

國立嘉義大學 BSL-2 實驗室生物安全管理手冊

生物安全會 104 年 12 月 22 日製

104 年 12 月 22 日

目 錄

1.前言	3
2.生物安全的原則 (Principles of Bio-safety Level)	4
3.生物安全等級 2 (Bio-safety Level 2)	4
4.人員進出管制	5
5.實驗室操作規範及技巧(Laboratory Practices and Techniques)	5
6.安全設備；初級防護設備 (Safety Equipment; Primary Barriers).....	7
7.實驗室設施；二級防護設備 (Laboratory Facilities; Secondary Barriers)	8
8.生物性與一般廢棄物之處理.....	9
9.實驗室之清潔與管理	11
10.緊急應變處理.....	11
附錄	
附錄一、生物安全操作台及細菌操作注意事項及應變處理方式	15
附錄二、每日實驗室例行檢查表	16

1. 前言

世界衛生組織（WHO）以感染性微生物之相對危害程度，將生物危害微生物類（含病毒、細菌等）分為第一級（BSL-1）、第二級（BSL-2）、第三級（BSL-3）及第四級（BSL-4）危險群。第一級危險群為極少對人類或動物引發疾病之微生物。第二級危險群對個人產生中度危險性，引發社區感染性低，病原體能夠對人類或動物致病，但不致嚴重危害，且可利用有效之治療及預防方法，限制疾病傳播之危險性。第三級危險群對個人產生高度危險性，引發社區感染性低，病原體通常能引起人類或動物之嚴重疾病，但通常不會由感染個人傳染給其他個人，可利用有效之治療及預防方法。第四級危險群對個人及社區造成高度危險性。病原體通常能引起人類或動物之嚴重疾病，並易於發生個人之間直接或間接傳染，通常無有效之治療及預防方法。

目前本校擁有四間 BSL-2 級微生物實驗室，故僅容許第二級以下生物危險群之相關計畫的研究，此管理手冊乃對 BSL-2 實驗室的使用與管理加以規範。

本管理操作手冊主要目的為使工作人員熟悉操作與其他相關第二級生物危害微生物類（含病毒、細菌等）的潛在危險性，並且能夠在安全保證的環境下進行技術研發的工作。因此每位進入本實驗室的工作人員必須熟讀此操作手冊並符合進入本實驗室之條件。本手冊包含第二級危害實驗室的簡介，安全操作規定，生物實驗室的分類及附件，附件包含實驗室內進行微生物操作、培養，培養箱及生物安全操作台的使用規則，廢棄物處理等，工作人員請確實遵守相關安全規定，以確保工作安全。

2. 生物安全的原則 (Principles of Bio-safety Level)

生物安全乃是在處理及保存傳染性病原之實驗環境中，所採行的“防護措施”，目的是在降低或避免實驗工作人員及其他人員和外部環境暴露於潛在性之危險。

防護三要素

- 實驗操作程序及技術 (Practice And Technique)
- 安全設備 (或稱第一級防護 Primary Barriers)
- 實驗室設計/硬體設施 Facility Design (或稱第二級防護 Secondary Barriers)

生物安全等級 1 至 4 的微生物對人的致病性是由最低到最嚴重；所以其防護也是從等級 1 為基礎，再往上逐漸加強，即是說：等級 1 之防護再加強成為等級 2 之防護，等級 2 之防護再加強成為等級 3 之防護，等級 3 之防護再加強成為等級 4 之防護。

3. 生物安全等級 2 (Bio-safety Level 2)

“生物安全等級 2”適用於對實驗室工作人員及環境具中度的潛在性危險的特定物質時。需特別注意的有：

- 實驗室工作人員受過使用致病物質的特殊訓練，並由適任的生物安全管理人員指導。
- 特別小心受污染的尖銳物品。
- 操作步驟可能產生氣霧或濺灑者，需使用 I 級或 II 級生物安全操作櫃或物理性防護設備，例如：安全的離心裝置、面罩、臉部保護等。

