA（冰上进行）

1. 取样品上清140μl加入装有buffer AVL-carrier RNA的离心管中，充分混匀，室温放置10min。加入560μL的无水乙醇，漩涡后理瞬时离心，吸取630μL上步溶液加入column，盖上盖子，8000rpm，1min。将column转入新的2ml离心管中，弃去旧管。
2. 打开column盖子，再吸取630μL上步溶液加入column，盖上盖子，8000rpm，1min。将column转入新的2ml离心管中，弃去旧管。加入500μl buffer AW1。盖上盖子，8000rpm 离心1min。换收集管后column柱中加入500μl buffer AW2，全速离心14000rpm,3min。
3. 将column放入新的2ml收集管中，弃去旧管，全速离心1min。将column放入1.5ml离心管中，弃去旧管，小心打开column盖子，加入60μl室温的buffer AVE.盖上盖子，室温放置1min,8000rpm离心1min。即得到高质量病毒基因组RNA。
   * 1. RT-PCR反应
4. RT-PCR反应体系

RT-PCR反应体系见表2。反应液的配制在冰上操作，每次反应同时设计阳性对照、阴性对照和空白对照，其中阳性对照以含有核酸作为阳性对照模板，其中阴性对照以不含有核酸样本（可以是正常动物组织或正常培养物）作为阴性对照模板，空白对照即为不加模版对照（No Template Control，NTC），即在反应中用水来代替模板。

**表2 每个样品反应体系配制表**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 反应组分 | 用量/μl | 终浓度 |
| 25×One Step RTase mix | 1 | 1× |
| 5×One Step RT Premix buffer | 5 | 1× |
| SV-F-p (10μM) | 1 | 400nM |
| SV-R-p (10μM) | 1 | 400nM |
| RNA | 5 | - |
| 无RNase去离子水 | 11 | - |
| 总体积 | 25 | - |

1. RT-PCR反应参数

RT-PCR反应参数见表3

**表3 RT-PCR反应参数**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 步骤 | 温度 | 时间 | 循环数 |
| 反转录 | 50℃ | 20min | 1 |
| 变性 | 95℃ | 5min | 1 |
| 变性 | 95℃ | 20s | 35 |
| 退火 | 60℃ | 30s |
| 延伸 | 72℃ | 20s |
| 保温 | 72℃ | 5min | 1 |

注：可使用其他等效的RT-PCR检测试剂进行，反应体系和反应参数可做相应调整。

1. 产物的琼脂糖电泳检测和拍照

PCR反应结束后，取10μl PCR 产物在2%琼脂糖凝胶进行电泳检测，以DNA分子量作参照。电压大小根据电泳槽长度来确定，一般控制在3V/cm~5V/cm，当上样染料移动到凝胶边缘时关闭电源。电泳完成后在凝胶成像系统拍照记录电泳结果。

* 1. 结果判定
     1. RT-PCR质控标准

所有样品中，阴性对照和空白对照未出现条带，阳性对照出现123bp的目的扩增条带则表明反应体系运行正常，否则此次试验无效，需重新进行RT-PCR扩增。

* + 1. 结果判定

用SV病毒特异引物检测被检样本产生123bp条带时，判定为SV病毒核酸阳性，否则为SV病毒核酸阴性。

* + 1. 序列测定

必要时，可取待检样本扩增出的阳性PCR产物进行核酸序列测定，序列结果与已公开发表的特异性片段序列进行比对，序列同源性在90%以上，可确诊待检样本SV病毒核酸阳性，否则判定SV病毒核酸阴性。

**4 记录**

4.1 《人员出入实验室登记表》

4.2 《仪器设备使用记录》

**5 支持性文件**

1. 《生物安全实验室安全手册》人民卫生出版社； 第1版
2. 相关仪器设备标准操作程序相关仪器设备标准操作程序
3. 《消毒液配制》
4. 《实验室人员进出实验室程序》
5. 《仪器设备标准操作程序》
6. 《实验清场及污物、废弃物的处理标准操作程序》
7. 《仙台病毒风险评估文件》

**6 参考文献：**

Wagner A M, Loganbill J K, Besselsen D G. Detection of sendai virus and pneumonia virus of mice by use of fluorogenic nuclease reverse transcriptase polymerase chain reaction analysis[J]. Comparative Medicine, 2003, 53(2):173

