# 寨卡病毒标准操作程序目录

|  |  |
| --- | --- |
| 编号 | 名称 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-310-01 | 寨卡病毒毒株（样本）接收操作流程 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-310-02 | 寨卡病毒毒株（样本）收集操作程序 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-310-03 | 寨卡病毒毒株（样本）实验室内传递操作程序 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-310-04 | 寨卡病毒毒株的鉴定保存操作程序 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-310-05 | 寨卡病毒毒株培养标准操作程序 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-310-06 | 寨卡病毒毒株（样本）保藏质量控制 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-310-07 | 寨卡病毒实验后清场及污物、废物处理标准操作程序 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-310-08 | 寨卡病毒实验人员防护要求和标准操作程序 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-310-09 | 寨卡病毒实验意外事故处理标准操作程序 |

**寨卡病毒（样本）接收操作流程**

**1 目的**

明确寨卡病毒毒株(样本)接收相关实验技术的操作。

**2 适用范围**

适用于进行寨卡病毒（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**

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**

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 操纵步骤

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《寨卡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 《寨卡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。

**寨卡病毒（样本）收集程序**

**1 目的**

明确寨卡病毒（样本）收集的相关实验技术的操作。

**2 适用范围**

适用于进行寨卡病毒（样本）收集的相关实验人员。

**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**

寨卡病毒培养物应采取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 程序**

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《寨卡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。

**寨卡病毒毒株（样本）实验室间传递操作程序**

**1 目的**

明确寨卡病毒毒株（样品）实验室间传递的相关操作程序。

**2 适用范围**

参与寨卡病毒毒株（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(BSL-2)

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传递窗，再由传递窗拿入实验室；

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，装入内部转运箱，送往其他实验室中，并填写（菌）毒种流向表。

4.4实验结束后按照《寨卡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 《寨卡病毒风险评估和风险控制文件》

5.6 《寨卡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。

**寨卡病毒（样本）的鉴定保存操作程序**

**1 目的**

明确寨卡病毒（样本）的质量控制相关实验技术的操作。

**2 适用范围**

适用于进行寨卡病毒（样本）的质量控制相关的实验人员。

**3 鉴定方法**

3.1病毒抗原检测

3.1.1材料

3.1.1.1标本保存液：即0.5的水解乳蛋白Hank`s液：5g水解乳蛋白溶于1L无Ca2+、Mg2+的Hank`s液中，15磅20min高压灭菌后按2000单位/ml加入青、链霉素，再按2ml/试管的量分装于小试管中，4℃保存。

3.1.1.2 APAAP法诊断试剂盒：购于解放军第二炮兵总医院（93卫药准字{京星}s-02号）。内含病毒的McAb一抗（抗RSV表面蛋白）冻干试剂；GMT二抗（兔抗鼠IgG抗体）冻干试剂；碱性磷酸酶抗碱性磷酸酶抗体（三抗）；底物缓冲液；坚固红；抗黏液剂；封闭液。

3.1.1.3 IFA诊断试剂盒：购于军事医学科学院；流行病学研究所。内含兔抗RSV抗体（一抗）；FITC标记的羊抗鼠IgG；伊文斯兰。

3.1.2 设备

3.1.2.1倒置生物显微镜

3.1.2.2恒温培养箱

3.1.2.3生物安全柜

3.1.2.4水浴箱

3.1.2.5低温离心机

3.1.2.6低温冰箱：-80℃储存毒种，-20℃储存血清

3.1.2.7液氮罐用于储存细胞株

3.1.3 场所

BSL-2实验室，需要在生物安全柜中无菌操作。

3.1.4 操作

3.1.4.1 按照试剂盒说明书操作

3.1.4.2 标本的采集和制备

 病毒感染的细胞被视为感染性材料。在随后的48-96小时期培养间，每24小时在生物安全柜内收取含有寨卡病毒的细胞培养上清，0.45um滤器过滤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。在整个收取分装病毒的过程中，应在样本下垫含有0.5%次氯酸钠纱布，同时准备含有不低于10%次氯酸钠的溶液的废液缸和抽滤瓶作为废弃感染材料及溶液的消毒剂。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。