進入生物安全等級 2 實驗室工作人員須具有下列條件：

- a. 詳閱本手冊內容並接受校方舉辦的“生物安全講習”至少 4 小時
- b. 初次進入本實驗室工作，需由具有經且熟悉本實驗室之工作人員陪同示範一次以上。

4. 人員進出管制

- a. 被允許之工作人員，刷卡進入 BSL-2 實驗區，先更換 BSL-2 細菌實驗室專用鞋與實驗衣後，戴上口罩，在進入 BSL-2 實驗室操作區。進入實驗室後戴上合適之乳膠手套，依 BSL-2 實驗室之規定進行實驗操作。在工作完成後，將手套、口罩脫下置於感染性垃圾桶，才離開 BSL-2 實驗。在準備室以清潔劑清洗雙手才算完成，更換實驗衣與鞋子後，離開實驗室。
- b. 為維持所有實驗區、準備室壓力之正常，以維持工作環境之安全性，請進出時隨手將門關緊，不同區域之門不可同時開啟以避免發生污染。
- c. 進入本區工作之人員，更換實驗區拖鞋時，均須穿上個人之襪子，以為維持公共衛生。
- d. 乳膠手套使用範圍僅在實驗室內，若發現有破損請立即更換，切記不得戴上手套碰觸門把與電話。
- e. 實驗結束且完成整理清潔後，才可脫手套出 BSL-2 實驗區。

5. 實驗室操作規範及技巧 (Laboratory Practices and Techniques)

本實驗室設有以下規範，所有人員必須清楚了解本操作規範及技巧，熟知本實驗室之潛在危險外，對實驗操作技巧也必須相當熟練。

- a. 實驗室入口張貼「生物性危害」標示。
- b. 實驗進行時，關閉實驗室門。只有被核准之人員方可進入實驗。
- c. 實驗進行中，要在實驗室之入口，標示「BSL-2 級實驗室」，並掛上「BSL-2 級實驗進行中」的標示。而且保存重組體之冰箱及冷凍庫也要做同樣的標示。
- d. 實驗室管理人有責任且具職權管制進出人員，必須建立進入實驗室政策或程序中。例如：只有熟知潛在危害方可進入實驗室。先天免疫缺乏者、高危險性後天感染者，或感染後病症特殊者，禁止進入實驗室。
- e. 實驗完成後必須洗手。
- f. 實驗室禁止：吃、喝、吸煙、儲存食物、施用化妝品等。
- g. 禁止以口接觸任何與實驗相關物品。
- h. 任何物質禁止放入口中，標籤禁止以舌舔。
- i. 工作時需穿著實驗衣，且此實驗衣不可於非 BSL-2 工作區域穿著。受污染之實驗衣以高壓滅菌法進行消毒。

- j. 實驗室禁止穿涼拖鞋。
- k. 實驗衣與自己的衣服必須分開放置。
- l. 戴安全眼鏡或面罩。
- m. 操作感染性物質必須配戴隔離手套，尤其手上皮膚有受傷時。
- n. 小心操作以減少感染物的濺溢或氣霧之產生。
- o. 工作桌於每次實驗完成後與一日工作結束後以 70%酒精擦拭消毒。操作中有人接觸或生物危害性物質濺溢時須立即消毒。
- p. 實驗室應該保持整潔，實驗不必用到的物品不應該出現。
- q. 實驗室內特別要求安全操作尖銳品，盡可能使用塑膠器材。
- r. 不可徒手處理破碎玻璃器皿，而須使用機械式器具，如：掃帚與畚斗、鉗子、鑷子等。裝有感染性針頭、尖銳物品、及破碎玻璃的容器須先經消毒，在依據適當的法令規定處置。
- s. 以防漏容器收集、處理、貯存、傳遞、運送培養物、組織或組織液樣本。
- t. 所有培養物、貯存物、及其他管制廢棄物，在丟棄前需依認可之方法消毒，例如：高溫高壓滅菌法處理。若消毒須於臨近實驗室處進行時，所有物品需置於耐用、防漏密閉的容器中，以利安全運送。
- u. 除定期消毒外，若發生有感染性物質潑灑或其他污染情形發生時，實驗室內儀器及工作檯面須以適當的殺菌劑消毒，受污染的儀器依照政府相關單位的規定消毒及包裝後，才得移出維護修理。
- v. 操作細菌、病毒或是感染性物質相關實驗時，若需使用微量吸取器進行操作微量液體之吸取，需使用含過濾頭之 tip 以避免發生污染，當使用完後 tip 需置於含 10% 漂白水消毒殺菌水溶液的瓶內浸泡，待瓶內空間飽和時將漂白水移除後再置於廢棄桶以進行消毒，此處理步驟由操作病毒人員視情況自行處理廢棄物。
- w. 實驗室管理人須建立本操作手冊，實驗室人員必須熟讀且遵守。
- x. 實驗室人員必須接受感染性病原的使用防護措施之訓練。此外，若有修訂任何程序步驟須再接受額外的訓練。
- y. 實驗室有任何意外必須立即向實驗室管理人報告。任何藥物評估、監測及處理須紀錄及保存。

