|  |  |
| --- | --- |
| 编号 | 名称 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-308-01 | 腺病毒毒株（样本）接收操作流程 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-308-02 | 腺病毒毒株（样本）收集操作程序 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-308-03 | 腺病毒毒株（样本）实验室内传递操作程序 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-308-04 | 腺病毒毒株的鉴定保存操作程序 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-308-05 | 腺病毒毒株培养标准操作程序 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-308-06 | 腺病毒毒株（样本）保藏质量控制 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-308-07 | 腺病毒实验后清场及污物、废物处理标准操作程序 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-308-08 | 腺病毒实验人员防护要求和标准操作程序 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-308-09 | 腺病毒实验意外事故处理标准操作程序 |

# 腺病毒标准操作程序目录

**腺病毒（样本）接收操作流程**

**1 目的**

明确毒株(样本)接收相关实验技术的操作。

**2 适用范围**

适用于进行腺病毒（样本）接收的相关实验人员。

**3 防护要求**

3.1 BSL-2实验室。

3.2实验人员穿着合适的防护装备：一次性帽子、医用防护口罩、面罩、一次性手套、防护服、鞋套。

**4 包装要求**

腺病毒培养物应采取B类感染性物质运输包装。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》(Doc9284包装说明PI650)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**

5.1 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。

5.2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。

5.3 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。

5.4 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。

5.5 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 程序**

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，并将样本清单带入实验室；如有破损，应立即报告生物安全员，由生物安全员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。如果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《腺病毒实验后清场及污物、废物处理标准操作程序》进行清场。

**7 文件支持**

7.1 《设施设备标准操作程序》

7.2 WHO《生物安全手册》第三版（2004）

7.3 《腺病毒风险评估和风险控制文件》

7.4 《病原微生物实验室生物安全管理条例》国务院424号（2004）

7.5 《实验室生物安全通用要求》 GB 19489-2008

7.6 《BSL-2实验室管理规范》

7.7黄祯祥主编. 医学病毒学基础与实验技术. 北京：科学出版社，1990。

**腺病毒（样本）收集程序**

**1 目的**

明确腺病毒（样本）收集的相关实验技术的操作。

**2 适用范围**

适用于进行腺病毒（样本）收集的相关实验人员。

**3 防护要求**

3.1 BSL-2生物实验室。

3.2 实验人员穿着合适的防护装备：一次性帽子、医用防护口罩、一次性手套、防护服、鞋套。

**4 包装要求**

腺病毒培养物应采取B类感染性物质运输包装，具体包装要求符合《病原微生物实验室生物安全》中包装说明。包装外应印有规定的生物危险标签、标识、运输登记表、警告用语和提示用语。

**5 信息要求**

5.1 毒株采用种子批系统。原始种子批（Primary seed Lot）应验明其记录、历史、来源和生物学特性。从原始种子批传代、扩增后保存的为主种子批（Master seed Lot）从主种子批传代、扩增后保存的为工作种子批（Working seed Lot）。工作种子批的生物学特性应与原始种子批一致，每批主种子批和工作种子批均应按规程要求保管、检定和使用。

