

BSL-2實驗室優良微生物 操作規範與技術

疾病管制局
曾燦璋

參考資料

1. WHO : Laboratory Biosafety Manual , 3rd edition , 2004
2. CDC-NIH : Biosafety in microbiology and biomedical laboratories , 4th edition , 1999
3. Australian Standard "Biological safety cabinets — Installation and use" "Part 2 : Laminar flow biological safety cabinets (class II) for personnel , environment and product protection" AS2647 , AS2252.2 1994
4. 1994 Laboratory-acquired Infections , 4th edition , 1999
5. 國科會：基因重組實驗守則，民國93年6月增修版

病原微生物依其病原性、傳遞模式、宿主、有效預防感染措施及治療方法可歸為如下四群：

- 一、Risk Group 1：（對個人及社區低危險性）對人類不大會引發疾病或對植物或動物不大會引起重大危害的微生物。
- 二、Risk Group 2：（對個人有相當的危險性，對社區危險性有限）對人類及動物或植物會引起疾病，但對實驗室工作人員、社區、牲畜或環境不會造成嚴重危害；實驗室曝露可能引起嚴重感染，但有有效的治療及預防措施，擴散危險有限的病原體。

三、Risk Group 3：（對個人高度危險，對社區危險性有限）
能引起人類嚴重疾病，對實驗室工作人員顯現嚴重傷害；
在社區裡擴散可能出現危險，但通常有有效的預防或治療
的病原體。

四、Risk Group 4：（對個人及社區高度危險）引起人類或動
物嚴重的疾病。對實驗室工作人員呈現嚴重傷害且可能是
接觸性傳染的病原體。

相對於病原微生物之分級，實驗室依其阻遏設施也分成四種安
全等級即 BSL1、BSL2、BSL3、BSL4（P1、P2、P3、P4實驗室）

標準微生物操作程序(I)

1. 實驗室外面要標示實驗室安全等級、負責人及聯絡電話
2. 實驗進行中實施門禁管制。
3. 實驗衣必須與平時穿著之衣服分開放置
4. 感染性物質工作區必須備妥有效消毒劑
5. 創傷傷口要以防水之衣物覆蓋
6. 處理感染性物質或動物，脫掉手套後及離開實驗室前須洗手。
7. 戴手套在實驗室內必須先脫掉才可接聽電話或開門窗、開冰箱、培養箱或顯微鏡觀察應更換手套
8. 實驗室及實驗動物房內禁止飲食、抽煙、化妝或處理隱形眼鏡。

標準微生物操作程序(II)

9. 實驗室禁止用口吸取檢品、溶液。
10. 小心操作以減少濺灑及氣霧之產生。
11. 實驗室保持乾淨整潔，書寫紀錄要與感染性工作區分開
12. 工作檯面須每天至少清理消毒一次，如有任何活性感染物灑落，立即消毒。
13. 所有培養物及實驗之感染性廢棄物丟棄前均需經高壓高溫滅菌處理。
14. 禁止穿著實驗衣離開實驗區到餐廳、員工休息區、辦公室及其他公共場所。
15. 例行昆蟲及鼠類之防治。

個人安全防護

1. 進入實驗室應穿實驗衣，戴口罩，穿保護腳趾膠鞋，戴手套，必要時戴眼罩或面罩。
2. 操作之病原體如有疫苗可預防，沒有保護抗體之個人，必須事先施打疫苗。
3. 實驗室工作人員要事先留存血液檢體當Base line，必要時定期採取，以利健康管理及追蹤監視。

檢體容器

檢體的容器可用玻璃材質、塑膠材質尤佳，容器要堅固，蓋子或塞子要蓋好，內容物不能洩漏，不可以有檢體留在容器之外表，容器外面要標示清楚，檢體名稱、編號、患者姓、採取日期等。檢體報表或檢驗請求表格不可以包在檢體管子外表，要另外放入防水之封套。



不適合於外送之檢體容器(院內用)



適合於運送之檢體容器(蓋子緊密)

檢體的收受

收受多數之檢體要特別設立一個房間或區塊不可以跟一般辦公室混在一起。檢體收受人收到檢體應立即與報表核對檢體件數、量（檢體收受人不可任意打開檢體瓶）、保溫狀況、登記收到日期、時間、並依序加以編號後分送各檢驗室，除非不耐冷溫的病原体否則分送時也要保持低溫狀態。檢驗人員收到檢體要在送驗簿(單)上簽收才算完成送驗程序。

檢體之傳送

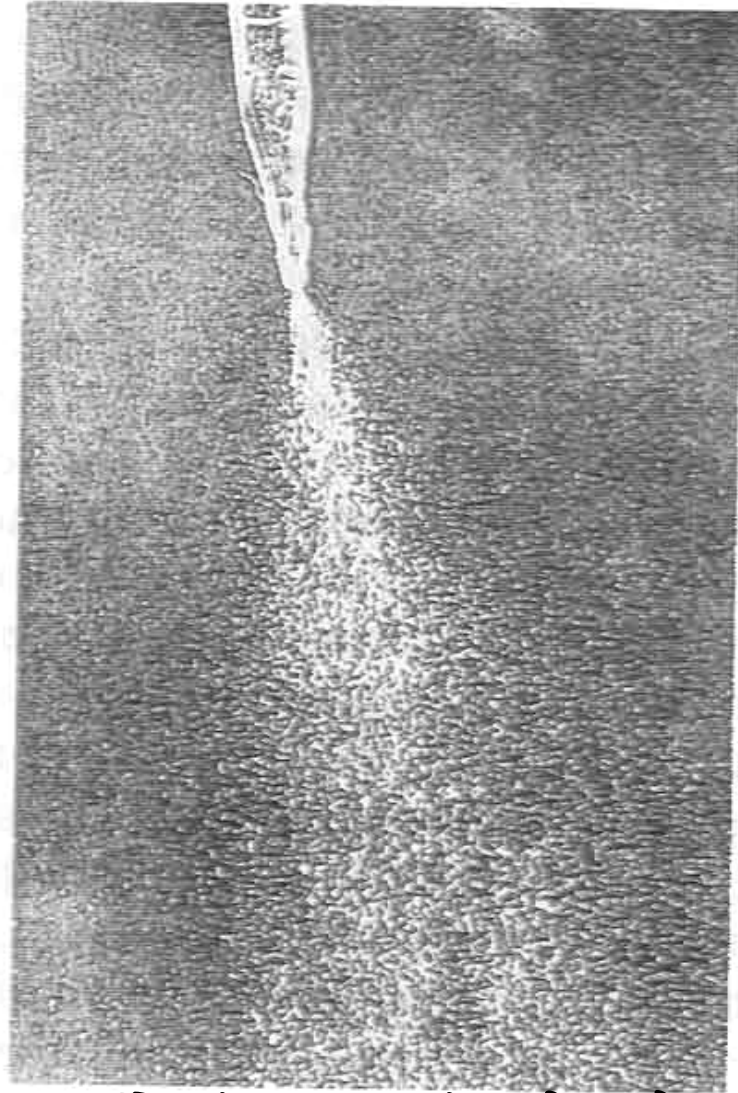
為避免意外的洩漏或溢出，實驗室外檢體運送，檢體要直立插在試管架上再插入第二層容器內(如箱子)，第二層容器之材質可以是金屬或塑膠材質且可高溫蒸氣滅菌或耐化學消毒劑，最好蓋子有彈性墊環，檢體運送箱要常作清消。運送時檢體應保持冰冷（4-8°C）。

打開檢體包裝

收受及打開檢體包裝的人員，應該了解對健康具有潛在的危險性，工作人員需接受訓練及熟悉標準操作步驟，尤其是遇到檢體容器破裂或洩漏之處理程序，盛檢體的容器一定要在生物安全櫃(BSC)內才能打開，而且一定要泡好消毒劑以備隨時之需。

吸管及吸管輔助器之使用 (I)

1. 不可用嘴吸吸管，一定要使用具過濾器之吸管輔助器
2. 所有吸管必須要有棉花塞以減少污染到吸管輔助器
3. 不可吹盡有感染性的液体
4. 吸管要插入吸管輔助器之前先檢視吸管尖端及管口是否有瑕疵
5. 測試吸管輔助器功能是否正常，插口有沒有棉花堵塞，有沒有受損
6. 吸管輔助器受污染應立即消毒處理以免他人使用再受污染



吸管尖端殘留液吹出產生氣膠狀物

錄自 C.H.Collins&D.A.Kennedy 所著的 Laboratory-acquired Infections



吸管輔助器

吸管及吸管輔助器之使用 (II)

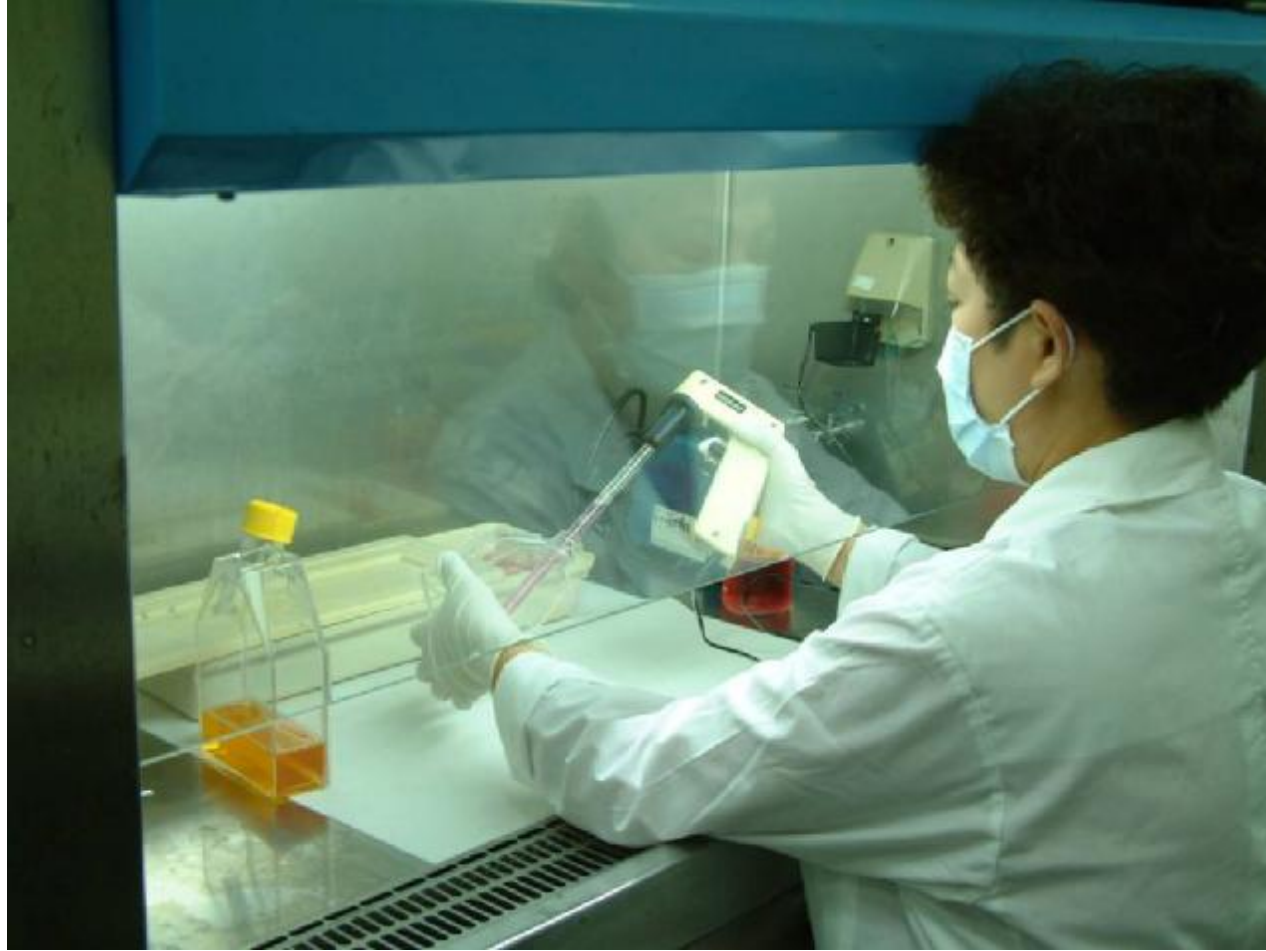
7. 感染性液体不可用吸管作吹吸的混合動作
8. 液体不可以吸管作強力的吹出動作
9. 污染的吸管、吸管頭(Microtip)要完全浸入盛消毒劑之堅固容器內，在消毒劑內放一段時間才可處理
10. 污染的吸管容器必須放消毒劑並放在BSC內不可放在地板上
11. 盛吸管之容器要穩固且能容納整支吸管浸入
12. 避免吸管裡面的感染性液体滴出、散佈，工作台上要鋪吸水性墊物，用過以感染性廢棄物處理