6. 安全設備；初級防護設備 (Safety Equipment; Primary Barriers)

實驗室管理主管或指導教授必須確認提供適當的設備，且它們被正確使用。通常這些設備符合共同之原則：

- a. 避免或降低人員和感染性物質接觸。
- b. 材質必須不滲透、抗腐蝕、並符合結構需求。
- c. 組合上不要有粗糙的或鋸齒狀的邊。
- d. 設計上要易於操作、維護、清潔及去除污染。
- e. 一般常用之安全設備有：移液管及移液輔助裝置 (pipetting aids)、有栓蓋的試管或瓶子 (screw-capped tubes and bottles)、符合 BSL-2 規範之生物安全操作櫃 (biological safety cabinets)、滅菌鍋 (autoclaves)，個人防護裝置如安全眼鏡、隔離口罩、手套的使用、穿著實驗衣等。其他依實驗性質不同所使用之特殊設備。
- f. 處理生物安全等級 2 所屬的物質，必須在 I 級或 II 級生物安全操作櫃中操作。
- g. 工作時穿著實驗衣，以免污染外出服。並且不可將這些衣物穿離或帶離實驗室。
- h. 戴隔離手套尤其當手上皮膚有破皮或出疹情形時。必要時甚至可以戴兩層手套。
- i. 如果預期有微生物或其他危險物質濺灑臉部，則須配戴眼部保護裝置。
- j. 其他設備：如移液管及移液輔助裝置 (pipetting aids)、有栓蓋的試管或瓶子 (screw-capped tubes and bottles)、有蓋之離心管、其他依實驗性質不同所使用之特殊裝備。

7. 實驗室設施；二級防護設備 (Laboratory Facilities; Secondary Barriers)

實驗室設施主要為保護實驗室人員，免於受到感染性物質之污染。設計上的主要考量為：

- a. 避免或降低人員和感染性物質接觸。
- b. 材質必須不滲透、抗腐蝕、並符合結構需求。
- c. 組合上不要有粗糙的或鋸齒狀的邊。
- d. 設計上要易於操作、維護、清潔及去除污染。
- e. 一般常用之安全設備有：
 - 移液管及移液輔助裝置(pipetting aids)。
 - 有栓蓋的試管或瓶子(screw-capped tubes and bottles)。
 - 符合 BSL-2 規範之生物安全操作櫃 (biological safety cabinets)。
 - 滅菌鍋 (autoclaves)。
 - 個人防護裝置如(1)安全眼鏡(2)隔離口罩(3)手套(4)穿著實驗衣等。
 - 其他特殊設備
- f. 本實驗室實驗進行皆於 2 級生物安全操作櫃中操作。
- g. 實驗進行時穿著實驗衣，以免污染外出服。並且不可將這些衣物穿離或帶離實驗室。
- h. 戴隔離手套尤其當手上皮膚有破皮或出疹情形時。必要時甚至可以戴兩層手套。
- i. 如預期有微生物或其他危險物質濺灑臉部，則須配戴眼部保護裝置。
- j. 實驗室位置實驗區與準備區分開，被允許之工作人員進入 BSL-2 實驗室準備區後將一般實驗衣掛置於右面牆壁，鞋子置於準備區，更換 BSL-2 實驗區專用鞋與實驗衣後，於準備區戴上口罩、乳膠手套始能進入實驗區。依 BSL-2 實驗室之規定進行實驗操作，在工作完成後，將手套、口罩脫下置於感染性垃圾桶，才離開 BSL-2 實驗區。
- k. 本實驗室以高溫高壓滅菌鍋處理廢棄物以去除污染。
- l. 本實驗室之生物安全操作櫃符合 BSL-2 規範。
- m. 本實驗室設門禁管制，並有進出人員登記。
- n. 本實驗室位於本校_____大樓_____位置遠離公共區域。
- o. 本實驗室地板為_____易於清潔。
- p. 本實驗設備材質均耐熱耐酸耐鹼耐有機溶劑耐化學品不透水。
- q. 本實驗室空間利清掃，椅子櫥櫃表面易於去除污染。
- r. 本實驗室生物安全操作櫃位置遠離門遠離窗戶遠離人員走動頻繁之區