5.2 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。

5.3 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。

5.4 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。

5.5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。

5.6 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**

6.1 WHO《生物安全手册》第三版（2004）

6.2《病原微生物实验室生物安全管理条例》国务院424号（2004）

6.3《实验室生物安全通用要求》 GB 19489-2008

6.4《设施设备标准操作程序》

6.5《腺病毒风险评估和风险控制文件》

6.6 《BSL-2实验室管理规范》

6.7黄祯祥主编. 医学病毒学基础与实验技术. 北京：科学出版社，1990。

**腺病毒（样本）实验室间传递操作程序**

**1 目的**

明确腺病毒（样品）实验室间传递的相关操作程序。

**2 适用范围**

参与腺病毒（样本）实验室间传递的工作人员。

**3 防护要求**

3.1生物安全二级实验室

3.2实验人员防护装备：一次性帽子、医用防护口罩、一次性手套、防护服、鞋套。

**4 毒株（样本）实验室间的传递**

4.1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；

4.2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；

4.3表面喷洒75%酒精后，拿出安全柜，放入内部转运箱，送往其他实验室中，并填写（菌）毒种流向表。

4.4实验结束后按照《腺病毒实验后清场及污物、废物处理标准操作程序》进行清场。

**5 文件支持**

5.1 WHO《生物安全手册》第三版（2004）

5.2 《病原微生物实验室生物安全管理条例》国务院424号（2004）

5.3 《实验室生物安全通用要求》 GB 19489-2008

5.4 《设施设备标准操作程序》

5.5 《腺病毒风险评估文件》

5.6 《腺病毒实验后清场及污物、废物处理标准操作程序》

5.7 《BSL-2实验室管理规范》

5.8黄祯祥主编. 医学病毒学基础与实验技术. 北京：科学出版社，1990。

**腺病毒（样本）的鉴定保存操作程序**

**1 目的**

明确腺病毒（样本）的鉴定保存相关实验技术的操作。

**2 适用范围**

适用于进行腺病毒（样本）的鉴定保存相关的实验人员。

**3 鉴定方法**

**3.1 5型腺病毒PCR检测**

3.1.1材料

3.1.1.1 2.5mM双脱氧核苷酸三磷酸（dNTP）混合物

3.1.1.2 超纯水

3.1.1.3 Taq DNA多聚酶及缓冲液

3.1.1.4制备的病毒DNA

3.1.1.5 PCR引物

推荐引物序列

第一对：

上游引物（18858-18883 bp）：

5’-GCC (C/G)CA (G/A)TG G(G/T)C (T/A)TA CAT GCA CAT C-3’

下游引物（19158-19136 bp）：

5’-CAG CAC (G/C)CC ICG (A/G)ATGTC AAA-3’

扩增出301bp片段

第二对：

上游引物（18931-18955bp）：

 5’-GCC CG(C/T) GC(A/C) ACI GAIAC(G/C) TAC TTC-3’

下游引物（19075-19103 bp）：

5’-CC(C/T) AC(A/G) GCC AGI GT(A/G) (A/T)AI CG(A/C)(A/G)C(C/T) TTG TA-3’

扩增出171bp片段

第三对：

上游引物（21592-21617 bp）：

 5’-ATG ACT TTT GAG GTG GAT CCC ATG GA-3’

下游引物（21726-21703bp）：

5’-GCC GAG AAG GGC GTG CGC AGG TA-3’

扩增出134bp片段

第四对（生物梅里埃公司提供）：

上游引物（Hexon 基因）：

 5’- TCC ACH GCY TGR TTC CAC AT-3’

下游引物（Hexon 基因）：

5’- GTG GTW GAY TTG CAR GAC AGA AA -3’

扩增出104bp片段

3.1.2设备

3.1.2.1高速离心机

3.1.2.2 PCR扩增

3.1.2.3微量加样器

3.1.2.4 PCR管

3.1.3场所

BSL-2实验室操作，需要无菌操作。

3.1.4 操作步骤

3.1.4. 1 DNA的制备

用于PCR分析的DNA的制备应尽可能简单，以使污染的危险性降至最低。

（1）分离的病毒感染的组织培养管的上清加热灭活后可以直接进行PCR扩增。

（2）临床标本需要提取病毒DNA，商品化试剂盒可以满足要求。

（3）病毒DNA 的提取应在BSL-2实验室进行。用QIAGEN 试剂盒 (QIAamp DNA Mini Kit)提取DNA

（4）标本：用于全血，血清，血浆，淋巴细胞或体液标本

（5）其他标本的处理

①咽拭子标本：将咽拭子放入400µl PBS中，挤干。按下列步骤操作。

②便标本：将0.5～1.0ml粪便标本悬浮于0.89% 的NaCl中（1:10稀释）；4000g×离心20min；0.22µm的滤器过滤；取200µl滤过液按下列步骤操作。

（6）操作步骤：

① 吸20µl QIAGEN蛋白酶（或蛋白酶K）到1.5ml的微量管底。

② 加入200µl标本。（200µl全血，血清，血浆，或体液，或将5 X 106的淋巴细胞溶入200µl PBS中。如果标本量不足200µl，用PBS补足。）

③ 加入200µl buffer AL，用涡旋震荡器混匀15s（充分混匀）。 （标本量大于200µl的，等比增加蛋白酶和buffer AL的量）

④ 56℃孵育10min。

⑤ 短暂离心。

⑥ 加入200µl乙醇（96-100%），用涡旋震荡器混匀15s（充分混匀）。短暂离心。（标本量大于200µl的，等比增加乙醇的量）

⑦ 将QIAamp离心柱放入2ml的收集管中，小心将步骤6中的混合物加

入离心柱中，不要碰到管口。盖上盖，8000rpm 离心1min。将离心柱放入另一个干净的收集管中（已提供），弃去装废液的收集管。

⑧ 小心打开离心柱，加入500µl buffer AW1，不要碰到管口。盖上盖，8000rpm离心1min。将离心柱放入另一个干净的收集管中（已提供），弃去装废液的收集管。

⑨ 小心打开离心柱，加入500µl buffer AW2，不要碰到管口。盖上盖，14000rpm离心3min。将离心柱放入另一个干净的收集管中（未提供），弃去装废液的收集管。再次离心1min。

⑩ 将离心柱放入一个干净的1.5ml的微量管中（未提供），弃去装废液的收集管。小心打开离心柱，加入200µl buffer AE或蒸馏水，室温放置1min，8000rpm 离心1min。

