# 人乳头瘤病毒标准操作程序目录

|  |  |
| --- | --- |
| 编号 | 名称 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-306-01 | 人乳头瘤病毒毒株（样本）接收操作流程 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-306-02 | 人乳头瘤病毒毒株（样本）实验室内传递操作程序 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-306-03 | 人乳头瘤病毒毒株的鉴定保存操作程序 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-306-04 | 人乳头瘤病毒实验人员防护要求和标准操作程序 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-306-05 | 人乳头瘤病毒实验后清场及污物、废物处理标准操作程序 |
| CAMS-CCPM-C-Ⅲ-306-06 | 人乳头瘤病毒实验意外事故处理标准操作程序 |
|  |  |
|  |  |

**人乳头瘤病毒毒株（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**

适用于进行人乳头瘤病毒毒株（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、一次性手套、防护服、鞋套。

**4 包装要求**

人乳头瘤病毒培养物应采取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 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。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《人乳头瘤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 《人乳头瘤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。

**人乳头瘤病毒毒株（样本）实验室间传递操作程序**

**1 目的**

明确人乳头瘤病毒毒株（样本）实验室间传递的相关操作程序。

**2 适用范围**

参与人乳头瘤病毒毒株（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

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，装入内转运箱，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《人乳头瘤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 《人乳头瘤病毒风险评估和风险控制文件》

5.6 《人乳头瘤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。

**人乳头瘤病毒毒株（样本）的鉴定保存操作程序**

**1 目的**

明确人乳头瘤病毒(HPV)毒株（样本）的基因型鉴定过程，能正确有效的鉴定HPV基鉴定保存相关实验技术的操作。

**2 适用范围**

适用于进行人乳头瘤病毒毒株（样本）的鉴定保存相关的实验人员。

1. **鉴定方法**

**3.1样本抽提：**

3.1.1 打开金属浴预热，温度设置为100℃

3.1.2 轻微振荡悬浮起保存液中的脱落细胞

3.1.3 取1ml样品于1.5 ml 离心管中，阳性对照样本量为50μl

3.1.4 13000rpm离心10分钟，小心吸弃上清

3.1.5 加入200μl核酸提取缓冲液，不断混匀缓冲液保证树脂均匀悬浮

3.1.6 加入核酸提取液的样本管，振匀之后置入金属浴衡温100℃，15分钟

3.1.7 13000rpm离心5分钟，移取上清至一新的离心管内，保存备用

**3.2 PCR扩增**

按下表分别加入PCR试剂和样品：

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 试 剂 | 用 量 | 备 注 |
| 引物混合液 | 5µl |  |
| PCR预混液 | 10µl |  |
| Taq酶 | 0.8µl |  |
| 模板DNA | 5µl | 50-100ng |
| 总 共 | 20 µl |  |

PCR仪器设置如下：

PCR反应程序

95℃ 3min

 95℃ 30s

 58℃ 30s 5 cycles

 72℃ 30s

 95℃ 30s

 55℃ 30s 30 cycles

72℃ 30s

72℃ 5min

**注意事项：**

3.2.1所有试剂必须完全融解后才能使用。

3.2.2 每次配制需要多配制1-3份以抵消移液器的误差及移液损耗。

3.2.3 加样时要严格操作避免污染。

3.2.4加样完成后10000转离心3秒，以使管壁上的液体聚集到管底并彻底赶走反应体系内的气泡。

**3.3 杂交检测**

3.3.1根据需要反应的数量裁剪反应板, 在每孔中加入微球杂交液22µl

3.3.2在每孔中加入PCR产物3μl

3.3.3剪下合适的封口膜，封住反应板，放入PCR仪中，运行杂交程序：先95℃变性5分钟，然后48℃杂交30分钟。

3.3.4在PCR仪上撕去封口膜，每孔加入75μl SA-PE，重新用封口膜封住反应板，轻微振荡混匀后48℃孵育15分钟，上机检测

**注意事项：**

(1)微球杂交液使用前一定要振荡混合均匀

(2)加SA-PE过程在不要将反应板从PCR仪上拿下来，同时在加完后注意振荡混匀

(3)提前打开Luminex仪器的预热功能

**3.4 检测**

3.4.1 打开Luminex主机、XY平台、SD以及电脑电源。

3.4.2开机预热30分钟，进入系统后自动运行

3.4.3 观察显示主机温度，超过±3℃需要进行校正

3.4.4 开机清洗：于96孔微孔板A1、B1处加大约5-10滴去离子水，右侧小方框Reservior内加75%乙醇至2/3处。点击retract将微孔板送入检测仓，点击RUN

3.4.5 启动清洗步骤(大约15分钟结束)

3.4.6 调整样品针高度：

* 移去样品针外面有机玻璃外罩
* 96孔微孔板高度不能超过19mm，将一个调整圆球放入到A1的微孔
* 选择**Maintenance**页面，点击**Eject/Retract**将托盘移出，将96孔微孔板放在托盘上，确认A1在左上角，点击**Eject/Retract**将托盘移入，确认使用了正确的调准圆片并在软件中选择了正确的孔。
* 将样品针固定螺丝拧松约1/3圈。
* 点击Sample Probe Down 将样品针降下。
* 将样品针固定螺丝拧紧，确保样品针已经降到了最下面。
* 点击Sample Probe Up 升起样品针。
* 将有机玻璃外罩复位。