- 域。
- s. 本實驗室之實驗區照明適當，無反射、強光、鏡面等妨礙視覺之物品。
 - t. 本實驗室之實驗區設獨立室空調門板下方加裝門底封條，使排氣不再循環至建築之任一處。
 - u. 本實驗之實驗區無對外窗有對外窗設有紗門以防蚊蟲飛入有對外窗但設有門禁不得開啟。
 - v. 本實驗所使用之高溫高壓滅菌鍋在一個區域內同一層樓同一棟建築。

8. 生物性與一般廢棄物之處理

本實驗室所產生之廢棄物分為生物性廢棄物與一般廢棄物兩類，本實驗室生物性廢棄物指的是實驗室所產生之細菌、細菌培養液、等生物性物質或曾與上述物質接觸後所產生之廢棄物，如使用過後之培養瓶、培養皿、玻璃或塑膠吸管、離心管等均屬之。

a. 固態生物性廢棄物:

甲、 手套、口罩和固體廢棄物皆須置於2層大型滅菌袋內(有紅色生物性為害標示圖案)，需加以密閉以避免污染，利用高壓滅菌鍋(在滅菌袋外貼上滅菌標示膠帶)以高溫高壓滅菌釜於121°C，1.1kg/cm²下滅菌30分鐘後完成滅菌。