3.1.4. 2 PCR扩增

（1） PCR反应混合液配制

DNA 模板 据浓度的不同，取合适的量（5~10ul）

上游引物 1μl

下游引物 1μl

2.5mmol/L dNTP 4μl

PCRBuffer 5μl

补加H20至总体积至49.5μl

瞬时离心，使各成分混匀。

**【注意**：PCR反应体系应同时设有不加病毒 DNA的阴性对照和加已知阳性标本的阳性对照。】

（2）94℃预变性3min, 立即至冰浴5min，加TaqDNA多聚酶 0.5μl

（3）进入PCR循环

94℃ 40S

 55℃ 40S( 第一对和第二对引物)或52℃ 40S(第三对引物)

 72℃ 40S

 共35个循环，72℃ 延伸10min.

（4）琼脂糖凝胶电泳观察PCR产物大小。

（5）结果解释

本PCR实验通过检测六邻体基因中的共同核苷酸序列来识别5型腺病毒，三对引物分别扩增出301bp，171bp和134bp的基因片段，三对通用引物联合应用，基本上可以诊断包括常见的5型腺病毒型别：1，2，3，4，5，7，11，12，21，25，34，35，40，41等，如果阴性对照和阳性对照的结果分别为阴性和阳性，则实验结果应该是可靠的，必要时可以进行DNA序列分析进一步证实。

3.1.5 清场

(1) 无菌操作结束后，及时清理洁净区内的物品，用无菌消毒剂擦试工作台面、墙（内）壁，II级生物安全柜风机继续运行20min后关闭风机，填写记录。

(2) 将废弃的物品送指定地点进行处理。

(3) 将废弃的溶液送指定地点进行处理。

(4) 未使用完的溶液按要求放入存放地点。

(5) 操作间地面用指定的消毒剂消毒处理。

(6) 确定实验区内无本次操作遗留的物品、标签、记录等物。

(7) 检查实验区内用电设备运行正常、安全。

3.2 5型腺病毒分型试验-SN实验

3.2.1 试剂与细胞

常规的7日SN试验

3.2.1.1 HBSS (Hanks平衡盐溶液)

3.2.1.2 型腺病毒各型抗血清

3.2.1.3 细胞

原代人胚肾细胞是培养5型腺病毒的最佳细胞，除了40和41型以外，所有5型腺病毒在293细胞系中的生长状况较好。HEP-2、HeLa和KB等来自上皮细胞的细胞系对5型腺病毒敏感。

最广泛使用的3日SN方法

3.2.1.4 维持液

 MEM 95ml

胎牛血清 2ml

PS 1ml

Gln 1ml

NaHCO3 1ml

3.2.1.5细胞 MK细胞（恒河猴肾细胞），无MK细胞时可用建立的MK传代细胞系如Vero、LLC-MK2或BSC-1。

3.2.2 设备

3.2.2.1倒置生物显微镜

3.2.2.2恒温培养箱

3.2.2.3冰箱

3.2.2.4 BSL-2生物安全柜

3.2.2.5试管、吸管 细胞管/瓶

3.2.3 场所

BSL-2实验室操作，需要无菌操作。

3.2.4 操作步骤

3.2.4.1常规的7日SN试验

（1）测定分离物在细胞上的感染滴度

①用HBSS对病毒进行连续10倍稀释；

②每个稀释度接种3支细胞管，每管0.1ml；

③ 36℃培养7d后，根据CPE读出终点(或滴度) ，该滴度可看作是1个50%

组织培养感染剂量( 50% tissue culture infective dose, TCID50)/0.1ml。

（2）4.1.2分型试验

①用100个TCID50/0.1ml作为病毒的工作稀释度；

②型特异性抗血清56℃灭活30min；

③灭活后的抗血清用HBSS从1:10倍比稀释到1:1280；

④ 0.3ml病毒稀释液与0.3ml的每种抗血清混合，室温孵育1h；

⑤接种3管新鲜的细胞培养物，每管0.2ml，36℃培养7d；

⑥同时设未接种的细胞对照和背景滴定，后者由试验中所用工作稀释度的10倍连续稀释物组成

（3）结果判定：常规的7日SN方法的结果判定：第7d对结果进行最终判读。背景滴定应表明CPE终止于第2个稀释度附近。抑制CPE时达到或接近的一种抗血清的相应滴度显示出病毒的血清型。因此抗体终点被定义为完全中和CPE的最高血清稀释度的倒数。