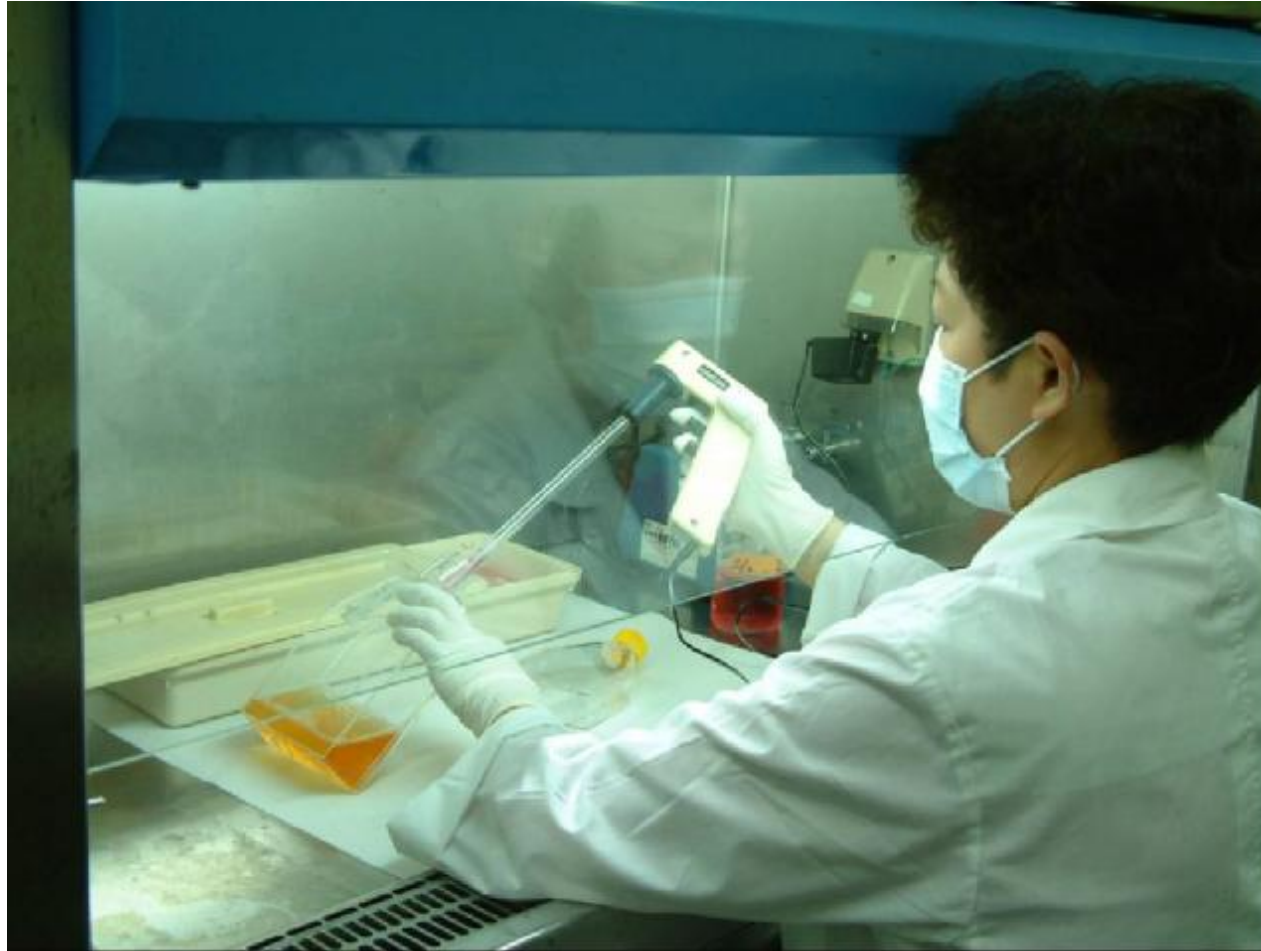
吸管沒有完全浸到消毒液



吸管消毒盒內盛消毒液



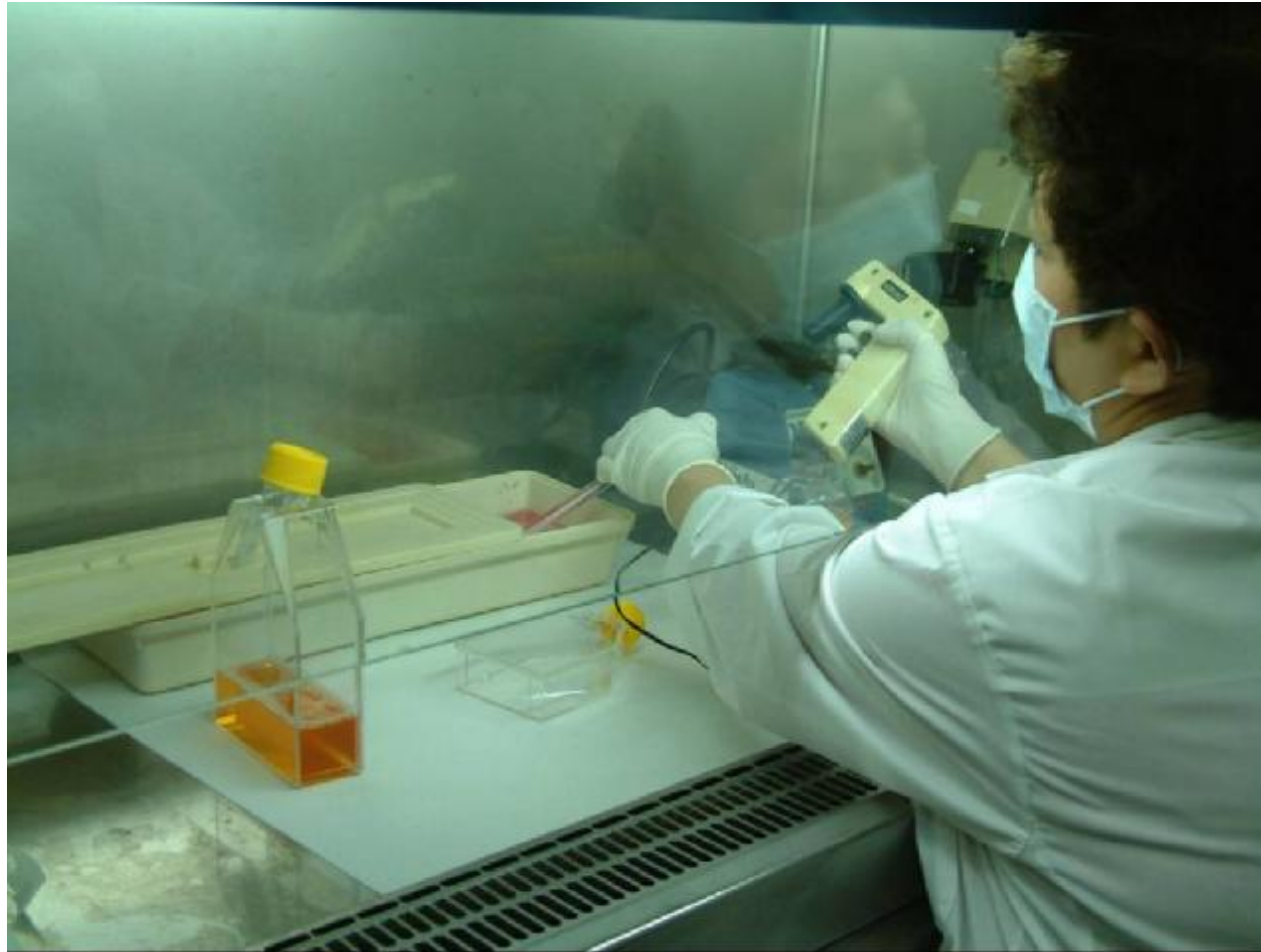
吸取感染性培养液



吹出時吸管尖端液體勿
吹盡以防產生氣膠



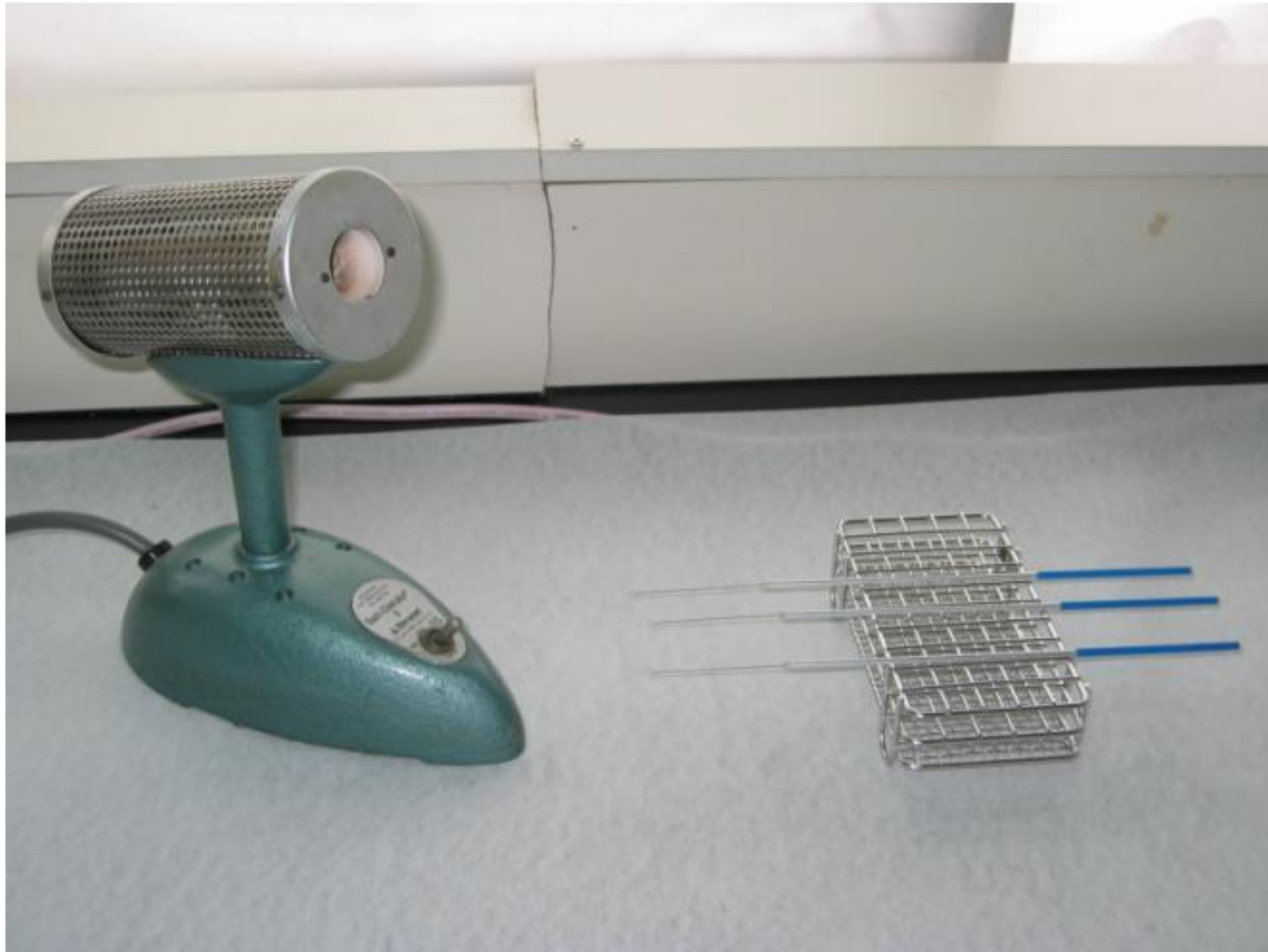
使用過之吸管卸下之前
先吸消毒液



吸管插入消毒盒才可卸下

避免感染物之擴散

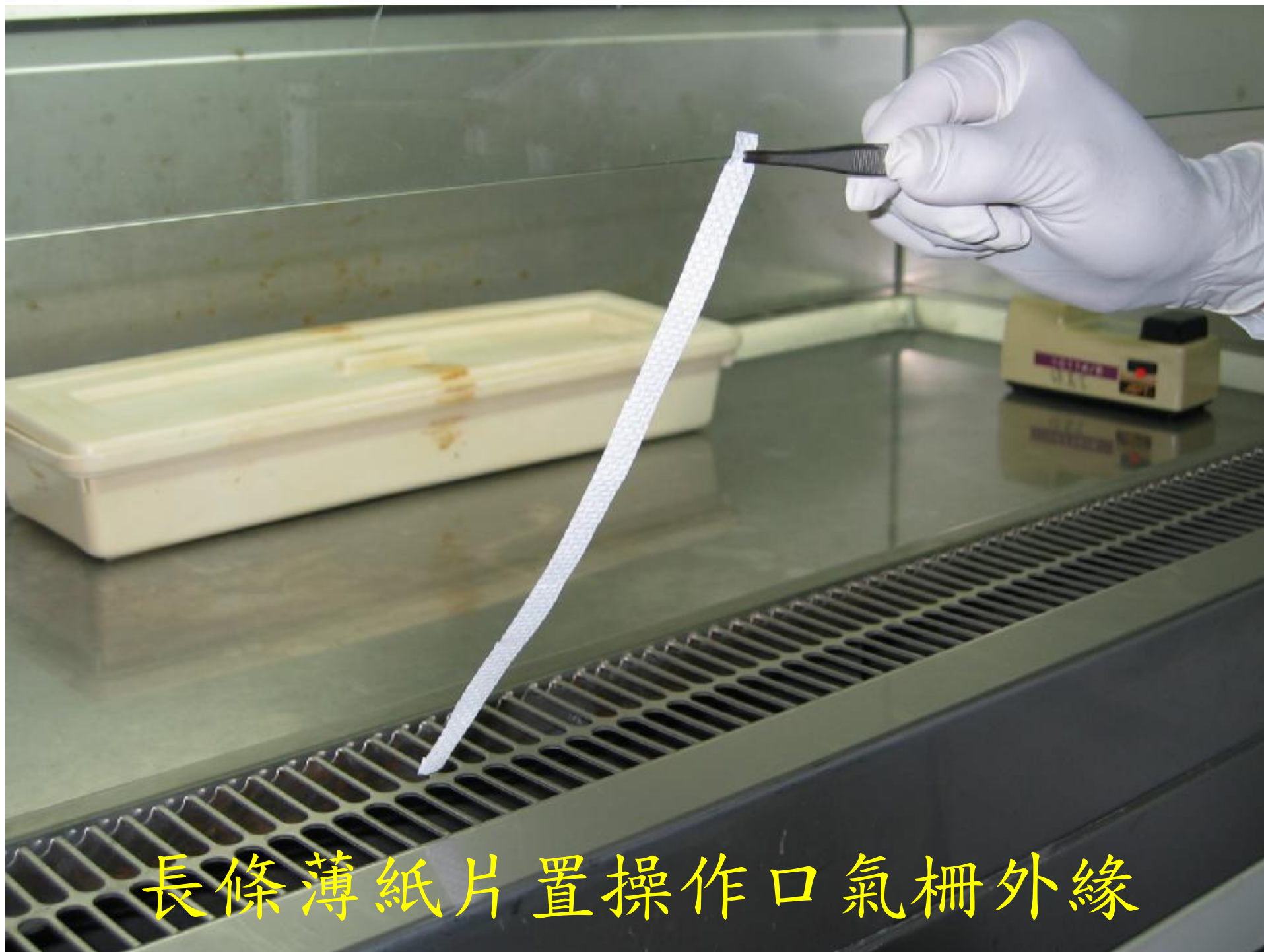
1. 避免鈎菌提前掉落，微生物接種環(白金耳)的直徑限2-3mm，且環要完整，柄端長度不超過6cm，以減少振動。
2. 開放式本生燈有濺射感染物之險，不可使用。應採用有阻體之電氣焚燒器滅菌接種環。
3. 小心烘乾痰液檢體，避免造成氣膠。
4. 要丟棄之檢體及培養物應放進防漏之袋子內，貼上滅菌指示帶，滅菌後置入棄物桶。
5. 工作完畢工作區域要用適當的消毒劑作清消
6. 有感染性液濺出或滴落立即以浸消毒液之厚紙巾覆蓋。