乙、 清運過程中需要兩位人員協同進行，帶有手套人員負責清運廢棄物，另一位未帶手套人員則是協助開啟各區之門以利運送。

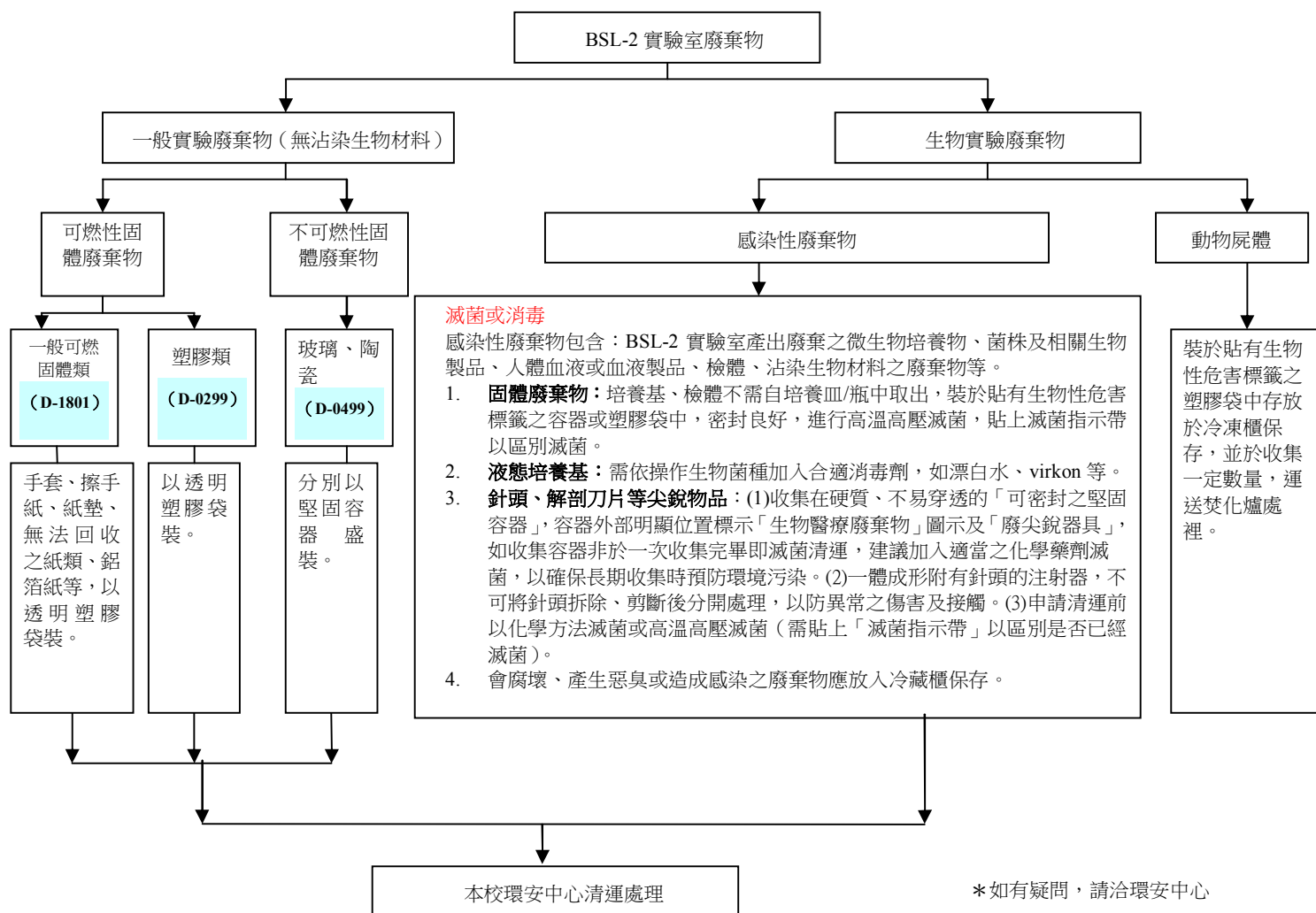
b. 液態生物性廢棄物:

放置在不銹鋼提籃，以高溫高壓滅菌釜於121°C，1.1kg/cm²下滅菌30分鐘後，再以清洗一般實驗器皿、玻璃試管和血清瓶方式清潔。

c. 一般廢棄物指無危害性者，一般性廢棄物則由清潔人員處理。

d. 實驗進行有時間的延續性，當天實驗其液態和固態生物性廢棄物產出後，液態廢棄物進行高溫高壓滅菌；固態廢棄物噴灑消毒劑封口，待隔天實驗結束後以高溫高壓滅菌的廢棄物清運處理程序處理之。

BSL-2 生物實驗室廢棄物分類處理清運流程



9. 實驗室之清潔與管理

- a. 每天定期安全檢查並記錄。
- b. 生物安全操作台之初級濾網應依使用頻率定期更換，替換掉之初級濾網需經滅菌袋封裝後，噴灑 70%酒精或 1% 漂白水溶液處理後，才能依廢棄物申報，依校內廢棄物清運系統申請處理。生物安全操作台每年委外校驗公司進行檢測風速與落塵數校正。
- c. 空調系統濾網之更換：委外校驗公司進行初級、中級與高級濾網之定期更換並填寫更換記錄，以維護本實驗室內環境之安全品質。
- d. 進行細菌或感染性物質相關實驗時，操作用具若直接接觸細菌液時，需以 1% 漂白水溶液，進行浸潤 18~24hr 消毒才可置於廢棄桶內。