3.2.4.2最广泛使用的3日SN方法

这种方法是在MK、Vero、LLC-MK2或BSC-1细胞上进行的3日试验，这种方法不测定对感染的抑制，但可测定对顶点壳粒产生的病毒毒性的抑制作用。

（1）测定分离物在细胞上的感染滴度

①用维持液对病毒进行连续倍比稀释液（1:1-1:128）；

② 0.1ml 稀释的病毒液接种到含1ml维持液的细胞培养物中，同时做三瓶细胞；

③ 35-36℃培养，第3d对CPE进行判读。第3d在细胞上产生1+~2+ CPE（即25~50% 的细胞片被累及）的病毒最高稀释度被认为是滴定终点，该终点后退1个稀释度即是SN试验中应使用的病毒剂量。

（2）分型实验

①型特异性抗血清56℃灭活30min；

②灭活后的抗血清用HBSS从1:10倍比稀释到1:1280；

③ 0.3ml病毒稀释液与0.3ml的每种抗血清混合，室温孵育1h；

④接种3管新鲜的细胞培养物，每管0.2ml，36℃培养3d；

⑤同时设未接种细胞对照管和3个病毒对照管，后者含0.1ml 试验所用的工

作稀释液。

（3）结果判定

3日SN方法的结果判定：培养的第3d对结果进行最终判读。此时，病毒对照应出现1+~2+ CPE。抑制CPE时达到或接近的一种抗血清的相应滴度显示出病毒的血清型。

3.2.5 清场

（1）无菌操作结束后，及时清理洁净区内的物品，用无菌消毒剂擦试工作台面、墙（内）壁，II级生物安全柜风机继续运行20min后关闭风机，填写设备运行记录。

（2） 将废弃的物品送指定地点进行处理。

（3）将废弃的溶液送指定地点进行处理。

（4）未使用完的溶液按要求放入存放地点。

（5）操作间地面用指定的消毒剂消毒处理。

（6）确定实验区内无本次操作遗留的物品、标签、记录等物。

（7）检查实验区内用电设备运行正常、安全。

**4. 支持文件**

4.1 《设施设备标准操作程序》

4.2 WHO《生物安全手册》第三版（2004）

4.3 《腺病毒风险评估和风险控制文件》

4.4 《病原微生物实验室生物安全管理条例》国务院424号（2004）

4.5 《实验室生物安全通用要求》 GB 19489-2008

4.6 《BSL-2实验室管理规范》

4.7黄祯祥主编. 医学病毒学基础与实验技术. 北京：科学出版社，1990。

### 腺病毒（样本）培养标准操作程序

**1 目的**

明确腺病毒（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腺病毒（样本）培养的相关实验人员。

**3 试剂和材料**

**3.1 5型腺病毒标本的采集和处理**

3.1.1试剂

3.1.1.1维持液

MEM 95ml

胎牛血清 2ml

PBS 1ml

Gln 1ml

NaHCO3 1ml

3.1.1.2含20%胎牛血清的RPMI培养液

RPMI 77ml

胎牛血清 20ml

PBS 1ml

Gln 1ml

NaHCO3 1ml

3.1.1.3抗生素：庆大霉素（10mg/ml） 抗真菌素（250μg/ml）。

3.1.1.4 PBS pH 7.4

8 g NaCl

0.2 g KCl

1.44 g Na2PO4

3.1.1.5 pH7.4-7.6的Hanks氏液或Eagle液

3.1.2设备

3.1.2.1低温离心机

3.1.2.2冰箱

3.1.2.3无菌外科剪刀

3.1.2.4无菌的玻璃匀浆器或带沙子研磨剂的无菌研钵

3.1.2.5 Ficoll-Hypaque梯度仪

3.1.3场所 BSL-2实验室操作，需要无菌操作。

3.1.4 操作步骤

3.1.4.1采样液配制

常用的采样液为：普通肉汤，pH7.4-7.6的Hanks氏液或Eagle氏液或水解乳蛋白液。在采样液中需加入抗菌素，多用青、链霉素。

3.1.4.2样品采集

（1）鼻拭子

将棉签轻轻插入鼻道内鼻腭处，停留片刻后缓慢转动退出。以同一拭子拭两侧鼻孔。将棉签浸入4-5ml采样液的管中，尾部弃去。然后，塞紧或盖好管盖。（2） 咽拭子

用棉签擦拭双侧咽扁桃体及咽后壁，同样将棉签头浸入4-5ml采样液的管中，尾部弃去，塞紧或盖好管盖。

注：亦可将鼻、咽拭子收集于同一采样管中，以便提高分离率，减少工作量。（3） 鼻咽抽取物或抽取气管和支气管分泌物

用与负压泵相连的收集器从鼻咽部抽取粘液或从气管抽取气管和支气管分泌物。先将收集器头部插入鼻腔或气管，接通负压，旋转收集器头部并缓慢退出。收集抽取的粘液，并用采样液涮洗收集器3次。近来国内有用小孩导尿管接在50ml注射器上来替代收集器。