3.4.7加热底板：将铜制96孔微孔板托板放入XY平台，点击Maintenance ，点击Probe Heater 设定为48度，大约需要10分钟

3.4.8 设定程序：点击batches，点击new batches，重新命名后，在Protocol处选择HPV-Tellgen 2.0，点击next，按照检测样本数完成设置

3.4.9 检测开始：把样品96孔微孔板放到铜制96孔微孔板上，点击Run，即开始检测，注意观察状态栏

3.4.10 保存：点击save batches

3.4.11清洗：取出检测样本和金属板，放入清洗和校正用96孔微孔板，点击Maintenance，选择关机清洗程序，与A1，A2处添加5-10滴去离子水，右侧小方框Reservior内加75%乙醇至2/3处，点击Run，大约10分钟后结束

3.4.12取出96孔微孔板，将右侧小方框Reservior内剩余乙醇吸除干净，同时清理废液桶

3.4.13依次关闭电脑和Luminex仪器:运行：双击桌面上的（透景科技）运行程序。

3.4.14模版添加：点击主页面左上角的（分析模版导入），在弹出的对

话框内选择对应的试剂种类，点击“添加”按钮，选择需要的模版双击添加。（注：一个模版只需要添加一次）



3.4.15计算：在主页面左上侧（试剂盒信息）列表框选择所用试剂盒的种类和对应试剂盒所对应的软件识别码。点击主页面（原始数据导入）选择需要计算的原始数据文件(默认在c盘My batch-Output文件夹下)。点击主页面（结果计算），自动完成计算，点击主页面（Excel结果输出）生成Excel结果文件供打印及存档。点击（自定义格式输出）生成Txt文件供Lis系统连接使用。

3.4.16常见问题

核酸提取、PCR及杂交过程中常见问题

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 常见问题 | 可能原因 | 解决方法 |
| 一批里面有大量样品显示相同亚型阳性或者阴性对照显示阳性 | PCR污染 | 查找污染源，并作彻底的清洁处理（请参照PCR污染防治手册），严格规范操作，务必防止污染再次发生。 |
| 一批里面所有样品结果显示实验失败 | Taq酶失效 | 更换新的酶重新实验 |
| SA-PE失效 | 更换新的SA-PE重新实验 |
| PCR仪故障 | 联系仪器销售商进行维修 |
| PCR预混液失效 | 更换新的预混液重新实验 |
| PCR引物失效 | 更换新的引物重新实验 |
| 一批里面大量样品结果显示实验失败 | Taq酶变质 | 更换新的酶重新实验 |

读取数据中常见问题

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 常见问题 | 可能原因 | 解决方法 |
| 微球数不够 | 进样针堵塞 | 取下进样针，超声清洗直至通畅。可以用洗瓶对着进样针的一端注水检查进样针是否通畅。 |
| 管道不通 | Reservion内加入开机洗涤液点击Santize洗涤多次 |
| B液使用前没有振荡均匀 | 重新实验，B液使用前务必振荡均匀 |
| 微球编号选择错误 | 重新选择微球编号后读数，读过的孔不允许再次读数 |
| 鞘流液选择错误 | 1. 请使用试剂盒认可的鞘流液重新实验
 |
| 读数的时候对应的孔显示红叉 | 微球数不够 | 请参考常见问题”微球数不够” |
| 校正没通过 | 重新校正通过后读数 |
| 仪器校正温度和仪器温度相差超过3度 | 重新校正机器或者等仪器温度进入正常温差范围后再读数 |
| 结果正常，但读数较往常慢很多 | 微球杂交液(HPV)或者C液（肿瘤标志物）使用前没有振荡均匀 | 重新实验，使用前务必振荡均匀 |
| 管道不通畅 | 用洗涤液洗涤管道，或者用1N NaOH清洗管道 |
| 样品杂质比较多 | 血清样品使用需要离心后取上清 |
| 仪器校正失败 | 校正微球使用前没有振荡混匀 | 振荡混匀校正微球，重新进行校正 |
| 进样针堵塞 | 取下进样针，超声清洗直至通畅。可以对着进样针孔的一端注水检查进样针是否通畅。 |
| 管道不通 | Reservior内加入开机洗涤液点击Santize洗涤多次 |

**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 《人乳头瘤病毒风险评估文件》

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。

**人乳头瘤病毒实验人员防护要求和标准操作程序**

**1 目的**

人乳头瘤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**

人员进入人乳头瘤病毒实验室的个人防护装备的选择、使用和消毒。

**3 职责**

从事人乳头瘤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，带上乳胶手套，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。

5.3.4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 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

**人乳头瘤病毒实验后清场及污物、废物处理**

**标准操作程序**

**1 目的**

保证从事人乳头瘤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**

人乳头瘤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**

从事人乳头瘤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。

4.3 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、负压实验台、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

**人乳头瘤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、实验环境在进行人乳头瘤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**

从事人乳头瘤病毒生物安全二级实验室意外事故处理。

**3 职责**

从事人乳头瘤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尿不湿以外的台面，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，报告生物安全员，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