### 仙台病毒毒株(样本)培养标准操作程序

**1 目的**

明确仙台病毒（Sendai virus，SV）毒株（样本）培养的相关实验技术操作。

**2 适用范围**

本标准操作程序适用于用SV病毒毒株（样本）培养的相关实验人员。

**3 试剂和材料**

* 1. 细胞：75％～90％成片的BHK-21细胞
  2. DMEM高糖培养基（含有L-谷氨酰胺，HyClone,Cat No SH30022.01B）
  3. 胎牛血清
  4. 消化液：含0.02%EDTA的0.25%胰酶
  5. HEPES缓冲液，1M母液 （GIBCO，Cat No 15630）
  6. 青-链霉素(10,000 U/mL 青霉素G；10,000 µg/mL硫酸链霉素)（HyClone，Cat No SV30010）
  7. 细胞生长液：

500mL DMEM液中加入下列试剂，配制成细胞维持液：

青-链霉素5mL（终浓度达：100U/mL 青霉素；100µg/mL链霉素）

胎牛血清50mL（终浓度：10%）

* 1. 细胞维持液：

500mL DMEM液中加入下列试剂，配制成细胞维持液：

青-链霉素5mL（终浓度达：100U/mL 青霉素；100µg/mL链霉素）

HEPES缓冲液12.5mL（终浓度：25mM）

* 1. Hank's液
  2. SPF9-11日胚龄鸡胚
  3. 1%鸡红细胞
  4. 75％酒精
  5. 碘酒
  6. 有效氯含量为0.55%的84消毒液（原液：水=1：9）

**4 仪器设备**

1. Ⅱ级生物安全柜
2. 低速冷冻离心机
3. CO2孵箱
4. 倒置显微镜
5. -80℃超低温冰箱

**5 耗材**

1. 1mL一次性移液管
2. 10mL一次性移液管
3. T75细胞培养瓶
4. 一次性垫纸
5. 15mL离心管
6. 24孔细胞培养板
7. 5mL注射器
8. 冻存管
9. 照蛋器
10. 钻孔器
11. 蜡
12. 1mL一次性注射器

**6 BHK-21细胞培养仙台病毒毒株（样本）**

1. 实验前准备

6.1.1准备好铺满单层75%-90%的BHK-21细胞(75T细胞培养瓶)。

6.1.2 进入生物安全二级实验室：按照清单事先准备好所需试剂、耗材和样品，一次性带入实验室，检查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，带入试验物品，登记，进入实验区。凡在生物安全柜内进行的操作均须按照《仪器设备污染控制程序》执行。准备废弃物容器及消毒液参考《消毒灭菌》及《废弃物的处理程序》。

1. 实验步骤
   * 1. 对数生长期的BHK-21细胞，75％～90％单层铺满；
     2. 于生物安全柜内弃去细胞生长，根据SV毒种滴度,加入一定量病毒悬液，37℃，5％CO2培养箱，吸附1hr；
     3. 吸附结束后，加入细胞维持液，置37℃，5％CO2培养箱继续培养；
     4. 同时设置未接种病毒的同期培养的正常细胞做正常细胞对照。对照细胞瓶中加入细胞维持液，置37℃，5％CO2培养箱继续培养；
     5. 每日观察细胞病变情况。在倒置显微镜下可观察到如下细胞形态变化：细胞变圆皱缩，间距拉开。以25%左右细胞CPE变化为“+”，50%左右细胞CPE变化为“+”，75%左右细胞CPE变化为“+++”，几乎全部细胞CPE变化为“++++”，正常细胞形态为“-”。
     6. 镜下观察CPE达到“+++～++++”时，即：当75%以上细胞出现病变时进行收获。收获前可以将细胞放于-80℃超低温冰箱，冻融2次，以提高收获标本的病毒滴度。即使无细胞病变也应该于接种后第7天收获。
     7. 将细胞瓶至于生物安全柜内，融化后先温和摇动细胞瓶数次，再用10mL的无菌移液管吸取病毒液置于15mL无菌离心管中，4℃，2000rpm离心10min，沉淀破碎的细胞碎片。
     8. 打开离心机盖，用75%酒精消毒15mL离心管外表面后，拿进生物安全柜。按需要分装。
     9. 贴好标签，内容包括：管内容物名称、来源、体积、收获日期。
     10. 留出一管用于滴度测定、抗原鉴定等相关的实验。其余置－80℃冰箱保存。
2. 结果判定