（4）粪便或直肠拭子，尿、尿道或宫颈拭子 ，活检或尸检组织材料

以上都是可根据病人症状获得的合适标本。

（5） 血样

用血清学方法建立或证实诊断需要配对的血样。第一份样品在症状出现后应立即尽快收集，第二份应在2-4周后收集。凝固后，在无菌条件下分离血清并于-10～-20℃保存。

3.1.4.3样品运送

标本应在≤4℃条件下，尽快送至实验室。由于病毒容易失活，采集到的标本应尽快进行接种敏感细胞或放置在-70℃下保存。

3.1.4.4病毒分离

（1） 呼吸道和尿液样品

用抗生素处理，然后低速离心3min以除去细胞、纤维和其它碎片使其澄清。

（2） 粪便标本

用PBS或维持液制成10-20%悬液，必要时加玻璃珠振荡，离心30min使其澄清。

（3）活检或尸解组织

 用无菌外科剪刀剪成小块，在无菌的玻璃匀浆器或带沙子研磨剂的无菌研钵中，用5ml PBS或维持液磨成匀浆。以这种方式制成10-20%的悬液，并通过低

速离心使其澄清。

（4）血样

 将3ml肝素化血细胞置于Ficoll-Hypaque梯度上，制备血单核细胞用以培养。这些细胞洗涤后重悬于含20%胎牛血清的RPMI培养液中并使其最终浓度为1.5×106细胞/ml。取部分(0.5ml)细胞悬液加至人胚胎成纤维细胞饲养层中进行共同培养。

3.1.5 清场

（1）无菌操作结束后，及时清理洁净区内的物品，用无菌消毒剂擦试工作台面、墙（内）壁，生物安全柜继续运行20min后关闭风机，填写设备运行记录。

（2）将废弃的物品送指定地点进行处理。

（3）将废弃的溶液送指定地点进行处理。

（4）未使用完的溶液按要求放入存放地点。

（5）操作间地面用指定的消毒剂消毒处理。

（6）确定实验区内无本次操作遗留的物品、标签、记录等物。

（7）检查实验区内用电设备运行正常、安全。

**3.2 5型腺病毒的传代培养**

3.2.1试剂

 维持液

 MEM 95ml

胎牛血清 2ml

PBS 1ml

Gln 1ml

NaHCO3 1ml

3.2.2 细胞

5型腺病毒可以在连续传代的下列细胞上复制并产生CPE：

3.2.2.1上皮来源的细胞系如HeLa、KB、A549或HEP-2；

3.2.2.2 原代人胚肾细胞如HEK；

3.2.2.3 人胚肺成纤维细如HELF, WI38, MRC-5；

3.2.3 设备

3.2.3.1 倒置生物显微镜

3.2.3.2 恒温培养箱

3.2.3.3 冰箱

3.2.3.4 BSL-2生物安全柜

3.2.4 场所

BSL-2实验室操作，需要无菌操作。

3.2.5 操作步骤

标本收到后应尽快接种到敏感细胞上。

3.2.5.1成片细胞弃生长液，用Hanks氏液洗两遍；

3.2.5.2未稀释的受试材料(0.5~1.0ml)接种到一瓶细胞中，轻晃细胞瓶，使标本完全覆盖细胞，室温吸附1h；

3.2.5.3倒掉感染液，再用Hanks´氏液洗1-2遍，每瓶加入3ml（随瓶的大小而异）维持液于35-36℃培养。

注意：应对所用细胞类型的几个未接种管进行培养，观察非特异性细胞退化的迹象并最终在定性试验中作为阴性对照。

3.2.5.4全部培养物， 包括盲传者，需每周观察两次CPE，需要时可换新鲜维持液，两周后传代一次（对于HEK或成纤维细胞）或传代3次，每次间隔1周(对于连续传代的上皮细胞)。