3.5 病毒RT-PCR检测

3.5.1 材料

3.5.1.1提取的病毒RNA

3.5.1.2 10mM双脱氧核苷酸三磷酸（dNTP）混合物

3.5.1.3 超纯水

3.5.1.4 AMV逆转录酶（25单位/µl，LifeSciences，Inc，Cat#ARB-45）

3.5.1.5 RNA酶抑制剂（40单位/µl）

3.5.1.6 Taq DNA多聚酶（5单位/µl，PromegaCat#M1901）

3.5.1.7 25mM MgCl2

3.5.1.8加样器、试管等

3.5.2 设备

3.5.2.1微型离心机

3.5.2.2旋转混合器

3.5.2.3PCR扩增仪冰箱

3.5.3 场所

核酸提取应在BSL-2实验室。PCR可在综合实验室操作。

3.5.4 操作

3.5.4.1实验准备

(1) 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。

(2) 确认实验区已消毒后，登记，进入实验区。

3.5.4.2操作步骤

(1) 逆转录合成cDNA链

(2) 所有需要试剂均放冰上。

(3) 标一支0.5ml离心管放RNA。

(4) 阴性对照管用水代替RNA。

(5) 实验管加入4µlRNA，对照管加入4µl水，然后各加入0.5µl引物“Uni-12”。

(6) 置72℃4min。此时按以下比例制备所需的混合液：
·1.5µl H2O
·2.0µl逆转录缓冲液
·0.5µl10mMdNTP混合物
·0.5µlRNA酶抑制剂（RNasin）

·1.0µl逆转录酶，混之

(7) 每管加入5.5µl上述配好的混合液。

(8) 将RNA，引物和混合液相混（此时总容量应为10ul），置42℃孵育1h。

(9) 置94℃5min来停止RT（逆转录）反应。

3.5.5 PCR扩增

3.5.5.1每个PCR反应只需1.5µl合成的cDNA，把它加入到48.5µl反应混合液中。PCR反应混合液配制（每对引物均有空白对照）：引物系列：

F: 5´-CCA CGC ACT GAT AAC AT-3´，R：5´-TAG CAA GGC CTC T-3´

·5µl PCR Buffer
·38.65µl H20
·1µl 10mM dNTP混合物
·3µl 25mM MgCl2
·0.25µl TAQDNA多聚酶
·0.3µl正向引物（1μg/μl）
·0.3µl反向引物（1μg/μl）

4.2.2.2简短离心，使之相混。

4.2.2.3把管放PCR仪上进行扩增。

94℃3min

94℃30s（解链）

40℃30s（退火）

72℃1min（延长）
从第二步（94℃1min）开始循环30周期
 72℃7min
 4℃保存，待用。

3.5.5.2琼脂糖凝胶电泳检查PCR产物。

**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 《寨卡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。

### 寨卡病毒（样本）培养标准操作程序

**1 目的**

明确寨卡病毒（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用寨卡病毒（样本）培养的相关实验人员。

**3 试剂和材料**

3.1 材料

3.1.1 标本

寨卡病毒毒株(SZ01)

3.1.2 试剂

DMEM High-Glucose培养基

胎牛血清（FBS）

青链霉素

非必需氨基酸

HEPES

胰酶溶液

Trizol试剂

4%多聚甲醛

次氯酸钠等消毒剂

3.1.3 细胞

 Vero细胞系

3.2 仪器与耗材

3.2.1仪器

3.2.1.1 二级生物安全柜

3.2.1.2 高速离心机

3.2.1.3 CO2培养箱

3.2.1.4 倒置生物显微镜

3.2.2耗材

3.2.2.1一次性平皿

3.2.2.2一次性塑料螺口细胞培养瓶

3.2.2.3塑料移液管、移液器

3.2.2.4带滤芯Tip头

3.2.2.5一次性塑料螺口1.5ml离心管

3.3实验前准备

3.3.1在体外培养寨卡病毒主要用到的细胞系为Vero，来源于非洲绿猴肾细胞。常用的细胞培养基为DMEM高糖培养基，其中添加青链霉素、非必需氨基酸和HEPES。细胞培养于带滤芯通气盖的T25或T75细胞培养瓶中，放入生物安全柜之前和拿出生物安全柜之后，细胞培养瓶盖必须保持密闭。根据实际情况，每一到两天更换液一次培养基，每2-3天传代一次，传代比例为1：3-5。

3.3.2 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。

3.3.3 检查前一位实验者是否已经清场，是否有记录。

3.3.4 确认实验区已消毒后，带入试验物品，登记，进入实验区。

3.3.5 检查生物安全柜压力是否正常，准备废弃物容器及消毒液；将浸有75%酒精的纱布铺在生物安全柜的台面上。

3.3.6将在生物安全柜内使用的试验材料和试验标本外表经75％酒精消毒后放入安全柜内。

3.4 操作步骤

3.4.1 感染前一天接种细胞于带滤芯通气盖的T25细胞培养瓶中，接种密度以第二天达到50%为衡量标准。

3.4.2 从上双锁的-80度冰箱病毒库中取TCID50为106/mL的病毒储备液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枪头将融化后的病毒储备液转移至含Vero细胞的T25培养瓶中，拧紧盖子，将细胞置于37℃二氧化碳培养箱内培养。