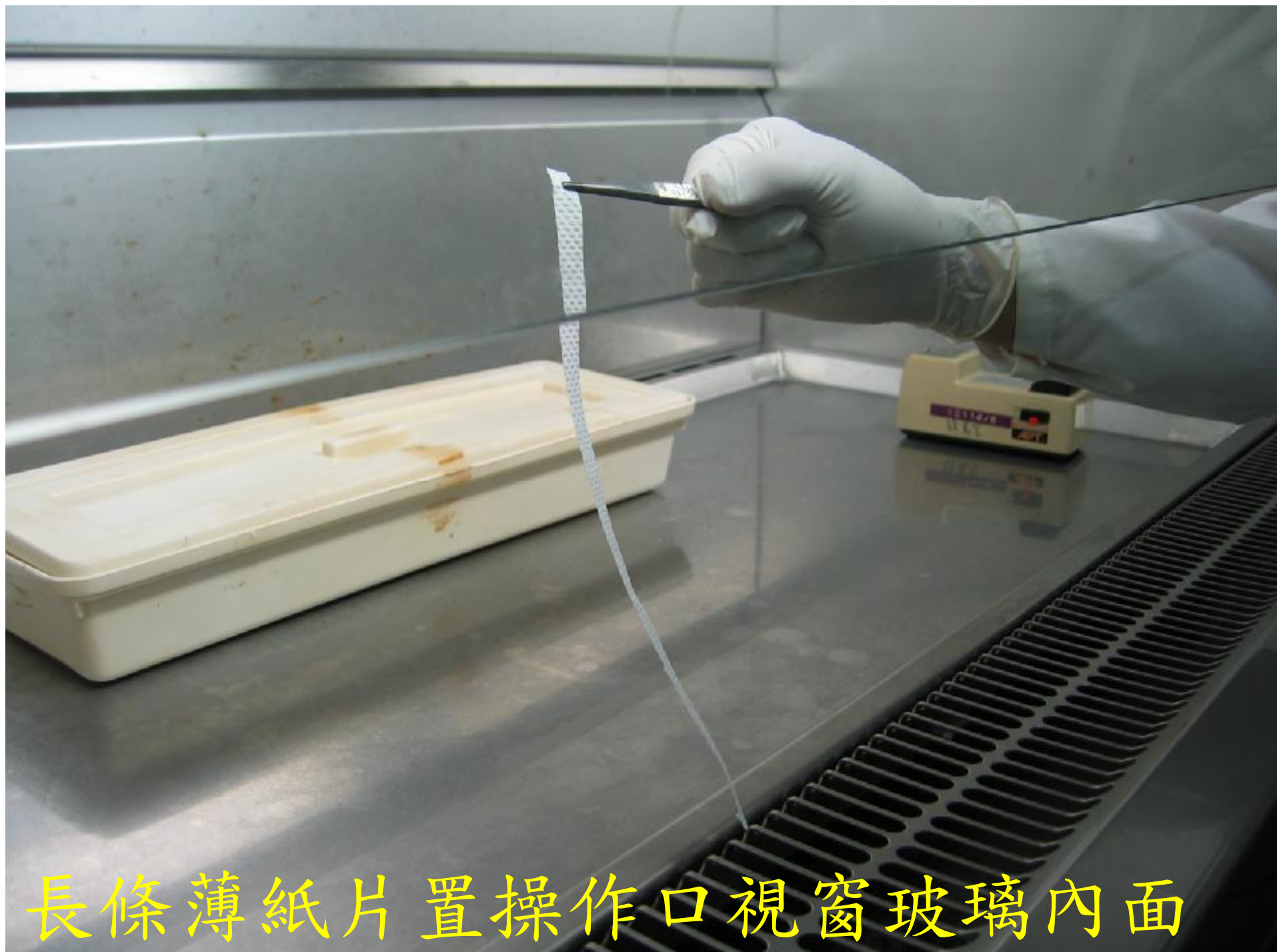
電氣燃燥器及細菌培養環(線)

生物安全櫃 (BSC) 之使用 (I)

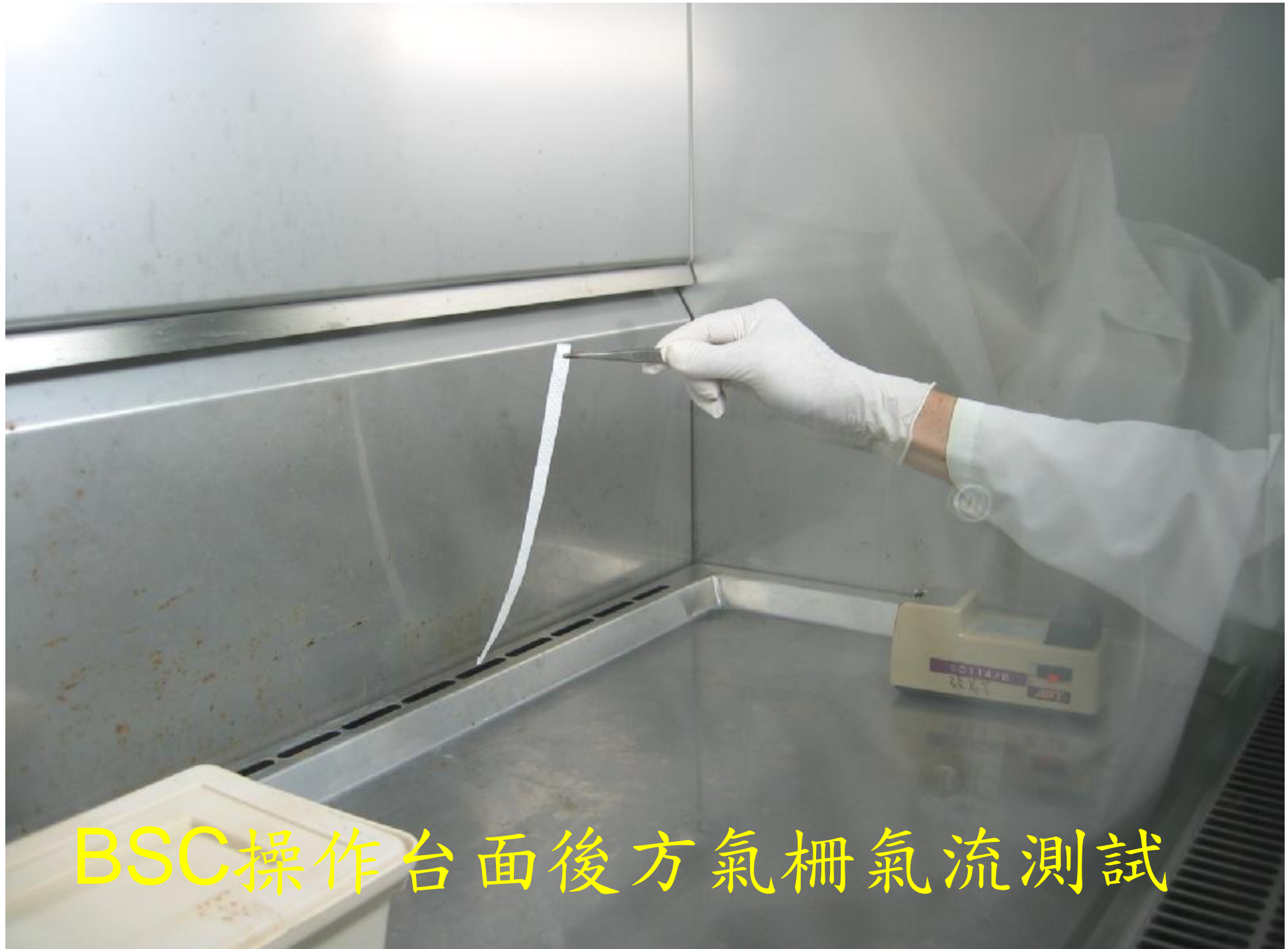
1. 向所有使用者說明BSC之使用限制，並訂定使用紀錄表、安全操作規範或使用操作程序書，發給屬員，尤須特別聲明，濺灑、破裂或不良之操作技術，無法保護操作者之生命安全
2. 啟動BSC電源及馬達開關
3. 待BSC之氣流穩定後(約5分鐘)以紙條測試BSC操作口氣流是否形成氣幕(Air curtain)
4. 功能故障的BSC不可以使用
5. BSC 台面鋪浸消毒液厚紙巾或抗污紙墊
6. 使用操作中不可打開視窗玻璃
7. BSC 台面盡可能少擺放器械及耗材，後方之氣柵不可堵塞



長條薄紙片置操作口氣柵外緣



長條薄紙片置操作口視窗玻璃內面



BSC操作台面後方氣柵氣流測試

適合實驗用之
座椅(高低可調)



生物安全櫃 (BSC) 之使用 (II)

8. BSC 內不可使用本生燈，因熱氣擾亂氣流，且可能損壞HEPA，可以電氣焚燒器替代，最好使用丟棄式滅菌接種環
9. 所有感染性實驗操作必須在BSC內之中間或後方對台面上，操作者由視窗向內透視
10. 減少人員在操作者後面走動
11. 操作者之手、肘進出不能影響到氣流方向
12. 注意吸管或實驗材料不可堵到氣柵，因為這樣擾亂氣流方向，會造成檢體污染及操作者暴露險境
13. 使用真空馬達吸引潛藏感染感染性液必須裝Trap及空氣過濾器



觸控式瓦斯燈

細火焰瓦斯燈





感染性液體吸引裝置

生物安全櫃(BSC)之使用(III)

14. 決不可在BSC台面作紀錄工作
15. 實驗操作中不慎濺出或滴出感染性液，立即以浸消毒劑之吸水性厚紙布覆蓋
16. 實驗操作中突然遇到停電或BSC故障，工作人員應立即離開
17. 實驗操作前及工作完成後BSC風扇馬達至少繼續運轉5分鐘
18. 工作完畢BSC要用適當的消毒劑擦拭
19. 定期擦拭UV燈管
20. 開UV燈設定開燈時間
21. BSC每年定期檢測