这样所有的培养物均可维持并观察28d。这种方法可获得最高的分离率。

3.2.5.5改进的5型腺病毒分离方法—“壳瓶” (shell vial)技术

（1）在盖玻片上建立细胞单层；

（2）然后加入临床样品，孵育1或2d；

（3）用抗六邻体MAb或其他抗血清在盖玻片上做IFA试验，以确定5型腺病毒的有无。

将接种过的培养物简单离心可提高其灵敏度。

3.2.6 清场

(1) 无菌操作结束后，及时清理洁净区内的物品，用无菌消毒剂擦试工作台面、墙（内）壁，生物安全柜继续运行20min后关闭风机，填写设备运行记录。

(2) 将废弃的物品送指定地点进行处理。

(3) 将废弃的溶液送指定地点进行处理。

(4) 未使用完的溶液按要求放入存放地点。

(5) 操作间地面用指定的消毒剂消毒处理。

(6) 确定实验区内无本次操作遗留的物品、标签、记录等物。

(7) 检查实验区内用电设备运行正常、安全。

**4 支持性文件**

4.1《实验室生物安全通用要求》 GB 19489-2008

4.2 《仪器设备标准操作程序》

4.3 《腺病毒实验人员防护要求和标准操作程序》

4.4 《腺病毒实验室清场及污物、废物处理标准操作程序》

4.5 《腺病毒实验室意外事故处理标准操作程序》

**5 参考文献**

[1] 黄祯祥主编. 医学病毒学基础与实验技术. 北京：科学出版社，1990

[2] 郭元吉 程小雯著. 流行性感冒病毒及其实验技术. 北京：中国三峡出版社，1997

[3] 《实验室生物安全管理规范》

[4] 《BSL-2实验室管理规范》

[5] 《实验室生物安全分级操作管理规范》

**腺病毒（样本）保藏质量控制操作程序**

**1 目的**

明确腺病毒（样本）的质量控制相关实验技术的操作。

**2 适用范围**

适用于进行腺病毒（样本）的质量控制相关的实验人员。

**3 内容**

3.1 5型腺病毒TCID50

3.1.1试剂

3.1.1.1待测病毒液
3.1.1.2维持液

 MEM 95ml

胎牛血清 2ml

PBS. 1ml

Gln 1ml

NaHCO3 1ml

3.1.2 细胞

3.1.2.1上皮来源的细胞系如HeLa、KB、A549或HEP-2；

3.1.2.2原代人胚肾细胞如HEK；

3.1.2.3人胚肺成纤维细如HELF, WI38, MRC-5；

3.1.3 设备

3.1.3.1倒置生物显微镜

3.1.3.2恒温培养箱

3.1.3.3冰箱

3.1.3.4BSL-2生物安全柜

3.1.3.5组织培养板或细胞瓶及加样器、吸管、试管等

3.1.4 场所

BSL-2实验室操作，需要无菌操作。

3.1.5 操作步骤

3.1.5.1 用维持液10倍稀释待测病毒液。

3.1.5.2将0.1ml各稀释度的病毒接种于形成单层的培养板（每稀释度接种4孔）37℃CO2培养箱中孵育1h。

3.1.5.3取出培养板，吸去病毒液，补加1ml维持液。

3.1.5.4将培养板置于CO2培养箱中37℃培养数日。

3.1.5.5观察CPE,找出能引起半数细胞瓶或管感染的病毒稀释倍数，按ReedMuench法计算出该病毒液的TCID50效价。

由表9-1看出，能使50%细胞管出现病变的病毒稀释度在10-4~10-5之间，其中间距离比例按Reed和Muench公式计算：
TCID50＝高于50%病变的病毒最高稀释度的对数＋距离比例

故能使50%细胞管发生病变的病毒稀释度为10-4.5，即TCID50为104.5倍，当病毒悬液做104.5倍稀释时，0.1ml中含1个TCID50，作其他一些实验时（如中和试验），一般常用100TCID50/0.1ml。

3.1.6 清场

(1) 无菌操作结束后，及时清理洁净区内的物品，用无菌消毒剂擦试工作台面、墙（内）壁，生物安全柜继续运行20min后关闭风机，填写设备运行记录。

(2) 将废弃的物品送指定地点进行处理。

(3) 将废弃的溶液送指定地点进行处理。

(4) 未使用完的溶液按要求放入存放地点。

(5) 操作间地面用指定的消毒剂消毒处理。

(6) 确定实验区内无本次操作遗留的物品、标签、记录等物。

(7) 检查实验区内用电设备运行正常、安全。

3.2空斑形成试验

3.2.1试剂

3.2.1.1待测病毒液

3.2.1.2维持液

MEM 95ml

胎牛血清 2ml

PBS. 1ml

Gln 1ml

NaHCO3 1ml

3.2.1.3 Hank's液

3.2.1.4 1.5％覆盖琼脂

3.2.2 细胞

3.2.2.1上皮来源的细胞系如HeLa、KB、A549或HEP-2；

3.2.2.2原代人胚肾细胞如HEK；

3.2.2.3人胚肺成纤维细如HELF, WI38, MRC-5；

3.2.3 设备

3.2.3.1倒置生物显微镜

3.2.3.2恒温培养箱

3.2.3.3冰箱

3.2.3.4 II级生物安全柜

3.2.3.5塑料组织培养板或细胞瓶及加样器、吸管、试管等。

3.2.4 场所

BSL-2实验室操作，需要无菌操作。

3.2.5 操作步骤

3.2.5.1将待测病毒用维持液作10倍系列稀释。

3.2.5.2将24h培养生长良好的单层细胞培养瓶(皿)内的生长液倒掉，用Hank's液洗涤细胞3次.