收获的病毒液可以进行红细胞凝集实验测定血凝素滴度，具体操作参见《仙台病毒毒株（样本）红细胞凝集实验标准操作程序》。如没有红细胞凝集现象，应将收获病毒液再用BHK-21细胞传代两次。同时，病毒液应测定TCID50，具体操作参见《病毒TCID50滴定作业指导书》。分装好的病毒液标记后保存在-80℃超低温冰箱或液氮中，做好记录。

6.4实验后操作

实验结束后按照《实验室清场及污物、废物处理标准操作程序》及《仪器设备污染控制程序》进行清场

**7 鸡胚培养SV病毒毒株（样本）**

7.1实验前准备

7.1.1 验蛋：用照卵灯检测鸡胚，标记出鸡胚的气室与尿囊的界限、胚胎的位置。如果鸡胚是死胚、没有受精、有裂痕、发育不全或表面有好多渗水孔，应弃掉。

7.1.2 进入生物安全二级实验室：按照清单事先准备好所需试剂、耗材和样品，一次性带入实验室，检查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，带入试验物品，登记，进入实验区。准备废弃物容器及消毒液参照《废物处理标准操作程序》及《消毒灭菌》。

7.2培养步骤

7.2.1 将鸡胚的盲端放置在蛋盘上，气室朝上。在蛋壳上标记好拟接种病毒的浓度和鸡胚的编号（通常每个样本接种3个鸡胚）。

7.2.2 用75%酒精棉球消毒鸡胚，在气室端、鸡头方的鸡胚尿囊膜边缘上方0.5cm处用打孔器钻孔。

7.2.3 根据毒种保存时登记的滴度，按照101、102和103EID50剂量接种。用1mL注射器吸出待复苏样品稀释液100μL，从钻孔处向鸡头方向进针、注射到鸡胚尿囊腔中。注射器弃于锐器桶中。

7.2.4 将蜡融化，用蜡将蛋壳上的针孔完全封闭。

7.2.5 将鸡胚用75%的酒精消毒表面后移出生物安全柜，置37℃ 温箱培养鸡胚2-3d。鸡胚进行病毒分离培养时，每天检查鸡胚生长情况，24h内死亡的鸡胚，认为是非特异死亡应弃去。

7.2.6 鸡胚在收获前应4℃过夜或至少放置4h以上。

7.2.7 标记15mL无菌离心管与相应的鸡胚编号一致，用75％酒精消毒鸡胚气室端。

7.2.8 用无菌镊子撕破鸡胚气室蛋壳，撕开鸡胚尿囊膜。一手持一次性移液管，将鸡胚压在一侧，用无菌移液管在药匙另一侧吸鸡胚尿囊液，并置于相应的收集管中。用后的移液管在新鲜配制的有效氯含量0.55%的84消毒液（原液：水=1：9）中浸泡后弃于生物安全柜中的固体垃圾桶内。

7.2.9 收获病毒培养液后的鸡胚在生物安全柜内装入可高压灭菌型生物废物垃圾袋，然后进行高压处理。将鸡胚收获液3000rpm离心5min去除血液和细胞。

7.2.10离心结束后应将离心管取出在安全柜内小心打开，用移液管吸取离心上清至离心管或冻存管内。移液管在新鲜配制的有效氯含量0.55%的（1:9稀释）的84消毒液中浸泡后弃于生物安全柜中的固体垃圾桶内。

7.3结果判定

进行红细胞凝集实验，操作参见SOP《仙台病毒红细胞凝集实验标准操作程序》。

7.4实验后操作

实验结束后按照《废物处理标准操作程序》及《仪器设备管理程序》进行清场。

**8 记录**

8.1 《人员出入实验室登记表》

8.2 《相关仪器设备使用记录》

8.6 《-80℃冰箱保存记录》

**9 支持性文件**

* 1. 《生物安全实验室安全手册》人民卫生出版社，第1版
  2. 《消毒灭菌》
  3. 《仪器设备管理程序》
  4. 《废弃物的处理程序》
  5. 《仙台病毒毒株（样本）红细胞凝集实验标准操作程序》
  6. 《仙台病毒风险评估文件》