避免感染性物刺傷

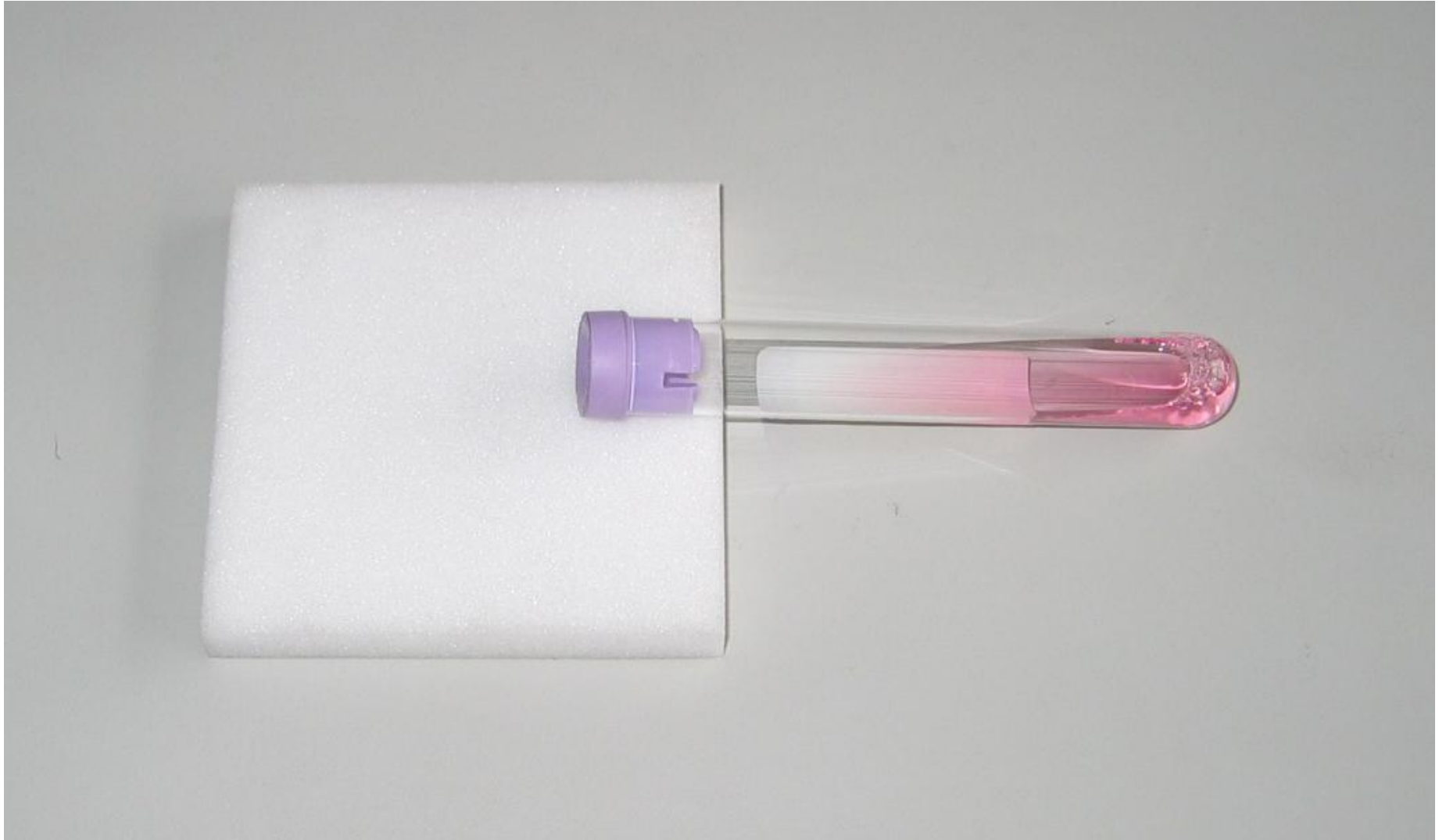
1. 小心操作避免玻璃器具類之破裂碎片導致意外接種或割傷，盡可能使用塑類器皿替代
2. 意外刺傷都由尖銳物品如注射針、玻璃毛細管或玻璃器皿破裂所導致
3. 減少使用注射筒或使用特別設計之安全針筒及開瓶器以降低傷害
4. 注射針使用後絕不可把針套套回去，用過之針筒棄置於有蓋子之堅固容器內
5. 處理破裂之玻璃碎片一定要用掃把及鑷子
6. 以塑膠品替代玻璃品

避免吞入感染性物及皮膚、眼睛之接觸

1. 微生物實驗操作中大的顆粒和小液滴(直徑 $>5\mu\text{m}$)很快就落到工作台面上和操作者的手上所以操作者要戴拋棄式手套，並避免口、眼及臉部接觸感染性物
2. 實驗室內不可貯放或飲食、食物
3. 實驗室內嘴巴不可含鉛筆，咀嚼口香糖
4. 不可以在實驗室內化粧
5. 任何可導致濺灑的可能潛藏感染性物操作，臉部、眼睛、口都要有防護

血清分離

1. 經過適當訓練的人員才能從事這項工作
2. 戴手套及眼、粘膜之防護
3. 良好的實驗操作技術才能避免或減少濺射及氣膠之形成，血液及血清要利用吸管輔助器吸取，不可用倒的或以口吸取
4. 分離血清用之全血，注意試管之放置斜度，避免血液碰到試管蓋(塞子)
5. 吸管及毛細吸管用後全部浸入消毒水裡，留置一段時間後丟棄或洗滌滅菌使用
6. 欲丟棄之血液檢體管應置於有蓋之防水容器內，高壓滅菌或焚燒
7. 備妥適當之消毒劑以備處理污染及濺灑之需
8. 血清檢體管盛量要適當，過量易造成污染



注意血液檢體斜放時勿沾到塞子(蓋子)

離心機之使用 (I)

1. 良好的機械操作是實驗室安全使用離心機之要件
2. 離心機應依照製造廠商之說明書操作使用
3. 離心機放置之高度要使操作人員能看清楚腔室之離心頭及離心管套以利操作
4. 離心管及檢体管之管壁要厚質玻璃、塑膠材質更好，使用前要檢視有無瑕疵
5. 注意離心管之材質是否能耐你所要的離心力及轉速
6. 離心管之檢体裝量要按生產廠商之使用說明裝填
7. 離心管及離心管套蓋子必須蓋緊
8. 檢体之裝填及吸取必須在BSC內操作
9. 離心管套及其套環要配對，放好檢体後確實稱重平衡



氣密離心套管



離心套管正確擺放



離心套管錯誤擺放



離心管錯誤擺放



離心管錯誤擺放



離心管正確擺放



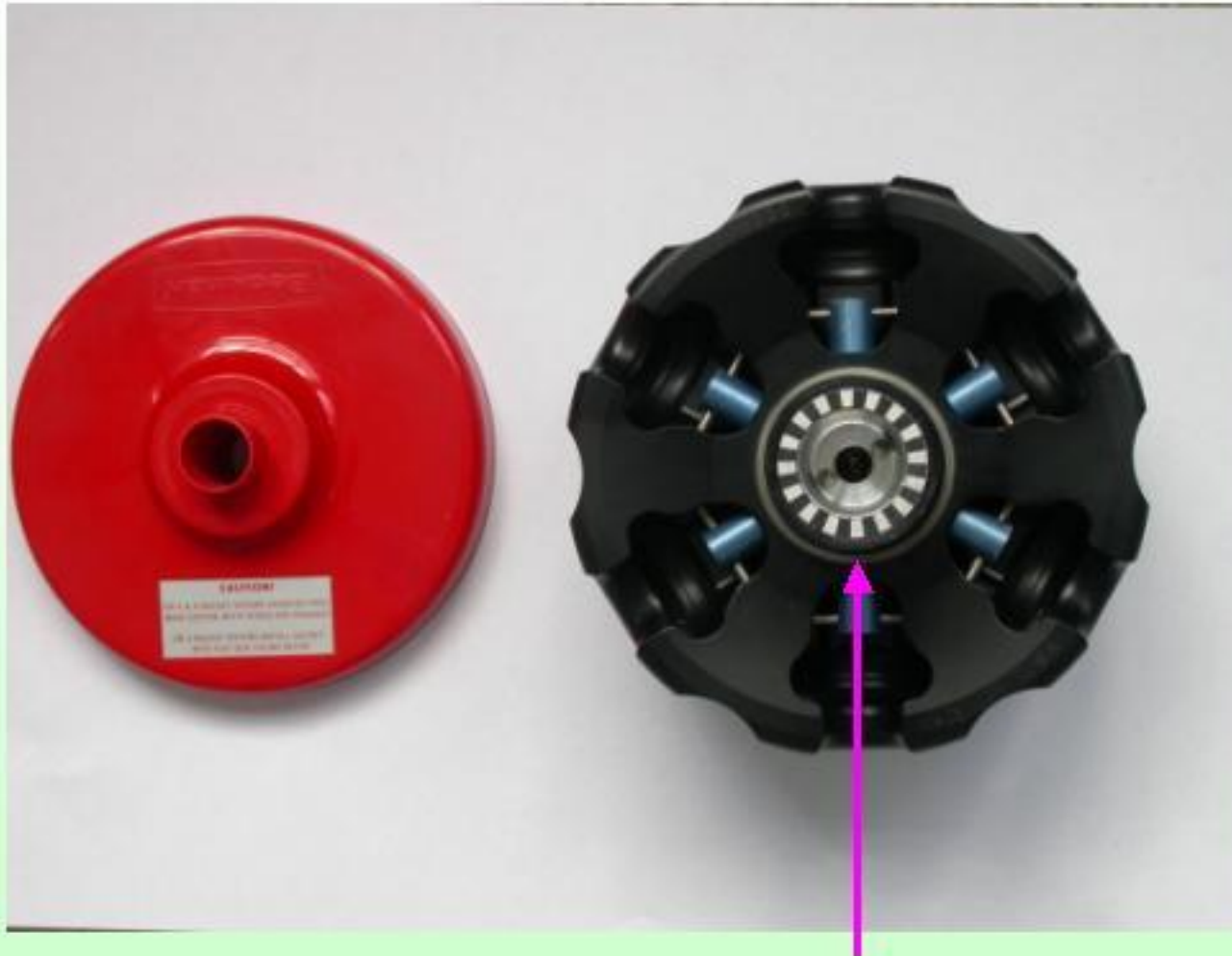
離心管套錯誤擺放

離心機之使用(II)

10. 用蒸餾水或70%propanol 平衡空離心管套(Empty buckets)，不可用生理食鹽水或次氯酸鈉液因為會腐蝕金屬
11. 用角型轉子(Angle rotor)，離心管檢體不能裝過量，否則會溢出，造成污染
12. 每日檢視離心機腔室內轉子旋轉高度處之污穢，如有污穢應重新評估protocol
13. 每日檢視轉子及離心管套是否有腐蝕或線狀龜裂
14. 每次使用後離心管套、轉子及離心機腔室要作清消
15. 離心時轉速不可加速太快

離心機之使用(III)

17. 轉子應先預冷至所要的離心溫度
18. 使用超高速離心轉子之前要檢視轉子底部之圓形轉速感應片是否貼緊或脫落
19. 使用前檢視離心管、離心管套及轉子的蓋子O型墊環是否裝妥
20. 注意分生用小型離心機蓋子是否污穢
21. 紀錄轉子使用時之轉速、時間、溫度，不同轉子分別紀錄
22. 轉子如污染感染性液，應使用不損其材質之消毒劑或氧化乙烯(E. O. G)處理
23. 轉子定期送廠安全檢測



Rotor轉速反應片(Disc)



注意分生實驗用

小型離心機蓋子是否有污染

離心機之使用(IV)

25. 離心機定期安全檢測
26. 確認轉子是否確實裝進轉軸
27. 離心管套使用後要倒立瀝乾平衡液
28. 假如離心機是置入前方開放之Class I或Class II BSC內，當離心時感染性的氣生性顆粒可能噴出，這種顆粒由BSC之氣流快速運行滯留於HEPA。良好的離心技術以及緊閉試管蓋子可防範感染性氣膠及顆粒之擴散

高壓蒸氣滅菌鍋 (I)

1. 欲滅菌之液狀物容器不可裝滿超過三分之二以上的容量且不可緊閉容器口。
2. 用過耗材要裝進內襯耐高溫滅菌袋之不銹鋼桶才可送進高壓蒸氣滅菌鍋內。
3. 滅菌物貼滅菌溫度指示帶。
4. 隨時緊閉鍋門。
5. 滅菌完成欲打開鍋門必先確認內鍋壓力已歸零才可打開鍋門。

高壓蒸氣滅菌鍋 (II)

8. 排氣過濾
9. 安全閥檢查
10. 定期清洗
11. 年度安全檢查

二氧化碳培養箱

1. 培養容器外面應標示
2. 水盤定期清洗及更換蒸餾水
3. 注意二氧化碳桶氣體量
4. 定期檢測及校正培養箱內CO₂
5. 紀錄培養箱溫度及CO₂濃度
6. 有培養物滲漏、污染立即清除消毒

恆溫水槽

1. 注意水位不可以低於電熱管，隨時添加水量
2. 定期清洗恆溫水槽
3. 下班之前關閉不用的水槽加熱器
4. 有感染物污染時水溫調高到75°C持續加溫一小時，待溫度降下後加適量維康粉(約1%)消毒，清洗，更換蒸餾水

均質機、振盪器、混合機及音波振盪器之使用

1. 家庭用的均質機不可用於實驗室，因為會洩漏或釋放氣膠，要使用實驗室專用之混合機或鐵胃(Stomacher)較安全
2. 蓋子及杯子或瓶子必須狀況良好，沒有裂縫或扭曲
3. 均質機、振盪器及音波振盪器在使用時杯子會造成壓力，含感染物之氣膠可能從蓋子與容器之間逃出，塑膠容器尤其是PTFE(polytetrafluoroethylene)容器特別受推寵，因為玻璃可能破裂而釋放出感染性物因而傷到操作人員
4. 使用均質機、振盪器及音波振盪器要蓋上透明塑膠蓋子，這些儀器用後要清消，可能的話套上塑膠套在BSC內操作
5. 操作完畢容器要在BSC內靜置一段時間才能打開
6. 使用Vortex混合感染性液体時，手應執於液面上適當之高度處液体才不會衝到蓋子