3.2.5.3取不同稀释度的病毒液0.5ml，分别接种于细胞培养瓶(皿)内，轻轻摇匀，每个稀释度至少接种2瓶，同时做正常细胞对照。

3.2.5.4放37℃温箱吸附1h，每15min摇动一次。

3.2.5.5弃去病毒液，将已融化的42℃左右琼脂5ml覆盖于各瓶（皿）内，待琼脂凝固后，将琼脂层向上，置37℃避光培养3~5d，逐日观察结果。

3.2.5.6结果观察

由于覆盖琼脂内含有中性红，在红色背底上可见无色的蚀斑。选择蚀斑不融合、分散呈单个数目在30~100个／瓶的细胞瓶（皿），分别计算蚀斑数，再求平均值，并按下述公式计算：

3.2.6 清场

(1) 无菌操作结束后，及时清理洁净区内的物品，用无菌消毒剂擦试工作台面、墙（内）壁，生物安全柜继续运行20min后关闭风机，填写设备运行记录。

(2) 将废弃的物品送指定地点进行处理。

(3) 将废弃的溶液送指定地点进行处理。

(4) 未使用完的溶液按要求放入存放地点。

(5) 操作间地面用消毒剂消毒处理。

(6) 确定实验区内无本次操作遗留的物品、标签、记录等物。

(7) 检查实验区内用电设备运行正常、安全。

3.3中和实验

3.3.1试剂

3.3.1.1待测病毒液

3.3.1.2维持液

MEM 95ml

胎牛血清 2ml

PBS. 1ml

Gln 1ml

NaHCO3 1ml

3.3.2 细胞

上皮来源的细胞系如HeLa、KB、A549或HEP-2；

原代人胚肾细胞如HEK；

人胚肺成纤维细如HELF, WI38, MRC-5；

3.3.3设备

3.3.3.1倒置生物显微镜

3.3.3.2恒温培养箱

3.3.3.3冰箱

3.3.3.4 II级生物安全柜

3.3.3.5塑料组织培养板或细胞瓶及加样器、吸管、试管等。

3.3.4场所

BSL-2实验室操作，需要无菌操作。

3.3.5操作步骤

3.3.5.1病毒滴定

3.3.5.2血清稀释

将血清用维持液10倍稀释，由1:10起，共8个稀释度（10-1~10-8）。每稀释一个稀释度必须换一个吸管，而且要在冰浴中进行。

3.3.5.3血清与抗原结合

0.9ml不同稀释度的血清，各加入0.9ml 100TCID50的病毒，混匀，置4℃2h，或室温1h，病毒对照为用0.9ml维持液代替血清，血清对照为0.9ml最低稀释度血清加0.9ml维持液，正常对照为仅含维持液。

3.3.5.4接种细胞

每个稀释度血清接种4孔/瓶细胞，0.1ml/瓶，补加0.9ml维持液。

3.3.5.5结果观察

同病毒的滴定，病毒对照管应阳性；血清与正常细胞对照应为阴性。

3.3.5.6 50%血清中和终点的计算

以能保护50%细胞培养瓶不被感染的最高稀释度的倒数作为中和终点。中和滴度的计算可用Reed和Muench计算公式。

3.3.6 清场

(1) 无菌操作结束后，及时清理洁净区内的物品，用无菌消毒剂擦试工作台面、墙（内）壁，II级生物安全柜风机继续运行20min后关闭风机，填写设备运行记录。

(2) 将废弃的物品送指定地点进行处理。

(3) 将废弃的溶液送指定地点进行处理。

(4) 未使用完的溶液按要求放入存放地点。

(5) 操作间地面用指定的消毒剂消毒处理。

(6) 确定实验区内无本次操作遗留的物品、标签、记录等物。

(7) 检查实验区内用电设备运行正常、安全。

3.4  **5型腺病毒滴度的滴定——Adeno-XTM 快速滴度试剂盒法**

3.4.1 材料

3.4.1.1甲醇

1.2 PBS (pH 7.4) 0.05mol/L

 NaCl 8.00g

 KCl 0.20g

 KH2PO4 0.24g

 Na2HPO4 1.44g (或 Na2HPO4.12H2O 2.90)