**仙台病毒毒株（样本）保藏质量控制标准操作程序**

**1 目的**

加强仙台病毒毒株（样本）管理，确保保藏毒株（样本）的质量。

**2 适用范围**

毒株（样本）保藏涉及的收集、选择、鉴定、保藏、供应和依法交流。

**3 职责**

毒株（样本）保藏实验及管理相关人员。

**4 毒株（样本）接收**

1. 毒株（样本）的接收应有严格的登记制度，建立详细的总帐和分类帐。收到毒株（样本）后应立即进行编号登记，详细记录毒株（样本）的学名、株名、来源、特性、用途、批号、数量。样品状况、确知样品的检测内容（或项目），由操作人员及管理员负责收取。
2. 购入或交换的毒株：包括生物学分类、名称、分离来源、数量、时间、地点、操作人员与鉴定人员、编号，来源机构提供的生物学特性检测与鉴定数据具体情况；
3. 实验室分离的毒株：包括生物学分类、名称、分离来源、数量、时间、地点、操作人员与鉴定人员、编号，已经完成的生物学特性检测与鉴定指标的情况及其他必要的说明。
4. 有关实验人员应对收到的毒株（样本）进行验收，对任何异常均应记录，毒株（样本）与提供的描述不符合或对样品的适用性有疑问时，都应与取样人员取得联系，妥善解决问题。对样品未达到实验要求，以及其适用性有疑问的，在开始工作之前，实验人员应做出进一步说明，必要时加以记录。
5. 实验人员对毒株（样本）验收后，在试验的全过程中及时对毒株（样本）的实验状态按标识方式进行标识，并加以妥善保管。

**5 毒株（样本）的备份与保管**

* 1. 一般情况下每种毒株（样本）都应保存足够的样品，以满足相关实验的要求及需求。
  2. 毒株（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毒株（样本）的损害。
  3. 实施两人共同负责制，保藏地和冰箱实施双人双锁管理。

**6 毒株（样本）的使用及传代**

* 1. 保存的菌种（样本）传代或冻存均应填写专用记录。每年对毒株（样本）进行整理，核查。
  2. 毒株（样本）的使用应详细记录使用具体情况等。
  3. 毒株（样本）保存管上应有牢固的标签，标明毒株（样本）名称、代次、批号、传代日期等。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。

**7 毒种鉴定**

* 1. 若冰箱温度稳定，10年复苏一次毒株。
  2. 若冰箱温度发生变化，需及时复苏毒株，对毒株质量进行鉴定。具体操作参照《仙台病毒毒株（样本）培养标准操作程序》、《仙台病毒毒株（样本）复苏标准操作程序》、《仙台病毒毒株（样本）鉴定标准操作程序》、《仙台病毒毒株（样本）红细胞凝集实验标准操作程序》。
  3. 每次进行毒株质量鉴定都应详细记录鉴定过程及结果。
  4. 毒株鉴定合格后方可用于保藏。

**8 毒株（样本）档案**

实验室保管的所有毒株（样本）都应建立档案，包括病毒分离时所有的原始记录及鉴定记录。

**9 其它管理规定**

从事毒株（样本）保管的工作人员，必须具备相应的资质：

1. 掌握国家有关菌株以及样品库库分类、管理和生物安全法规；
2. 生物学实验室工作2年以上经历，熟练掌握所有微生物种类的实验室技术；
3. 熟练菌株以及样品库保藏的基本技术，包括复苏、增殖、保藏和鉴定其主要 生物学特性的技术；
4. 生物安全理论与操作技能考核合格，取得合格证书；
5. 身心健康。

**10 支持性文件**

1. 《实验室生物安全基础知识》中国实验室国家认可委员会 2004
2. 《病原微生物实验室生物安全管理条例》国务院 2004
3. 《实验室生物安全通用要求》（GB 19489-2008）
4. WHO《生物安全手册》第三版（2004）

**仙台病毒毒株（样本）实验室内传递标准操作程序**

**1 目的**

明确仙台病毒（Sendai virus，SV）毒株（样品）实验室间传递的相关操作程序。

**2 适用范围**

参与SV病毒毒株（样本）实验室内传递的工作人员。

**3 防护要求**

1. 生物安全二级实验室
2. 实验人员防护装备：一次性帽子、医用一次性口罩、一次性手套、工作服、鞋套。

**4 毒株（样本）实验室内的传递**

1. 将实验用毒株（样本）从指定保存位置取出，表面喷洒酒精后放入生物安全柜内；
2. 在生物安全柜内将毒株（样本）取出，认真核实毒株（样本）信息，确保无误后，将毒株（样本）重新装入两层带有封口的密封袋或密封装置中，并注明毒株（样本）名称、数量、状态、毒株编号；
3. 表面喷洒酒精后，拿出安全柜，装入内部转运箱，送往其他实验室中，并填写（菌）毒种流向表。
4. 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》及《仪器设备标准操作程序》进行清场。