疾病管制局



感染性液體混合之試管手持法

CDC

組織研磨機之使用

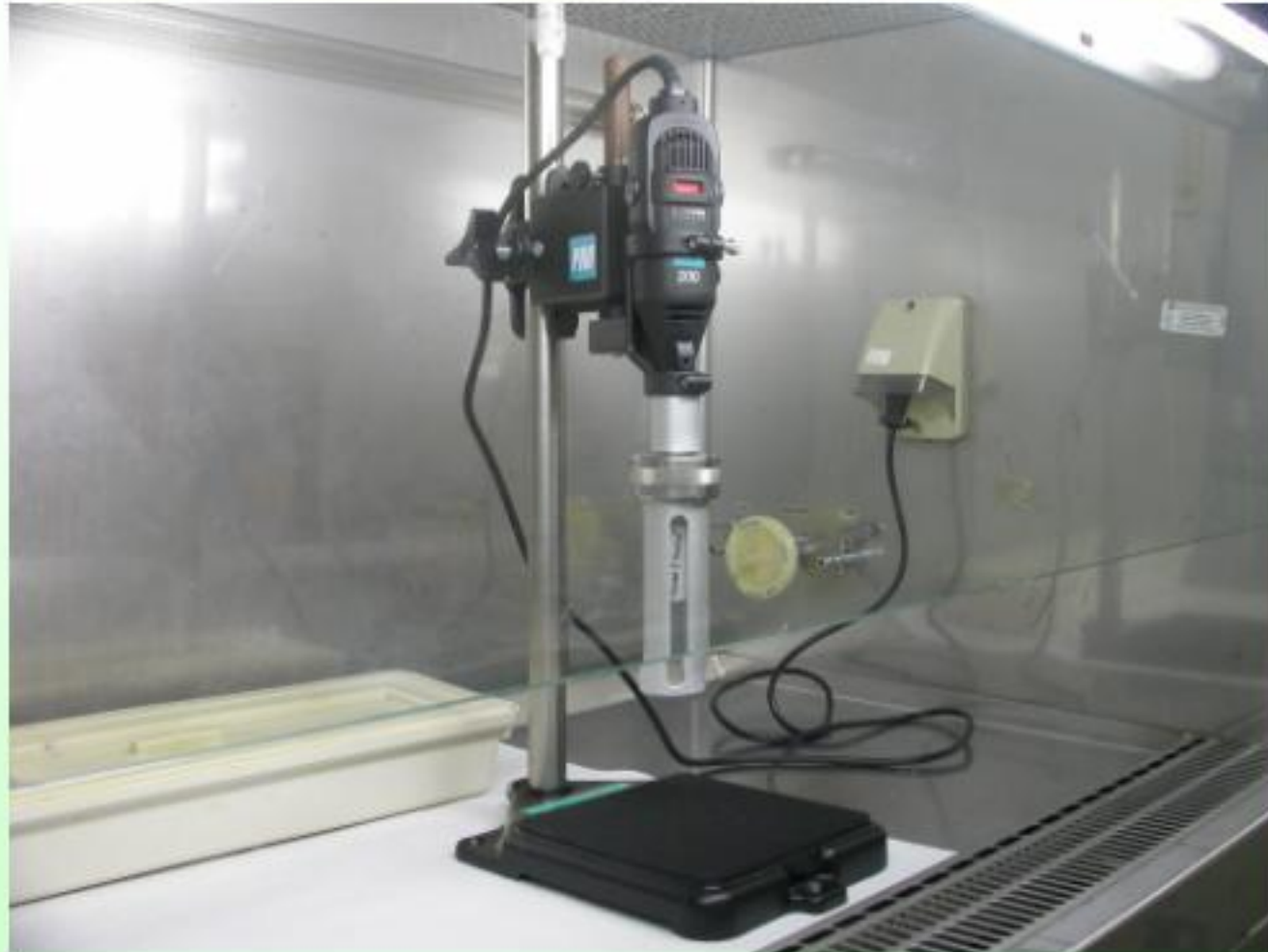
1. 使用玻璃研磨器要戴手套，研磨器下面鋪浸消毒液厚紙巾，採用PTFE塑膠研磨器較安全
2. 高速組織研磨機之刀具組與容器必須能氣密組合，使用時要在冰冷狀態下操作才不會影響檢體品質
3. 開始以低速研磨，緩緩提高轉速
4. 研磨後至少靜置15分鐘待產生之氣膠沉下才打開
5. 組織研磨器(機)要在BSC內使用，用完浸消毒液再高壓滅菌



組織研磨刀具



疾病管制局



組織研磨器組裝

CDC



組織研磨時檢體必須保持低溫冰冷

冰箱、冰櫃之使用與管理

1. 冰箱、冰櫃要定期清理，貯存中容器如有破裂立即處理，清理時戴面罩及厚橡膠手套、清理完，冰箱、冰櫃內面要消毒
2. 超低溫冰櫃要定期更換溫度紀錄紙及散熱風扇濾網
3. 冰箱、冰櫃內要放溫度計，並每日作溫度紀錄
4. 超低溫冰櫃內保存物少時應放些冰寶以維溫度之穩定
5. 所有保存於冰箱、冰櫃內之容器外表要清楚標示內容物、保存者姓名、日期、未標示及過期的材料滅菌、棄置
6. 易燃性液体不可以存放在冰箱(櫃)內
7. 冰櫃內保存物必須列清單保存
8. 放在開放空間之冰箱、冰櫃需加鎖

玻璃及尖銳物

1. 盡可能以塑膠製品替代玻璃品，有裂痕或瑕疵品都不可以用
2. 注射針筒不可當吸管使用
3. 欲推出注射筒內(有感染性液体)之空氣，針頭必須插入內塞棉花之滅菌小試管，注射筒才緩緩推出空氣



使用注射器抽取感染性液體



針頭插入棉花塞之滅菌試管



排除空氣



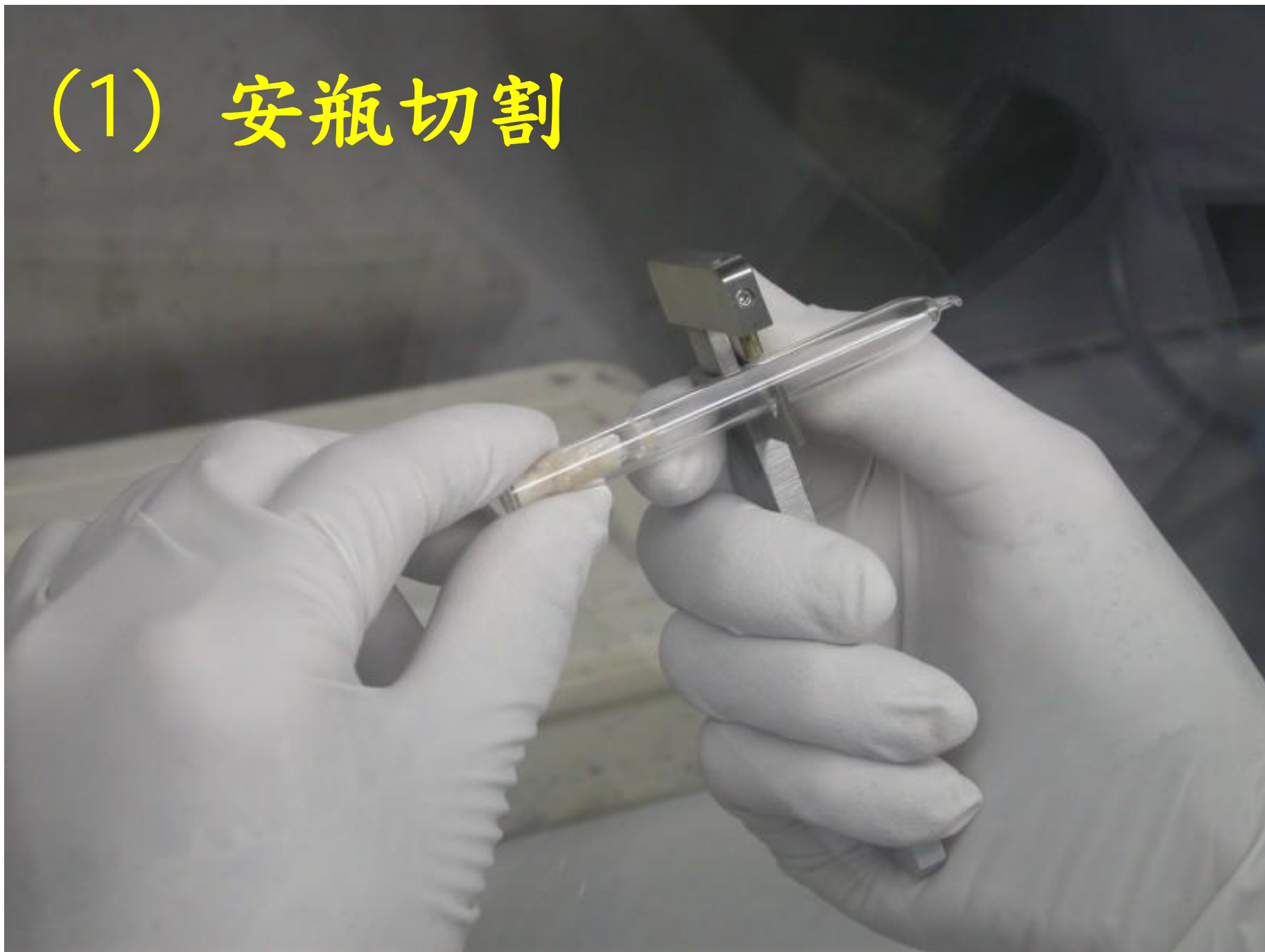
使用鑷子套回針頭蓋子

凍結乾燥安瓶(裝感染性材料) 之開封

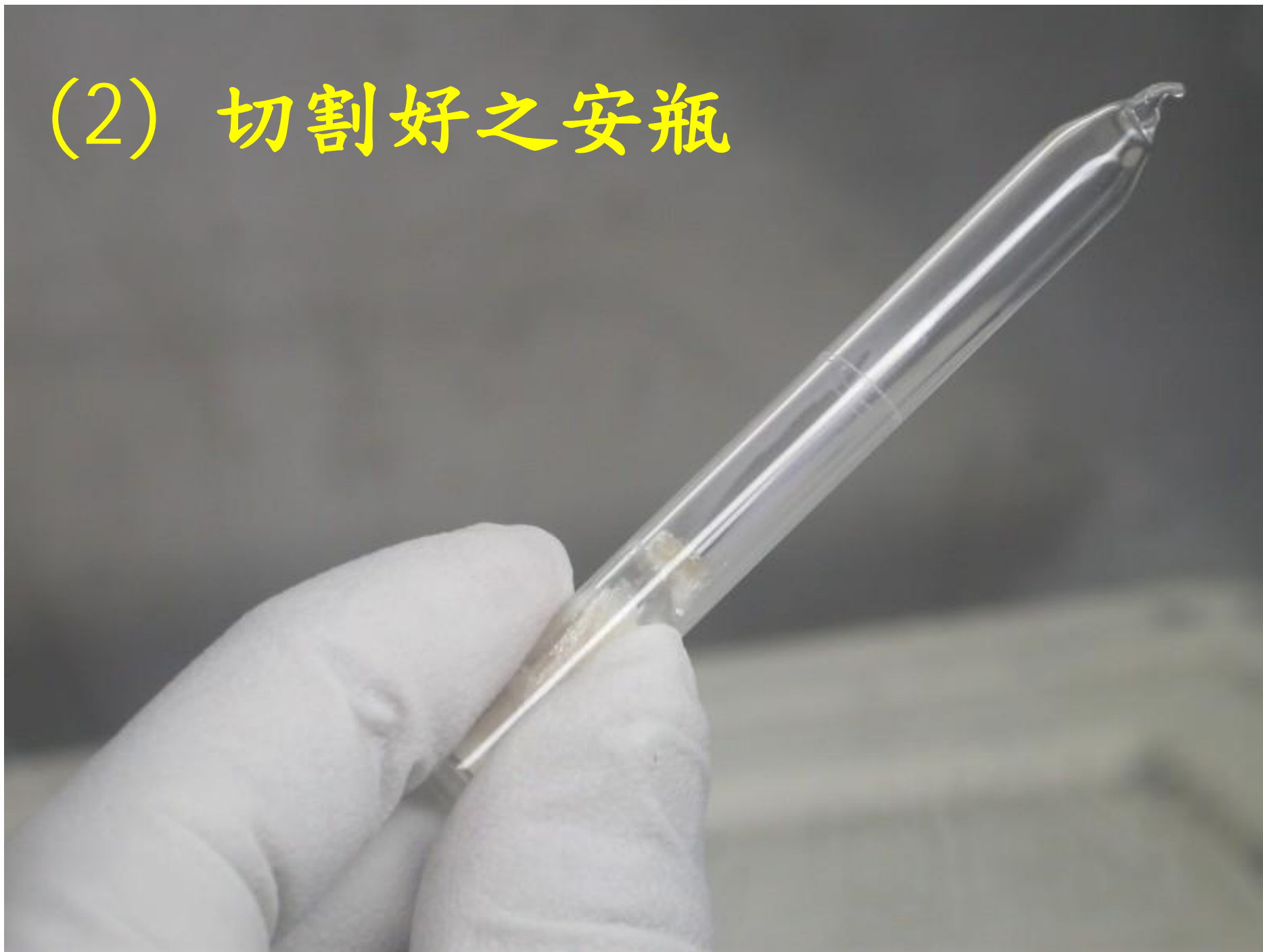
開凍結乾燥安瓶一定要特別小心，因內容物在負壓狀態折斷安瓶突然間空氣進入可能有些內容物會衝出，開安瓶一定要在BSC內操作步驟如下：