3.4.3 实验过程中用到的病毒冻存管、Tip头、移液管等全部浸泡于含有不低于1%次氯酸钠溶液的废液缸中过夜。在病毒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。

3.4.4在随后的48-96小时期培养间，每24小时在生物安全柜内收取含有寨卡病毒的细胞培养上清，0.45um滤器过滤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。在整个收取分装病毒的过程中，应在样本下垫含有0.5%次氯酸钠纱布，同时准备含有不低于10%次氯酸钠的溶液的废液缸和抽滤瓶作为废弃感染材料及溶液的消毒剂。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。

3.4.5收取的含有寨卡病毒的细胞培养上清经过滤分装后，必须装入贴有明显生物危险标志的冻存盒内，将此冻存盒再装入贴有明显生物危险标志的专用样品运输袋或运输箱内进行运输。如果运输距离较远，耗时较长，需要使用低温冰袋。通常应该在-80℃低温冰箱内开辟出一层的空间对寨卡病毒进行保存，并在显著位置设置警示标志和文字提示。装有病毒的冰箱应该加锁并由专门的生物安全员负责管理与维护。

3.4.6含有寨卡病毒的Vero细胞结束实验后，应加入10-20mL的含1%次氯酸钠的消毒液，盖紧盖子后在生物安全柜内消毒过夜，第二天吸弃消毒液后，可取出生物安全柜，经高压灭菌后即可采取常规方式处理。在需要提取RNA时，可按照Trizol试剂说明书，向培养上清或细胞中加入相应体积的Trizol裂解10-30分钟，裂解产物可视为灭活样品进行后续操作。寨卡病毒感染的细胞需要进行免疫荧光操作时，在生物安全柜内以PBS洗涤细胞3次，然后用足够体积的4%多聚甲醛覆盖细胞固定30分钟，固定后的细胞可视为灭活样品进行后续操作。

3.4.7实验后操作：

实验结束后按照《寨卡病毒实验后清场及污物、废物处理标准操作程序》进行清场。

**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 《寨卡病毒实验人员防护要求和标准操作程序》

4.4 《寨卡病毒实验室清场及污物、废物处理标准操作程序》

4.5 《寨卡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》

**寨卡病毒毒株（样本）保藏质量控制操作程序**

**1 目的**

明确寨卡病毒（样本）的质量控制相关实验技术的操作。

**2 适用范围**

适用于进行寨卡病毒（样本）的质量控制相关的实验人员。

**3 方法**

3.1 病毒TCID50测定（组织半数感染量）

3.1.1材料

待测病毒液

培养病毒的细胞

液体

维持液：基础培养基中含2%血清，1% NaHCO3（0.75％），1%谷氨酰胺，1% PBS

无菌组织培养板或细胞瓶及移液器、tip头、EP管等

3.1.2设备

倒置生物显微镜

恒温培养箱

生物安全柜

3.1.3场所

 BSL-2实验室，需要在生物安全柜中无菌操作。

3.1.4 操作

3.1.4.1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。

3.1.4.2确认实验区已消毒后，消毒所带入物品，登记，进入实验区。

3.1.4.3操作步骤

(1) 准备细胞

取出一块细胞培养板，每个孔大约传8000～10000个细胞（一个T25瓶的细胞消化后加10ml培养液正好传一块96孔板，要传匀）。每个孔的细胞铺成单层大约60％丰度即可接种病毒（下午传好板第二天早上就能用）。

细胞对照选取16个孔即可。滴定与对照可以在一块培养板上进行，也可以分别在不同的细胞培养板上进行，但要保证实验条件一致。

(2) 稀释待测病毒液。

**A**法为参考书上标准的操作方法

**B**法参照书将液体量减少后的结果

病毒稀释液根据是否需要胰酶来选择适合的液体，无论哪种都无血清。

**A**向每支试管中加入1.8ml病毒稀释液。向1号试管中加入0.2ml病毒，依次10倍系列稀释至适宜浓度，最后一支试管。

**B**在EP管中用无血清的孵育液10倍倍比稀释病毒原液(10-1，10-2…10-10等)，根据病毒大致的滴度确定稀释的倍数。首次滴定可以多稀释几个滴度。

根据接种的孔数稀释病毒，常规每个稀释度接种4孔，则每个稀释度配500µl，即10-1为50µl加入450µl的孵育液中；如每个稀释度接种8个孔，则各配制1ml，即10-1为100µl加入900µl孵育液中。若接种8个孔，则相应增加液体量。上述的配液并不是固定不变的，可以根据接种的量自行调整。

**此步操作注意事项：**

1）建议每个稀释度接种8个孔，若要统计分析则还要增加至16个孔。

2）病毒稀释过程中一定将病毒液与孵育液充分混匀。

3）此过程中需要使用加样器和tip头。使用前用75%乙醇擦拭加样器，并用紫外线照射20min，确保无菌。使用新高压的tip头，外包装一定在超净台（或安全柜中打开）。