**5 文件支持**

1. 《动物病原微生物菌（毒）种保藏管理办法》中华人民共和国农业部令第16号
2. 《病原微生物实验室生物安全》，人民卫生出版社，2006年5月1日
3. 《中国医学科学院病原微生物菌（毒）种保藏中心运行管理办法（试行）》医科院 171号
4. 《国家自然科技资源平台三、四类微生物菌（毒）种包装、运输和开启技术规程》，源自国家自然科技资源平台项目《自然科技资源收集整理保存技术规程研究制定》项目组，二〇〇四年十二月十日
5. 《实验室人员进出实验室程序》
6. 《实验后清场及污物、废物处理标准操作程序》
7. 《仪器设备标准操作程序》
8. 《仙台病毒风险评估文件》

### 仙台病毒毒株（样本）复苏标准操作程序

**1 目的**

明确仙台病毒（Sendai virus，SV）毒株（样本）复苏的相关实验技术操作。

**2 适用范围**

本标准操作程序适用于SV病毒毒株（样本）复苏操作的相关实验人员。

**3 试剂和材料**

3.1 保存的SV病毒毒株及样本

3.2 9-11日龄SPF级鸡胚

3.3 1%鸡红细胞或人“O”型红细胞

**4 仪器设备**

4.1生物安全柜

4.2 低速冷冻离心机

4.3 CO2培养箱

**5 耗材**

* 1. 照蛋器
  2. 钻孔器
  3. 蜡
  4. 1mL一次性注射器
  5. 一次性垫纸
  6. 一次性移液管

**6 实验前准备**

* 1. 验蛋：用照卵灯检测鸡胚，标记出鸡胚的气室与尿囊的界限、胚胎的位置。如果鸡胚是死胚、没有受精、有裂痕、发育不全或表面有好多渗水孔，应弃掉。
  2. 进入生物安全二级实验室：按照清单事先准备好所需试剂、耗材和样品，一次性带入实验室，检查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，带入试验物品，登记，进入实验区。凡在生物安全柜内进行的操作均须按照《废弃物的处理程序》执行。准备废弃物容器及消毒液参见《消毒灭菌程序》。可能出现仪器设备的污染按照《主要仪器设备管理程序》处理。

**7 病毒复苏**

1. 将鸡胚的盲端放置在蛋盘上，气室朝上。在蛋壳上标记好拟接种病毒的浓度和鸡胚的编号（通常每个样本接种3个鸡胚）。
2. 用75%酒精棉球消毒鸡胚，在气室端、鸡头方的鸡胚尿囊膜边缘上方0.5cm处用打孔器钻孔。
3. 根据毒种保存时登记的滴度，按照101、102和103EID50剂量接种。用1mL注射器吸出待复苏样品稀释液100ul，从钻孔处向鸡头方向进针、注射到鸡胚尿囊腔中。注射器弃于锐器桶中。
4. 将蜡融化,用蜡将蛋壳上的针孔完全封闭。
5. 将鸡胚用75%的酒精消毒表面后移出生物安全柜，置37℃ 温箱培养鸡胚2-3d。鸡胚进行病毒分离培养时，每天检查鸡胚生长情况，24h内死亡的鸡胚，认为是非特异死亡应弃去。
6. 鸡胚收获：
7. 鸡胚在收获前应4℃过夜或至少放置4h以上。
8. 标记15mL无菌离心管与相应的鸡胚编号一致。用75％酒精消毒鸡胚气室端。
9. 用无菌镊子撕破鸡胚气室蛋壳，撕开鸡胚尿囊膜。一手持不锈钢药匙，将鸡胚压在一侧，用无菌移液管在药匙另一侧吸鸡胚尿囊液，并置于相应的收集管中。用后的移液管在新鲜配制的有效氯含量0.55%的84消毒液（原液：水=1：9）中浸泡后弃于生物安全柜中的固体垃圾桶内。
10. 收获病毒培养液后的鸡胚在生物安全柜内装入可高压灭菌型生物废物垃圾袋，然后进行高压处理。将鸡胚收获液3000rpm，离心5min去除血液和细胞。
11. 离心结束后应将离心管取出在安全柜内小心打开，用移液管吸取离心上清至离心管或冻存管内。收集分装后离心管或冻存管应清楚标记内容物名称、收集日期等信息，并及时做好相关记录。留一管样品用于毒株鉴定，其余样品尽快移入低温冰箱保存。移液管在新鲜配制的有效氯含量0.55%的（1:9稀释）的84消毒液中浸泡后弃于生物安全柜中的固体垃圾桶内。