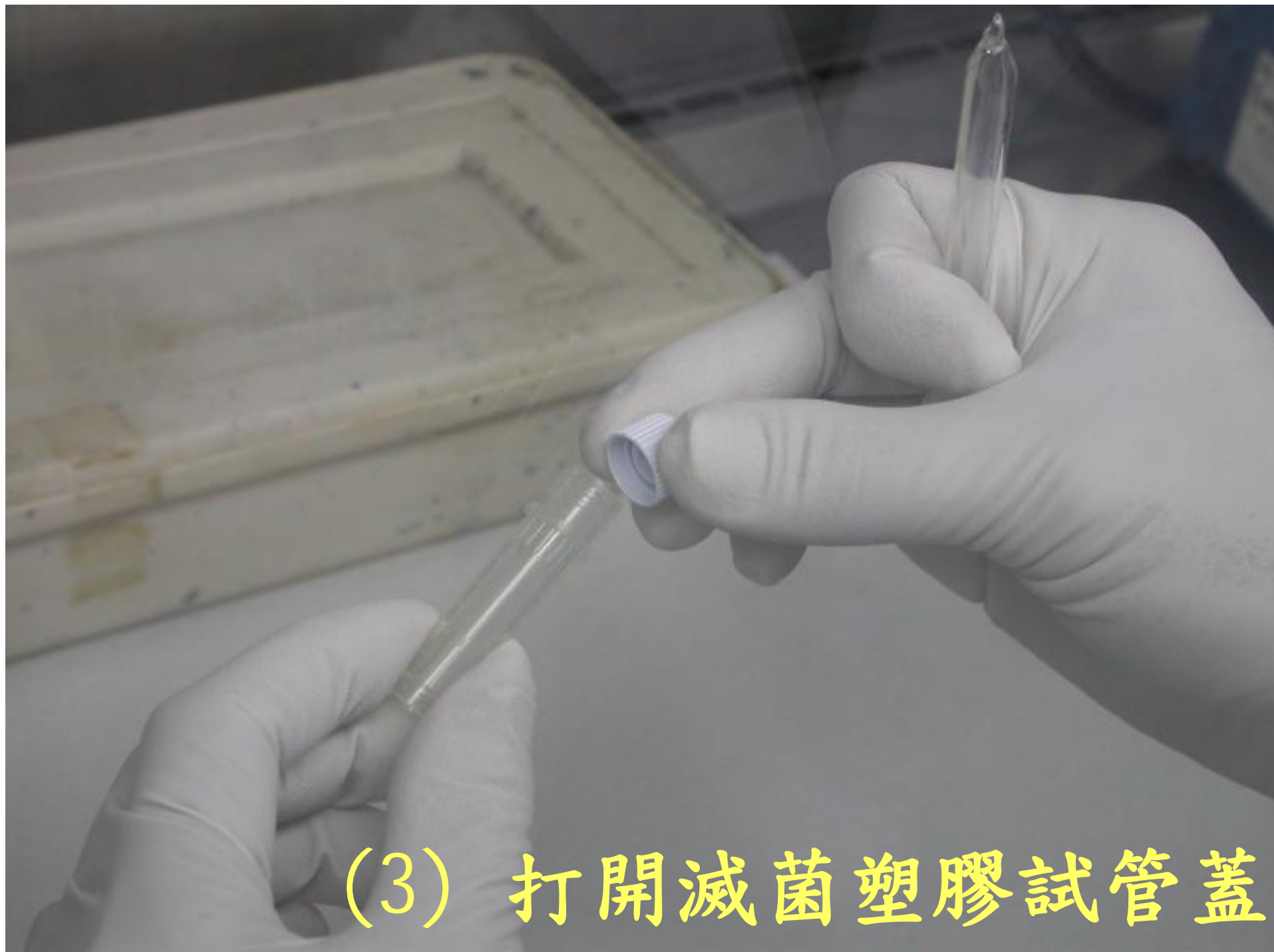
1. 手戴雙層手套(手術手套外加防切割手套)
2. 消毒安瓶外表
3. 在安瓶上端之適當位置以安瓶切割器割一下，切割處消毒後，安瓶插入塑膠試管，切割部位露出管口，再取一支塑膠試管套在安瓶上端使安瓶切割部位介於兩支試管之間，安瓶覆蓋數層滅菌紗布後放入塑膠袋，手在塑膠袋外面，兩手握試管輕輕用力一折安瓶就斷
4. 慢慢注入滅菌蒸餾水或緩衝液溶解內容物。避免產生氣泡