 蒸馏水加至 1000ml

3.4.1.3 1% BSA 牛血清白蛋白(BSA) 1g，加PBS至100ml

3.4.1.4 Adeno-XTM 快速滴度试剂盒

3.4.1.5 细胞培养板

3.4.2 设备

3.4.2.1 CO2培养箱。

3.4.2.2倒置显微镜

3.4.3 场所

BSL-2 实验室，需要生物安全柜。

3.4.4 操作步骤

3.4.4.1感染细胞

（1）12孔板中每孔接种1ml健康的HEK293中（5×105细胞/ml），用标准的生长液。

（2）使用PBS或营养液作为稀释液，制备10倍系列稀释病毒样品，从10-2~10-6/ml。

（3）每孔逐滴加入100μl病毒稀释液，每个稀释度的病毒都做副孔，以确保准确。

（4）细胞板置37℃ 5%CO2温箱孵育48h。

（5） 吸出营养液，细胞加盖干燥5min。

3.4.4.2固定细胞加抗体

（1）每孔轻轻地加入1ml预冷的100%甲醇固定细胞。

（2） -20℃孵育细胞板10min。

（3）吸出甲醇，用1mlPBS+1%BSA轻轻洗板三次。

（4）用PBS+1%BSA按1：1000稀释鼠抗六邻体抗体。

（5）每孔加0.5ml抗六邻体的抗体，37℃孵育1h。

（6）吸出抗六邻体的抗体，用1mlPBS+1%BSA轻轻洗板三次。

（7）用PBS+1%BSA按1：500稀释HRP标记的大鼠抗小鼠二抗。

（8）每孔加0.5ml大鼠抗小鼠二抗，37℃孵育1h。

（9）将10×DAB底物稀释成1×DAB工作液。

（10）吸出大鼠抗小鼠二抗液体，用1mlPBS+1%BSA轻轻洗板三次。

3.4.4.3显色和定量

（1）吸出最后的PBS+1%BSA洗液，每孔加入500μlDAB工作液，室温孵育10min。

（2）吸出DAB，每孔加入1mlPBS。

（3）利用20×目镜的显微镜数三个视野的棕黑色阳性细胞，计算每孔阳性细胞的平均数。

（4）按下列公式计算每孔细胞感染单位（ifu）/ml：

（被感染细胞数/视野）×（视野数/孔）

|  |
| --- |
| 病毒体积（ml）×稀释度 |

3.4.5 清场

（1） 无菌操作结束后，及时清理洁净区内的物品，用无菌消毒剂擦试工作台面、墙（内）壁，II级生物安全柜风机继续运行20min后关闭风机，填写设备运行记录。

（2） 将废弃的物品送指定地点进行处理。

（3）将废弃的溶液送指定地点进行处理。

（4）未使用完的溶液按要求放入存放地点。

（5）操作间地面用指定的消毒剂消毒处理。

（6）确定实验区内无本次操作遗留的物品、标签、记录等物。

（7）检查实验区内用电设备运行正常、安全。

4 参考文献

4.1《实验室生物安全通用要求》 GB 19489-2008

4.2 《仪器设备标准操作程序》

4.3 《腺病毒实验人员防护要求和标准操作程序》

4.4 《腺病毒实验室清场及污物、废物处理标准操作程序》

4.5 《腺病毒实验室意外事故处理标准操作程序》

### 腺病毒实验后清场及污物、废物处理

### 标准操作程序

**1 目的**

保证从事腺病毒实验活动的实验室，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**

腺病毒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**

从事腺病毒实验的实验人员。

**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。

4.4 高压灭菌器

4.5 紫外灯

4.6 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、运输工具、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ABSL-3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。

5.2.4 CO2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CO2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

### 腺病毒实验人员防护要求和标准操作程序

**1 目的**

腺病毒实验个人有效防护。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**

人员进入腺病毒实验室的个人防护装备的选择、使用和消毒。

**3 职责**

从事腺病毒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》。脱去自己的鞋，穿上鞋套。

5.3.1戴一次性手术帽，要求遮住双耳及头发；

5.3.2从衣柜中取出内层防护服穿上，系紧帽子，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N95口罩，按照操作者鼻部尺寸调整口罩的鼻金属夹，保证做到呼出和吸入气体确实通过口罩过滤。

5.3.4穿一次性防护服和戴第二层一次性乳胶手套。

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 防护服：领口处的帽绳要系紧，不能露出脖子；系上脚腕部绳。

6.5一次性乳胶手套：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，用胶带绑紧。

6.6一次性防护服：一次性防护服是联体服，将拉链拉到底。

6.7口罩：根据鼻部尺寸自行调整生物安全专业防护口罩的鼻金属夹，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。

6.8眼罩：眼罩边缘一定要与脸部贴紧。

**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。进入工作走廊，脱去外层手套及一次性防护服，放到污物桶中。脱去胶鞋、眼罩，再用75%酒精消毒。

7.2脱去口罩、内层手套、内层防护服、帽子，放到污物桶中，将眼罩放入消毒柜内，紫外照射30分钟。

7.3手部用75%酒精喷雾。

**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，去掉胶带，将手套向外卷脱掉，放到污物桶中。

8.2一次性防护服：用75%酒精将全身喷洒一遍，拉开拉锁，从上到下向外翻卷脱下，放到污物桶中。

**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

### 腺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、实验环境在进行腺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**

从事腺病毒生物安全二级实验室意外事故处理。

**3 职责**

从事腺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，直接将垫纸轻轻卷起，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垫纸以外的台面，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，报告安全员，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，并通知生物安全员。

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。报告生物安全员，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

应及时报告生物安全员，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