**8 结果判定**

进行红细胞凝集实验，操作参见《仙台病毒毒株（样本）红细胞凝集实验标准操作程序》。

**9 实验后操作**

实验结束后按照《实验清场及污物、废弃物的处理标准操作程序》及《消毒灭菌》进行清场。

**10 记录**

* 1. 《人员出入实验室登记表》
  2. 《仪器设备使用记录》
  3. 《低温冰箱保存记录》

**11 支持性文件**

* 1. 《生物安全实验室安全手册》人民卫生出版社，第1版
  2. 《管理通用文件》
  3. 《消毒灭菌》
  4. 《实验室人员进出实验室程序》
  5. 《主要仪器设备标准操作程序》
  6. 《实验室实验清场及污物、废弃物的处理标准操作程序》
  7. 《仙台病毒毒株（样本）红细胞凝集实验标准操作程序》
  8. 《仙台病毒风险评估文件》

### 仙台病毒实验意外事故处理标准操作程序

**1 目的**保证工作人员、实验环境在进行仙台病毒实验过程中免受病原微生物的污染，保证实验设备的安全运转。

**2 适用范围**

从事仙台病毒生物安全二级实验室意外事故处理。

**3 职责**

从事仙台病毒实验室技术人员、后勤服务人员。

**4 材料**

23.4.1 75%酒精

23.4.2有效氯含量为0.5%的次氯酸钠消毒液

23.4.3 3%过氧化氢

23.4.4急救箱

23.4.5纸巾

23.4.6可高压灭菌型生物废物垃圾袋

**5 内容**

5.1皮肤与感染性物质接触：迅速到半污染走廊，脱去外层手套，污染部位用生理盐水冲洗，并用75%酒精喷壶浸湿纸巾擦拭。

5.2皮肤的损伤或刺伤等都可能与传染然性物质接触：皮肤损伤可能是注射器刺伤、刀片划伤。如发生应迅速到半污染走廊，脱去双层手套，用生理盐水冲洗，如果可能尽量挤出损伤处的血液，禁止进行伤口的局部挤压。打开急救箱，使用75%酒精或碘伏消毒。如伤势情况严重立即离开实验室，由保健医生或到协和医院进行医疗处理。报告生物安全员和分中心主任，填写《事故记录表》。

5.3眼睛溅入液体：迅速到半污染走廊，脱去外层手套，用生理盐水冲洗，且避免揉擦眼睛，连续冲洗至少十分钟。报告生物安全员和分中心主任。填写《事故记录表》。

5.4少量感染物溢出产生有限气溶胶：

（1）在生物安全柜中发生的泄漏，如吸头、吸管滴落传染性材料等，用浸透有效氯含量为0.5%的次氯酸钠消毒液或75%酒精的纸巾覆盖污染区域，直接将纸巾轻轻卷起，放入可高压灭菌型生物废物垃圾袋中后，放入高压锅中的桶内121℃，30分钟高压灭菌；

（2）如果少量污染物污染了纸巾以外的台面，同样用浸透有效氯含量为0.5%的次氯酸钠消毒液或75%酒精的纸巾覆盖污染区域，15分钟后将纸巾放入可高压灭菌型生物废物垃圾袋，用新的消毒纸巾重新覆盖污染区域，待实验结束后，彻底消毒台面，紫外照射。

（3）如果安全柜中有毒管或培养瓶掉到安全柜外，少量溢出，以浸透有效氯含量为0.5%的次氯酸钠消毒液或75%酒精的纸巾覆盖污染区域，打开房间紫外灯，离开实验室。15分钟后将纸巾放入可高压灭菌型生物废物垃圾袋，用新的消毒纸巾擦拭污染区域，并对污染的器材进行消毒处理。消毒外层一次性乳胶手套，摘掉换新的一次性乳胶手套。

5.5生物安全柜内大量污染：

如大量病毒培养物溢出等，可能产生大量气溶胶，应用75%酒精喷洒污染区域，打开生物安全柜和房间的紫外灯，离开实验室。离开实验室时应在实验室门上贴上明显的标志，报告实验室安全负责人，认真填写《事故记录表》。1小时后回到实验室用浸透有效氯含量为0.5%的次氯酸钠消毒液或75%的酒精的纸巾覆盖污染区域，待30分钟后，用新的消毒纸巾擦拭污染区域，并对污染的器材进行消毒处理。注意：如污染衣物手套，应用消毒液消毒后立即更换，并按有关规定放入灭菌袋中高压消毒。