(1) 安瓶切割

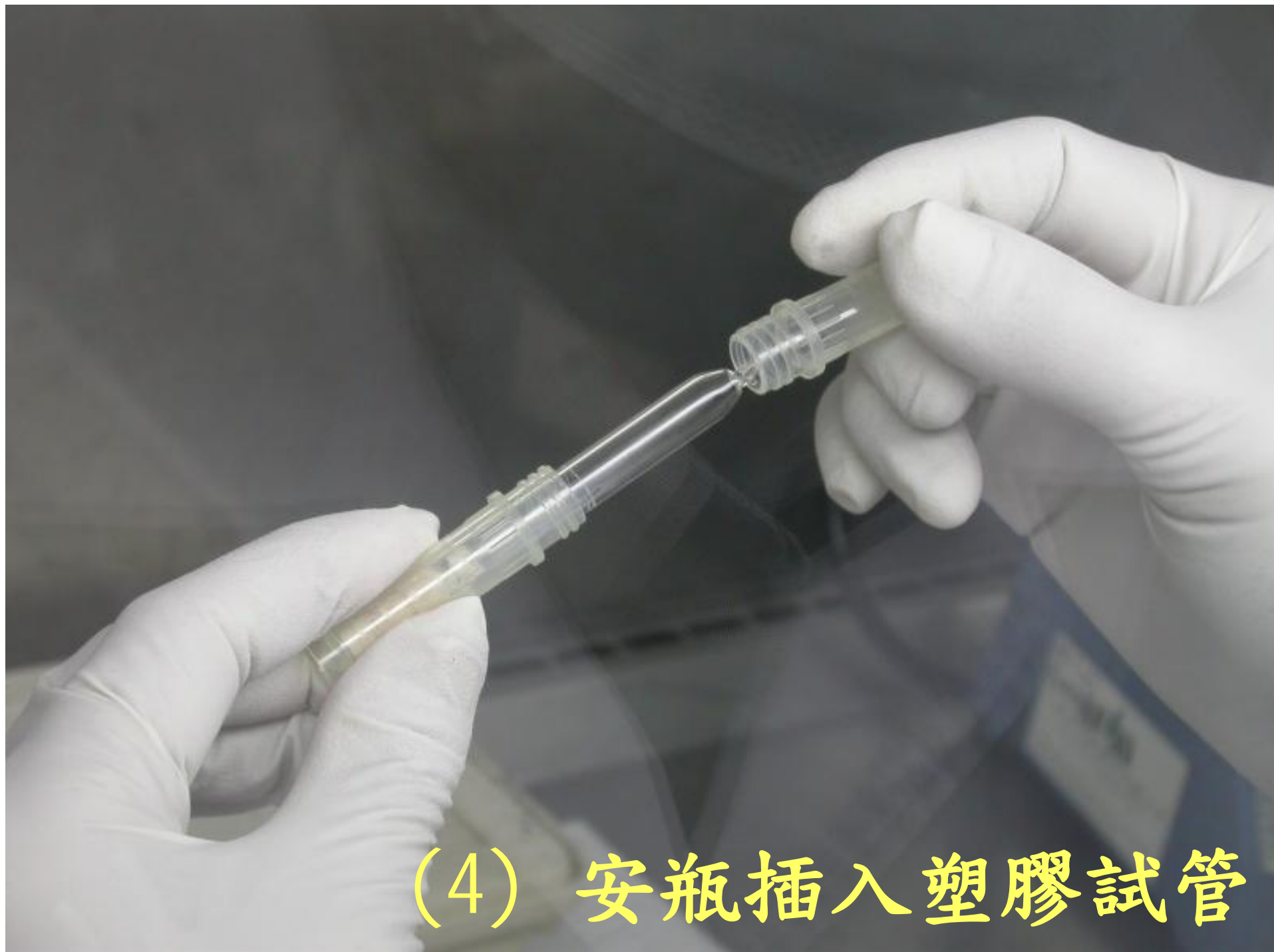


(2) 切割好之安瓶



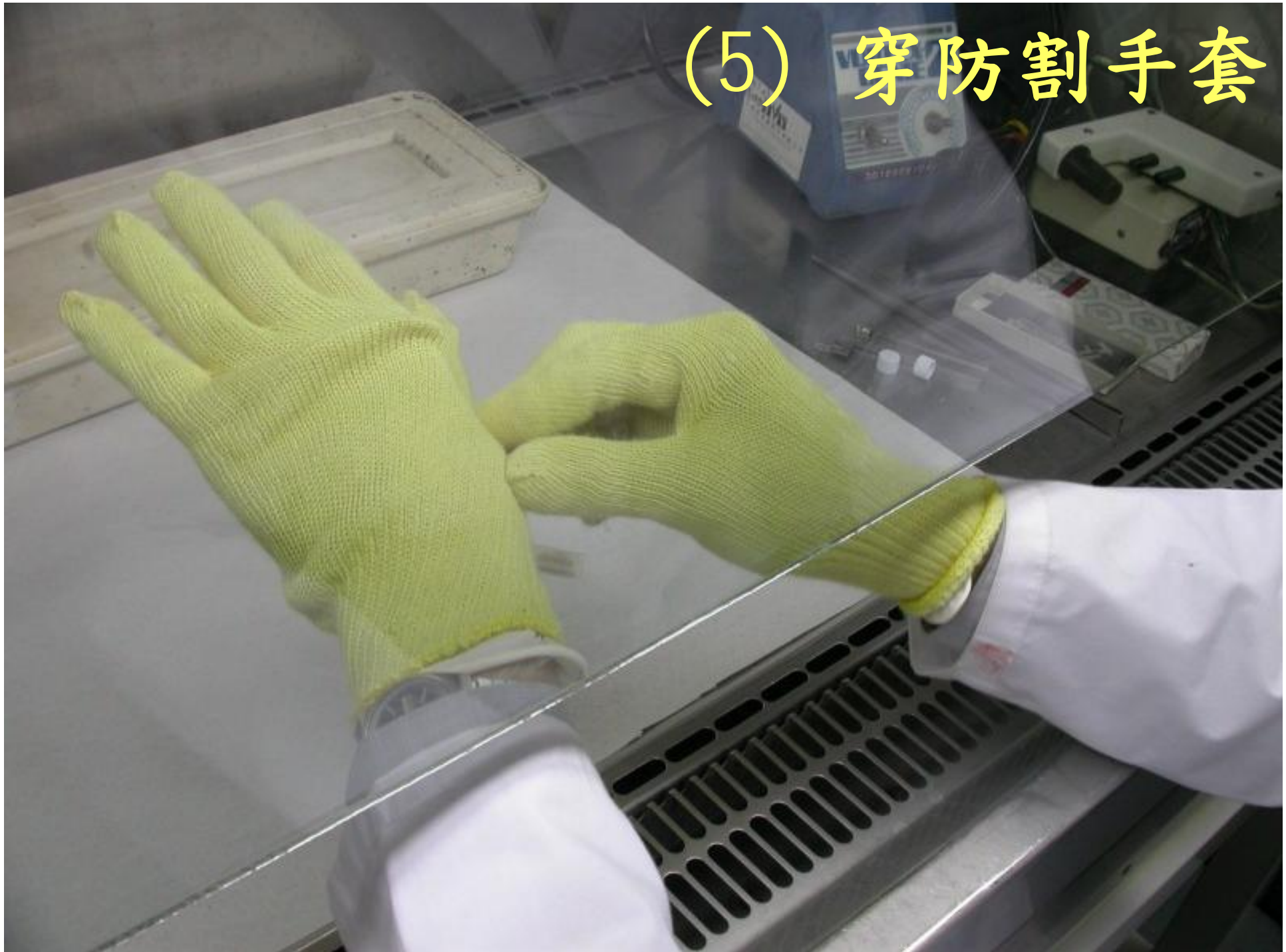


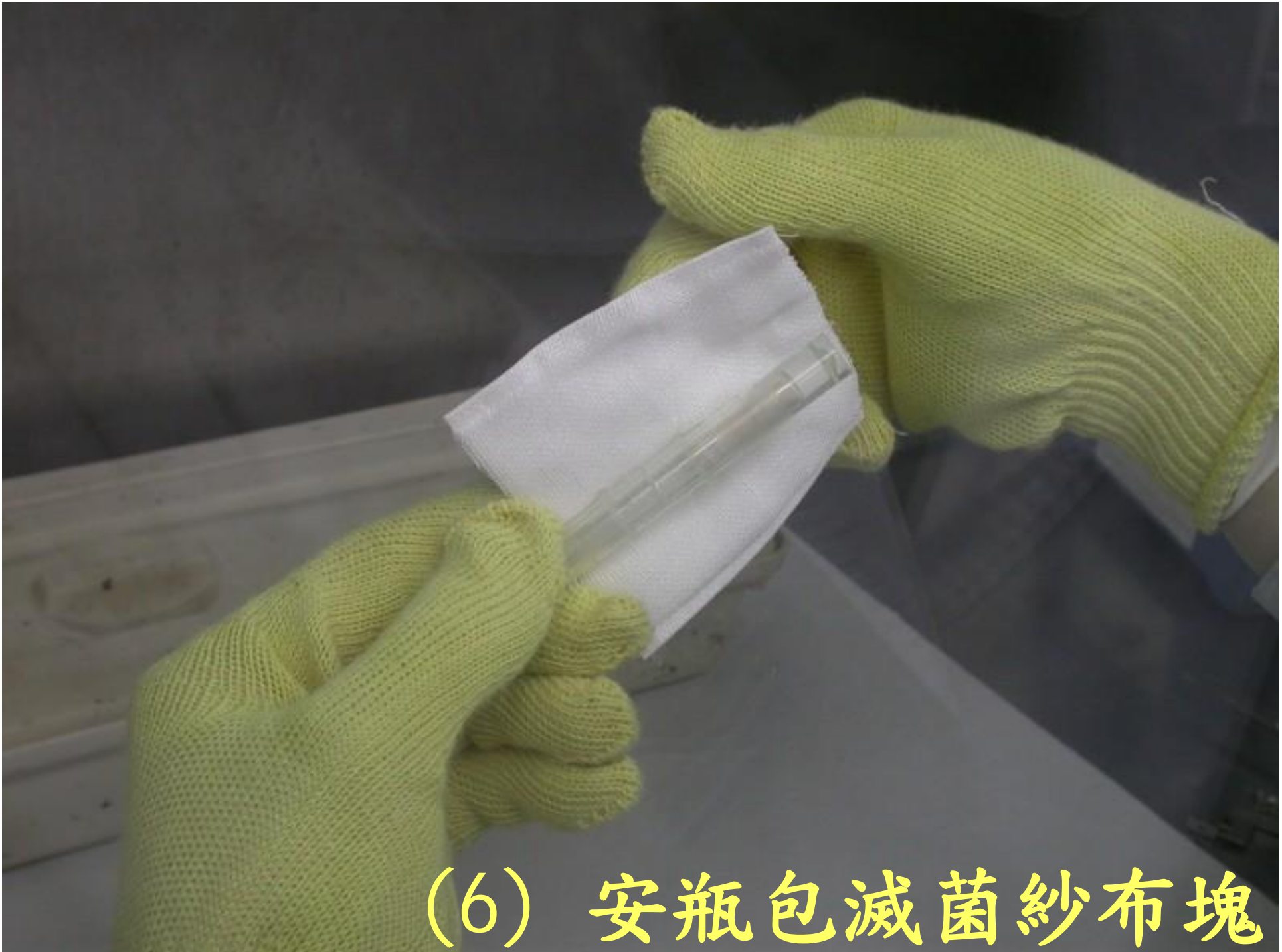
(3) 打開滅菌塑膠試管蓋



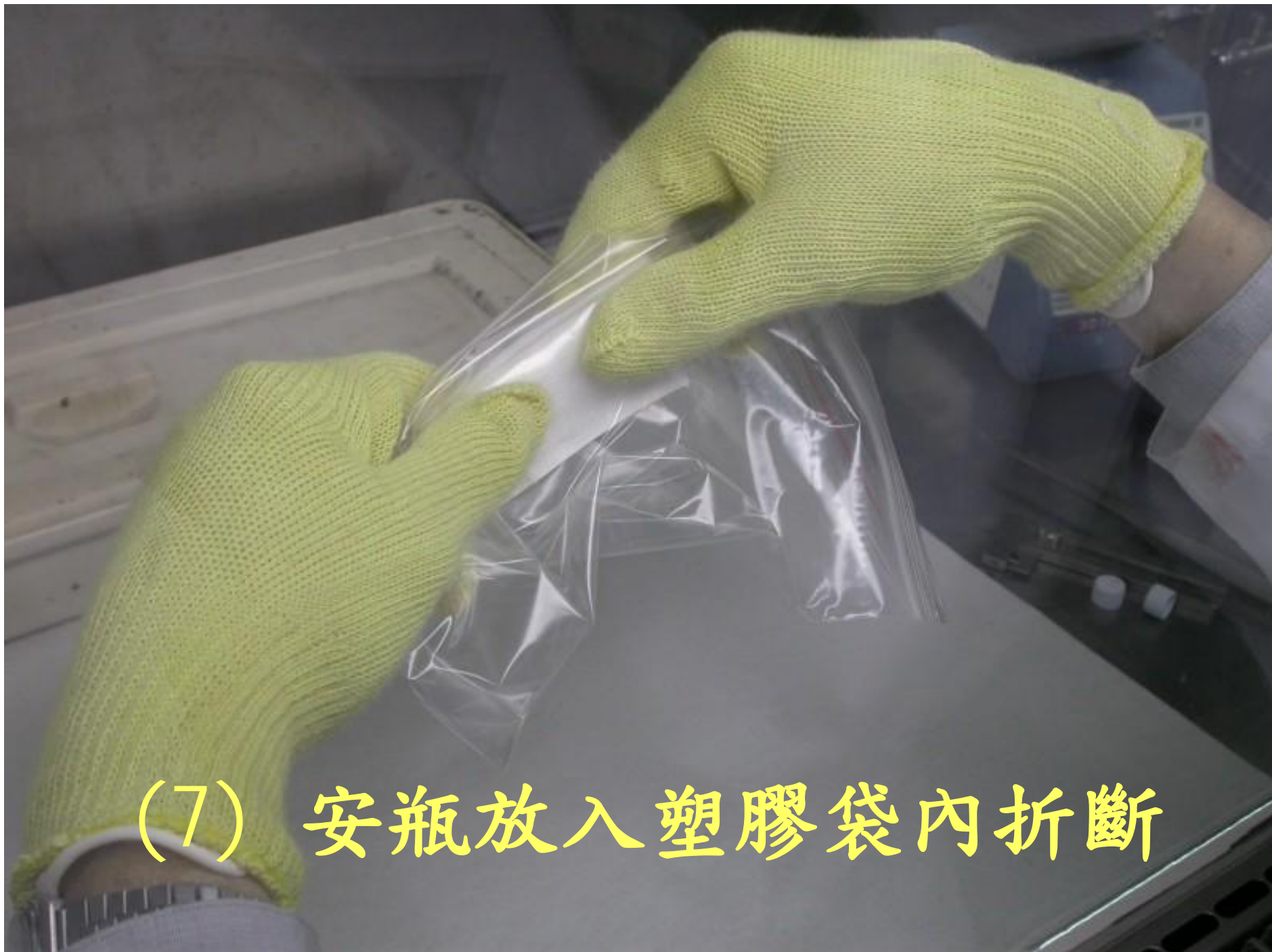
(4) 安瓶插入塑膠試管

(5) 穿防割手套



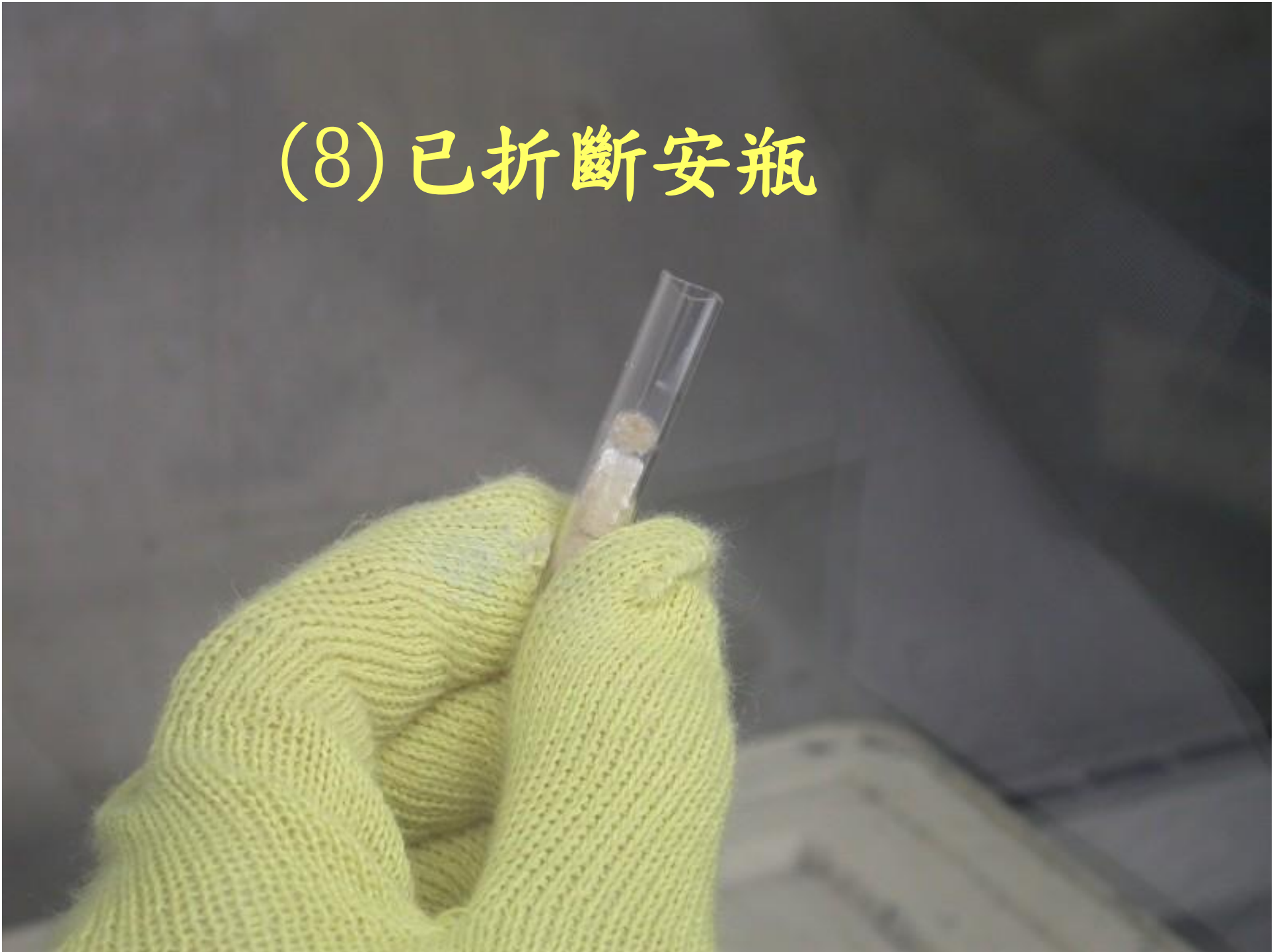


(6) 安瓶包滅菌紗布塊



(7) 安瓶放入塑膠袋內折斷

(8) 已折斷安瓶



開檢体管子及內容物之抽取

1. 開檢体管子及抽內容物要在BSC內操作
2. 戴手套、眼、粘膜之保護
3. 工作衣前面再加圍兜(Apron)
4. 拔塞子要以滅菌棉或滅菌紗布覆蓋上面再拔出

錄自 C.H.Collins&D.A.Kennedy 所著的
Laboratory-acquired Infections

注射筒抽取瓶裝液體
產生氣膠狀況

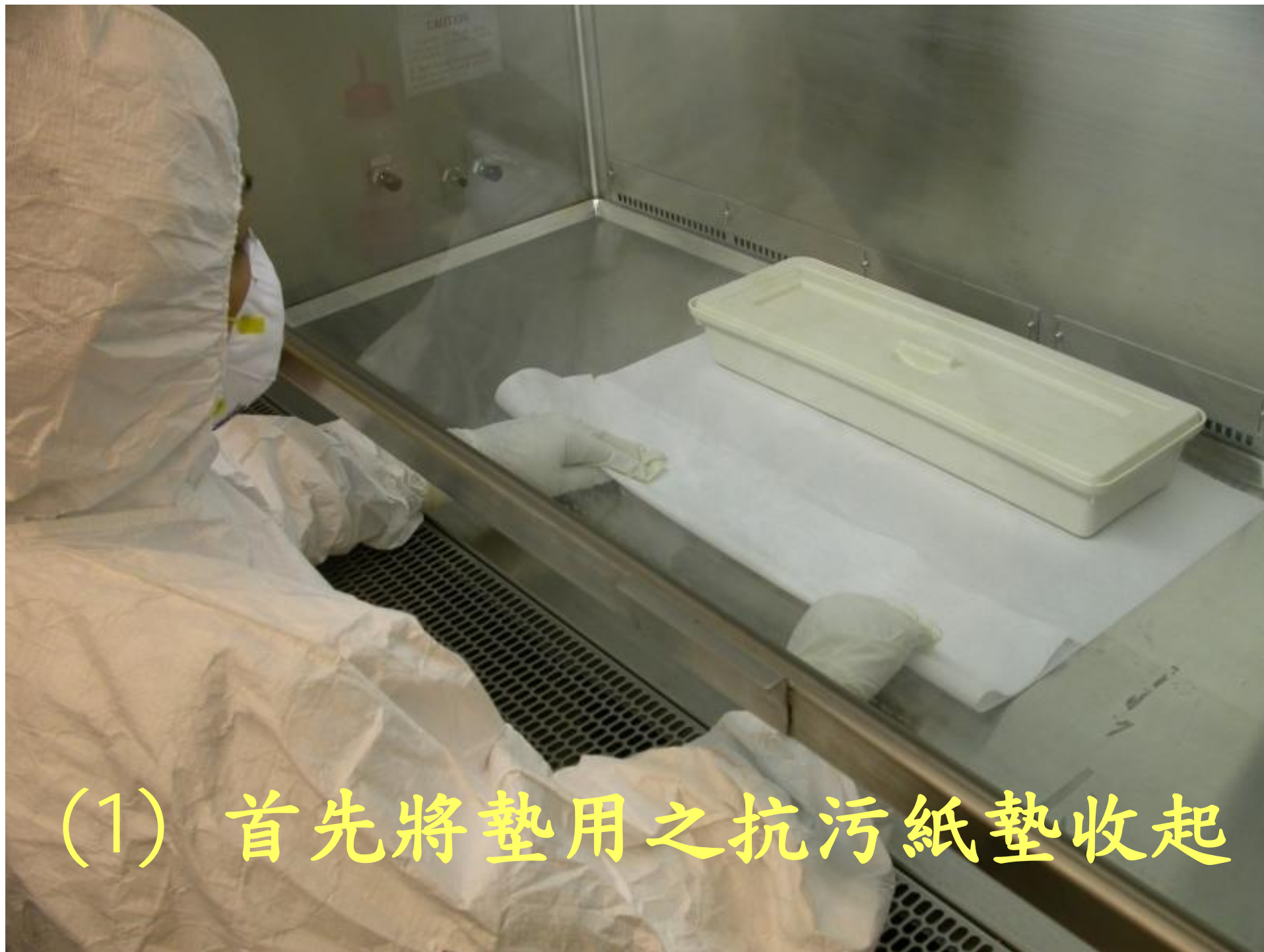
生物安全櫃(感染性物)污染之處理 (I)