(3) 接种

取细胞培养板，用多道加样器（又称排枪）吸去96孔板中的培养液，吸取孵育液加在每孔中再轻轻吹打一次，然后吸出孵育液（此步目的是去除血清，因为血清能干扰病毒的吸附）。将稀释好的病毒液加到96孔板上，每孔100µl，根据观察的习惯，一般从右到左，从上到下，从高稀释度到低稀释度加样。

【**切记：**设置正常的细胞对照。每次实验要重复4次，计算标准差。】

37℃CO2培养箱中孵育1h，取出培养板吸去病毒液（从低浓度向高浓度吸取可避免窜孔），加入维持液200µl继续在37℃ CO2培养箱中培养。

(4) 将培养板放置于37℃CO2培养箱进行培养。

(5) 测定结果

取出培养板，显微镜下观察细胞病变。

计算方法

 1) Spearman-Karber法

 LgTCID50 /0.2ml= - （X0 - d/2 + d×∑R1/N1）

 X0 = 全部病变最低稀释度对数

 d = 稀释因数对数

 N1 = 每个稀释度所种的孔数

 R1 = 病变孔数

 ∑ = 积和

LgTCID50 /ml = LgCCID50 /0.2ml +0.7

2) Reed-Muench法

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

由表看出，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100 TCID50/0.1ml。

3) 判定标准

细胞对照无病变，在无标准品时，应增加实验次数以减少误差。

3.2病毒的定量滴定(空斑形成试验)

3.2.1材料

3.2.1.1待测病毒液

3.2.1.2培养病毒的细胞

3.2.1.3维持液

3.2.1.4组织培养板或细胞培养瓶及移液器、吸管、试管、EP管等

3.2.1.5 DMEM High-Glucose培养基

3.2.1.6 1胎牛血清

3.2.1.7 青链霉素

3.2.1.8 非必需氨基酸 HEPES

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生物安全柜

3.2.3 场所

 BSL-2实验室，需要在生物安全柜中无菌操作。

3.2.4 操作

3.2.4.1实验准备

3.2.4.1.1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。

3.2.4.1.2确认实验区已消毒后，消毒所带入物品，登记，进入实验区。

3.2.4.2操作步骤

根据郭元吉等方法改良。

(1) 将收获的病毒上清用DMEM作10倍递次稀释至10-1；

(2) 取10-4-10-8稀释度，每个稀释度接种3孔已长成单层的Vero细胞(6孔板)，

接利，量为0.25ml/孔，37℃，5% CO2吸附2 小时，每30分钟轻轻晃动培养板一次以使吸附均匀：同时设阴性对照；

(3) 配制营养琼脂覆盖层:病毒维持液50ml， 1%琼脂糖(融化后恒温于56℃ )， 0.25%胰蛋白酶5µl，混合后置45℃水浴中待用；

(4) 吸附结束后，吸弃病毒液，PBS洗2次，营养琼脂覆盖层3ml/孔， 37℃，

5%CO2培养5天；

(5) 10%甲醛固定细胞2小时；

(6) 小心移弃营养琼脂覆盖层，1%结晶紫染色5分钟，洗去多余染料，计数空斑，以空斑形成单位(Plaque forming unit， PFU) 表示病毒的感染滴度。求最高稀释度之平均空斑数，再换算成每毫升之空斑数，即为PFU/ml。病毒滴度计算公式

**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 《寨卡病毒实验人员防护要求和标准操作程序》

4.4 《寨卡病毒实验室清场及污物、废物处理标准操作程序》

4.5 《寨卡病毒实验室意外事故处理标准操作程序》

### 寨卡病毒实验后清场及污物、废物处理

### 标准操作程序

**1 目的**

保证从事寨卡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**

寨卡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**

从事寨卡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℃冰箱和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

### 寨卡病毒实验人员防护要求和标准操作程序

**1 目的**

寨卡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**

人员进入寨卡病毒实验室的个人防护装备的选择、使用和消毒。

**3 职责**

从事寨卡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 生物安全二级实验室（BSL-2）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。

5.4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。

**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

### 寨卡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、实验环境在进行寨卡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**

从事寨卡病毒生物安全二级实验室意外事故处理。

**3 职责**

从事寨卡病毒实验室技术人员、后勤服务人员。

**4 材料**

4.1 75%酒精

4.2有效氯含量为0.5%的次氯酸钠消毒液

4.3 3%过氧化氢

4.4急救箱

4.5纸巾

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，报告生物安全员，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ABSL-3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

实验前生物安全柜或负压解剖台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