5.6生物安全柜外发生大的污染，产生大量气溶胶：

5.6.1如培养板或培养瓶掉落在生物安全柜外，大量病毒液溢出。应立即停止实验，贴上明显标志，封上实验室的门，报告安全负责人，4小时内不准任何人进入实验室。4小时后穿戴电动送风过滤式呼吸器防护装置再进入实验室，用过氧化氢喷雾消毒实验室（具体操作：将1L 3%过氧化氢溶液倒入喷雾器中喷雾），离开实验室。一小时后进入实验室。打扫污染区域。事故发生后应立即通知生物安全负责人。事后填写《事故记录表》。

5.6离心时离心管、采血管破裂：

5.6.1离心结束后将带离心管的转子运至生物安全柜中，如打开转子盖后发现离心管、采血管发生了破裂，应立即关闭转子盖，并通知实验室安全负责人。

5.6.2 30min后，小心打开转子盖，向转子内大量喷洒75%酒精，关闭转子盖。用75%的酒精消毒外层一次性乳胶手套，摘掉。带上防割手套，在防割手套外再带新的一次性乳胶手套。

5.6.3 30min后，小心打开转子盖，用镊子加出离心管碎片，置生物安全垃圾袋中高压消毒。未破损的带盖离心管应放在另一个有有效氯含量为0.5%的次氯酸钠消毒液（配制方法为原液：水=1：9）的容器中消毒外表面后回收。用无腐蚀性消毒液彻底消毒转子2遍或2遍以上，要特别注意不光滑表面、沟、逢、槽等地方。再用水清洁并干燥。注意清洁时使用的所有材料均按感染性废弃物处理。消毒完毕后，填写《事故记录表》。

5.7衣物和手套污染：

5.7.1尽快用75%酒精消毒手套和防护服，到工作走廊脱掉外层防护手套和外层防护服（必要时请别人帮忙）。

5.7.2将已污染的隔离衣及手套放入可高压灭菌型生物废物垃圾袋中高压消毒。

5.7.3发生污染的地方及放置隔离衣的地方应及时用有效氯含量为0.5%的次氯酸钠消毒液擦拭消毒处理。

5.8仪器设备故障：

5.8.1实验室压力不正常

正确的负压气流是BSL-2实验室重要的安全保障。进入实验室前应检查负压表的指针，发生异常不要进入。报告生物安全员，通报后勤服务中心检修，并作好详细记录。

5.8.2生物安全柜压力表显示异常

实验前生物安全柜开机时压力表显示异常，或实验过程中技术指标偏离正常范围，不符合实验要求，应立即停止实验。报告安全员，通报后勤服务中心检修，并作好详细记录。

5.8.3设施停电

如发生停电，会自动启用备用电源。否则，应立即停止实验，按人员进出程序离开实验室。停电时实验室应急灯会自动打开。电力恢复后，至少等30分钟才能再次进入实验室工作。

5.8.4发生仪器故障

应及时报告安全员，并报后勤服务中心维修，填写仪器维修申请表，检修前应彻底消毒。修理冰箱、培养箱时，应去除所有物品，放入备用设备中，用消毒剂彻底消毒内表面及外表面。仪器换上红标签,仪器的移动按照仪器移动SOP操作。若维修人员必须进入实验区，则应按人员防护及人员进出程序进行，维修工作结束，所有工具在带出实验室前应用75%酒精消毒。实验室人员必须帮助维修和监控维修过程。

5.9毒种或标本丢失:

如发现毒种或标本丢失或缺损，应立即报告分中心主任，迅速查明原因，及时追回。填写事故报告记录。

5.10发生玻璃器具破碎：

实验室应尽量避免使用玻璃等易碎品，如发生玻璃器具破碎，应用扫帚、簸箕、镊子等工具处理，禁止用手。使用过的用具用有效氯含量为0.5%的次氯酸钠消毒液（配制方法为原液：水=1：9）浸泡消毒过夜。

**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

**仙台病毒毒株（样本）红细胞凝集实验标准操作程序**

1. **目的**

明确仙台病毒（Sendai virus，SV）毒株（样本）红细胞凝集实验（亦做血凝试验，HA实验）的相关实验技术操作，明确仙台病毒或样本的血凝素效价，特制定本程序。