10. 緊急應變處理

10.1 生物試劑洩漏緊急應變處理

A. 實驗室櫥櫃內(生物安全櫃)洩漏處理：

- 步驟1 進入實驗區前穿著個人防護器材：手套、安全眼鏡、實驗衣等始得進行清理工作。
- 步驟2 將擦拭紙放置於洩漏區上。
- 步驟3 使用殺菌劑（如 1% 漂白水溶液）清潔櫥壁、工作面及凹槽，使用殺菌劑時應避免噴濺。
- 步驟4 讓殺菌劑停滯污染面 10~20 分鐘。
- 步驟5 以擦拭紙擦拭或吸收所有的殺菌劑，將吸收棉紙放入標示有「生物性危害」紅色袋中，以生物性廢棄物處理。
- 步驟6 再以殺菌清潔劑清洗所有暴露面。
- 步驟7 以殺菌劑清潔生物安全櫃內部，包括更換初級濾網，替換掉之初級濾網放入標示有「生物性危害」紅色袋中，需經高壓滅菌處理後，依醫療廢棄物處理，若有紙製物或其他會吸收液體之物質則直接當生物性廢棄物處理。
- 步驟8 清潔與更換濾網完畢後，將 UV (紫外光燈) 開啟，至少 3 小時以上至隔夜。

- 步驟9 於生物安全櫃玻璃門張貼「消毒中，禁止開啟」相關字樣。
- 步驟10 如果櫥櫃有大量樣本洩漏，需立即停止所有作業立即投入緊急應變處理，並聯繫專職工安人員協助處理。

B. 實驗室內洩漏處理

- 步驟1 穿著個人防護器材：手套、安全眼鏡、實驗衣等。
- 步驟2 確定這間實驗室所有人員皆已疏散、清點人數並將房間門關閉。
- 步驟3 進入房間，以吸收棉索將洩漏範圍圍住，再以吸收棉紙覆蓋在洩漏區。
- 步驟4 小心傾倒殺菌劑（如 1% 漂白水溶液）在洩漏區外周圍，然後再往洩漏區傾倒，過程中避免產生噴濺及氣膠現象。
- 步驟5 讓殺菌劑靜置 20 分鐘以上。
- 步驟6 使用更多的吸收棉材料將殺菌劑完全的擦拭掉。
- 步驟7 將所有吸收棉材料放入標示有「生物性危害」紅色滅菌袋中，以生物性廢棄物處理。
- 步驟8 先使用殺菌劑清理後才可脫掉防護具，並將防護具丟棄於標示有「生物性危害」紅色滅菌袋中，以生物性廢棄物處理或以殺菌劑噴灑或浸泡殺菌完全後清洗。
- 步驟9 在實驗室門口張貼「消毒中，實驗人員禁止進入」相關字樣，避免不知情人員進入。
- 步驟10 離開後立即以殺菌劑清洗雙手及各身體可能之開放面。
- 步驟11 如洩漏無法控制，通知專職工安人員協助處理，工安管理人員需立即通知鄰近區域進行人員疏散。

C. 發生火災緊急應變處理

發生火災之事故發生者或發現者，依事故內容通報主管及緊急通報專線 271-7373 處理

步驟1 狀況判別：

- 引起火災的原因（明火、電氣走火、靜電火花等引燃易燃物）

- 火災現場是否有特殊的危險(害)狀況 (爆炸性氣體洩漏或毒性氣體 (蒸氣) 溢散或禁水性化學品或爆炸性、不穩定性化學品)

步驟2 危害性判別：

- 是否已有人員傷亡？有請迅速將人員移至安全區域予以急救。
- 是否有立即的危險？
- 有無發生爆炸或有爆炸的可能性。
- 空氣中，有害(險)性物質濃度，是否已達致死濃度或介於爆炸界限濃度範圍。
- 有立即危險，請盡速依照逃生路線離開火災現場，並緊急通報校方處理。

步驟3 火災處理

- 適用最初起火時，且能在三分鐘以內滅火之火源。利用 BSL-2 級實驗室門口外側有配置滅火器，直接使用手提滅火器滅火。
- 火勢無法收拾，請利用火災手按報知機(火警鈴聲示警通報)，盡速依照逃生路線離開火災現場，並緊急通報校方處理。