1. **适用范围**

本标准操作程序适用于进行SV病毒毒株（样本）红细胞凝集实验的相关实验人员。

1. **程序**
   1. 材料
   2. 样品来源：SV病毒或样本
   3. 细胞： 豚鼠或鸡红细胞
      1. 溶液：
2. 阿氏液（Alsever's Solution），又称红细胞保存液。

在4℃的条件下，红细胞可以保存2周而不改变活性和特性。配方如下：

葡萄糖 2.05克

柠檬酸钠 0.8克

柠檬酸 0.055克

氯化钠 0.42克

加蒸馏水至100毫升，加热溶解后将pH值调到6.1，经0.22微米微孔滤器过滤或9～10磅高压灭菌，室温后，4℃保存备用。

1. 生理盐水
   * 1. 设备：
2. 生物安全柜
3. 立式低速低温离心机
4. 可调移液器
5. 4℃冰箱
6. 微型振荡器
   * 1. 耗材:
7. 移液器枪头
8. 一次性移液管
9. 96孔“U”形微量反应板
10. 15ml离心管
    1. 操作：
       1. 实验前准备：

进入生物安全二级实验室实验前，按照清单事先准备好所需试剂、耗材和样品，一次性带入实验室，进入实验区。准备废弃物容器及消毒液，消毒液的配制见《消毒灭菌程序》。

* + 1. 血凝实验

在生物安全柜内进行。

1. 在96孔微量反应板上进行，自左至右各孔加50μL生理盐水。
2. 于左侧第1孔加25μL病毒液，混合均匀后，25lμL至第2孔，依次倍比稀释至第11孔后弃去25μL；第12孔为红细胞对照。
3. 自右至左依次向各孔加入0.5% 鸡或者豚鼠红细胞悬液25μL，在振荡器上振荡，5℃条件下静置观察结果。(见表1)

表1  病毒血凝试验的操作方法（单位：μL）

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 孔 号 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| 病毒稀释度 | 1:2 | 1:4 | 1:8 | 1:16 | 1:32 | 1:64 | 1:128 | 1:256 | 1:512 | 1:1024 | 1:2048 | 对照 |
| 生理盐水 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 |
| 病毒液 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 |
| 5％红细胞 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 |

* + 1. 结果判定：

从静置后10 min开始观察结果，待对照孔红细胞已沉淀即可进行结果观察。红细胞全部凝集，沉于孔底，平铺呈网状，即为100% 凝集（++++），不凝集者（-）红细胞沉于孔底呈点状。

凝集状态的解释：

－：红细胞沉积于孔底；

＋：红细胞沉积于孔底，周围有散在少量凝集；

＋＋：红细胞形成层凝集，面积较小，边缘较松散；

＋＋＋：红细胞形成片层凝集，面积略多于＋＋；

＋＋＋＋：红细胞形成片层凝集，均匀布满孔底，或边缘皱缩如花边状

* + 1. 实验后操作：

实验结束后按照《生物安全二级实验室清场及污物、废物处理标准操作程序》及《主要仪器设备操作程序》进行清场。

1. **记录**
   1. 人员出入实验室登记表
   2. 仪器设备使用记录
2. **支持性文件**
   1. 生物安全实验室安全手册》人民卫生出版社； 第1版
   2. 实验动物国家标准[GB/T 14926.53-2001](http://www.so.com/link?m=aBlIOU5QvxDYAu3w43B%2FQk0gPoRNE5XtaNGHSWwl2FtPFSeDDTfmzYsjv78g1Y1DS8Pa51Waq8vqaFAP2HTRJi%2F1SKcBzuOC2TM8CtWoiArGT7tIQE0p9plSw%2BWArRT0B69xFaTVVX6svGsAb3dtRuO9XgR4BHMHI9V7lj8C%2FRkXAcETNrv9q5Mt0jy756zJPx2tx6Er3%2BBxCE%2FnUyXOfk6Vzp%2B38zJxkOeBadgH3Q5aeepNlOtGYjafaL0zh2bj0%2FMoggNUX5%2ByV5bizkHfDZg%3D%3D)
   3. 《常用消毒剂配制及使用标准操作程序》
   4. 《实验室人员进出实验室程序》
   5. 《仙台病毒实验室清场及污物、废物处理标准操作程序》
   6. 《仙台病毒风险评估文件》