步驟4 發生地震緊急應變處理

- 室內人員應停止手邊工作，關閉開啟之火源，立即尋找堅固牢靠之樑柱邊或桌子櫃子邊掩護。
- 應立即儘可能去關閉火源電源及危險、危害氣體源，以免發生火災、爆炸及氣體洩漏。
- 於地震搖晃間斷或停止時，依照緊急逃生路線往室外空曠處疏散，不得搭乘電梯。
- 因地震而引發各項事故 (人員受傷、化學品洩漏、火災等) 時，發現同仁應立即採取相關處理措施及通報同仁支援；利用火災手按報知機 (火警鈴聲示警通報)。

步驟5 發生停電緊急應變處理

- 停電時立即停止手邊工作，關閉火源與電器電源開關，若有安全疑慮，立即依照緊急逃生路線離開。

- 停電狀況發現者，依事故內容通報實驗室負責人與主管，若停電引發各項事故（人員受傷、化學品洩漏、火災等）時，發現同仁應立即通報實驗室負責人。
- 在實驗進行中，因停電終止實驗時，首先應將實驗器具密封蓋好，產出的廢棄物密封完整再放置廢棄物收集筒中並噴灑消毒劑，拉下生物操作台的門並關好，拔除不必要使用之插頭，確定跳電或復電時對於儀器不會造成損傷。依緊急照明燈指示逃生路線出實驗室。
- 確認復電後各儀器運作功能正常，若有異常則依各儀器標準操作流程進行檢修或報請維修處理。

附錄

附錄一、生物安全操作台及細菌操作注意事項及應變處理方式

1. 工作人員必須穿著 BSL-2 細菌培養室專用實驗衣、室內鞋、乳膠手套，必要時需配戴安全眼鏡，始得使用此操作台。
2. 使用操作台前，需打開風扇及 UV 燈至少 20 分鐘以上始得使用。
3. 使用操作台前，檯面需以 70%酒精擦拭。
4. 操作時，操作台之安全玻璃窗需拉下，頭部距離玻璃底部至少 30 公分以上。
5. 本操作台不得使用銳利之工具。
6. 操作人員手部有傷口時停止操作細菌及感染性物質。
7. 所有使用細菌培養後及沾有菌液之廢棄物均需經高溫高壓滅菌處理。
8. 含細菌之培養容器之進出操作台，需確定容器為緊閉或蓋上。
9. 含細菌之培養容器之移進移出需小心操作，避免溢濺，若不小心溢濺，應立即使用 1% 漂白水溶液擦拭消毒。若培養液沾到工作實驗衣或護具，請先更換工作護具，再進行現場消毒處理。
10. 含細菌之容器之移進與移出後，以 70% 酒精擦拭培養箱門與門縫處進行消毒。
11. 安全操作台使用後以 70%酒精噴灑檯面，並以 UV 燈照射 30 分鐘以上。
12. 每天下班前，以 70%酒精擦拭安全玻璃窗與門縫處進行消毒。

附錄二、每日實驗室例行檢查表

每日下班前實驗室安全衛生例行檢查表（註：下表為參考用，可以用本校實驗室每日安全衛生檢查表修改）

檢查日期： 年 月

單位/部門/系所：_____ 實驗室編號：_____ 大樓 _____ 室 _____

檢查結果標示符號：✓ 表合乎要求 X 表未合乎要求 #表下班後繼續使用

檢查項目	檢視要點	檢查結果 (日)																															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	
無菌操作台 (2台)	Power off、門拉下、關燈。																																
培養箱(2台)	下班後如未使用，電源應關閉。																																
水槽	實驗器具是否保持整齊、清潔、定位。																																
天平	電源關閉。																																
工作桌	桌面是否整齊清潔。																																
照明	電源關閉。																																
空調系統	運作是否正常。																																
特殊檢查	環境是否有異常聲音及異味																																
	化學品是否放置於安全儲存處																																
檢查人簽名																																	