1. 生物安全櫃保持運轉
2. 先以厚紙巾或吸水性良好之抹布覆蓋污染處
3. 消毒液傾注於覆蓋紙巾上
4. 以電話向實驗室負責人及生物安全管理人報告
5. 30分鐘後，清除紙巾及破裂物(玻璃片用鑷子夾取，細碎片用刷子處理)，廢棄物置入生物安全櫃內之棄物容器內
6. 用浸消毒液厚紙巾擦拭污染區域二次，不可用手直接擦拭，擦拭時由週邊外圍向內擦
7. 十分鐘後用清水擦拭

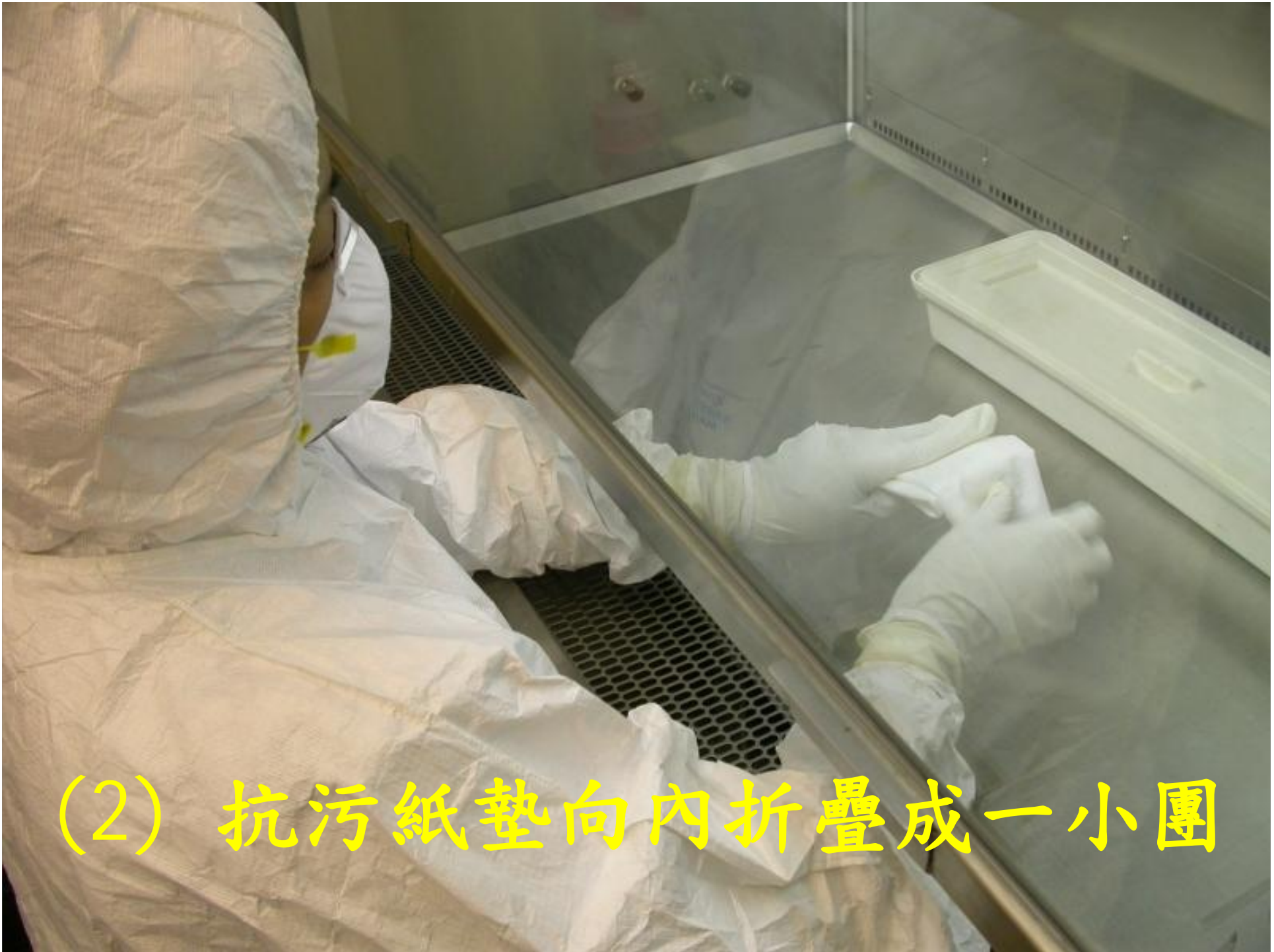
生物安全櫃(感染性物)污染之處理 (II)

8. 更換外層手套，脫下之手套放入生物安全櫃內之棄物容器內
9. 先打開高壓滅菌鍋門
10. 廢棄物連同容器送進高壓滅菌鍋滅菌
11. 滅菌過之廢棄物處理
12. 填寫意外事件處理報告書，呈報實驗室負責人及生物安全管理委員會

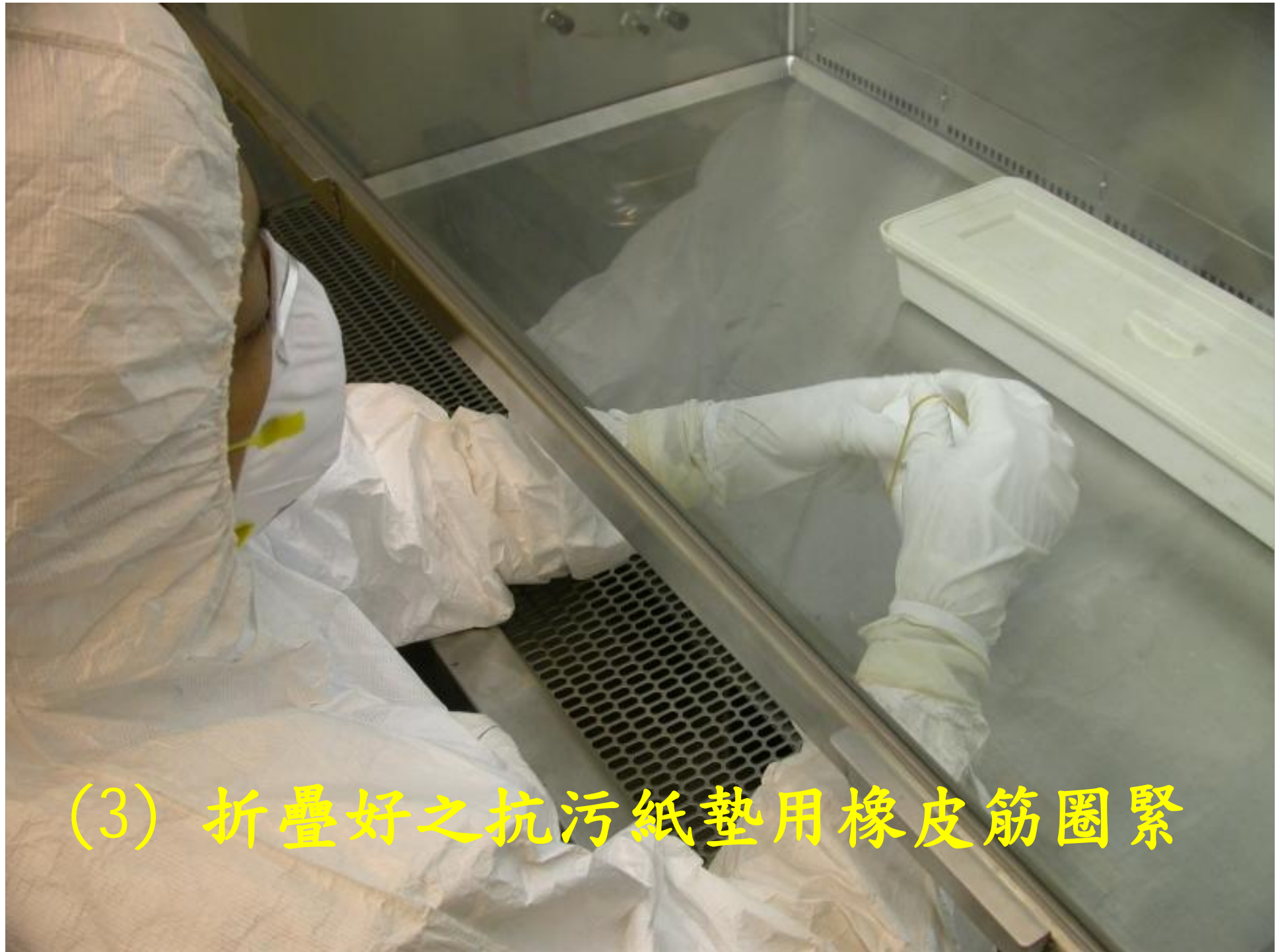
以上之處理限用於生物安全櫃內之少量污染處理，如果是大量的污染，人員必須盡速離開實驗室(生物安全櫃不可停止運轉)，張貼警示標誌，並報告實驗室負責人及生物安全業務主管，由生物安全委員會指派專人處理。



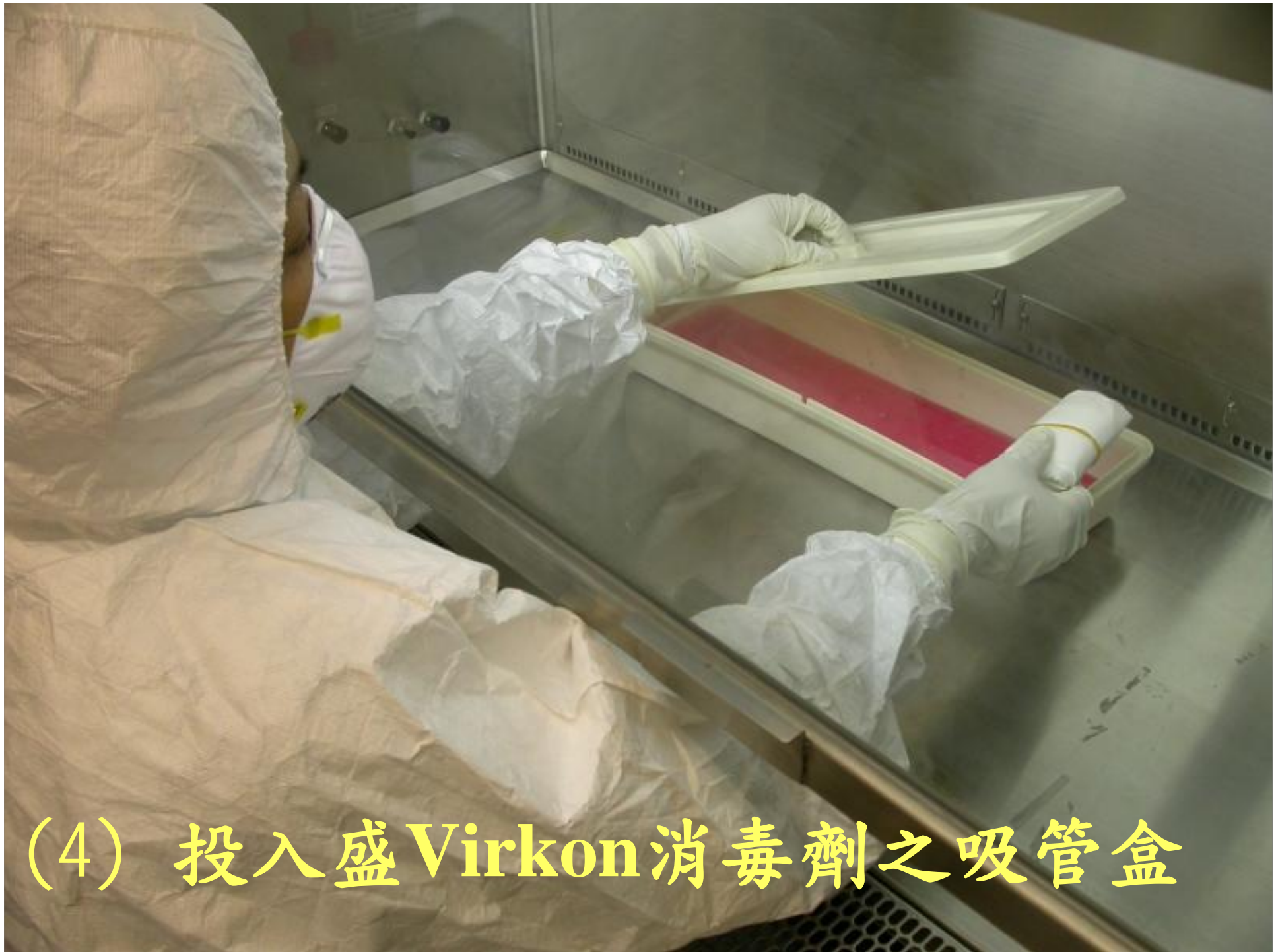
(1) 首先將墊用之抗污紙墊收起



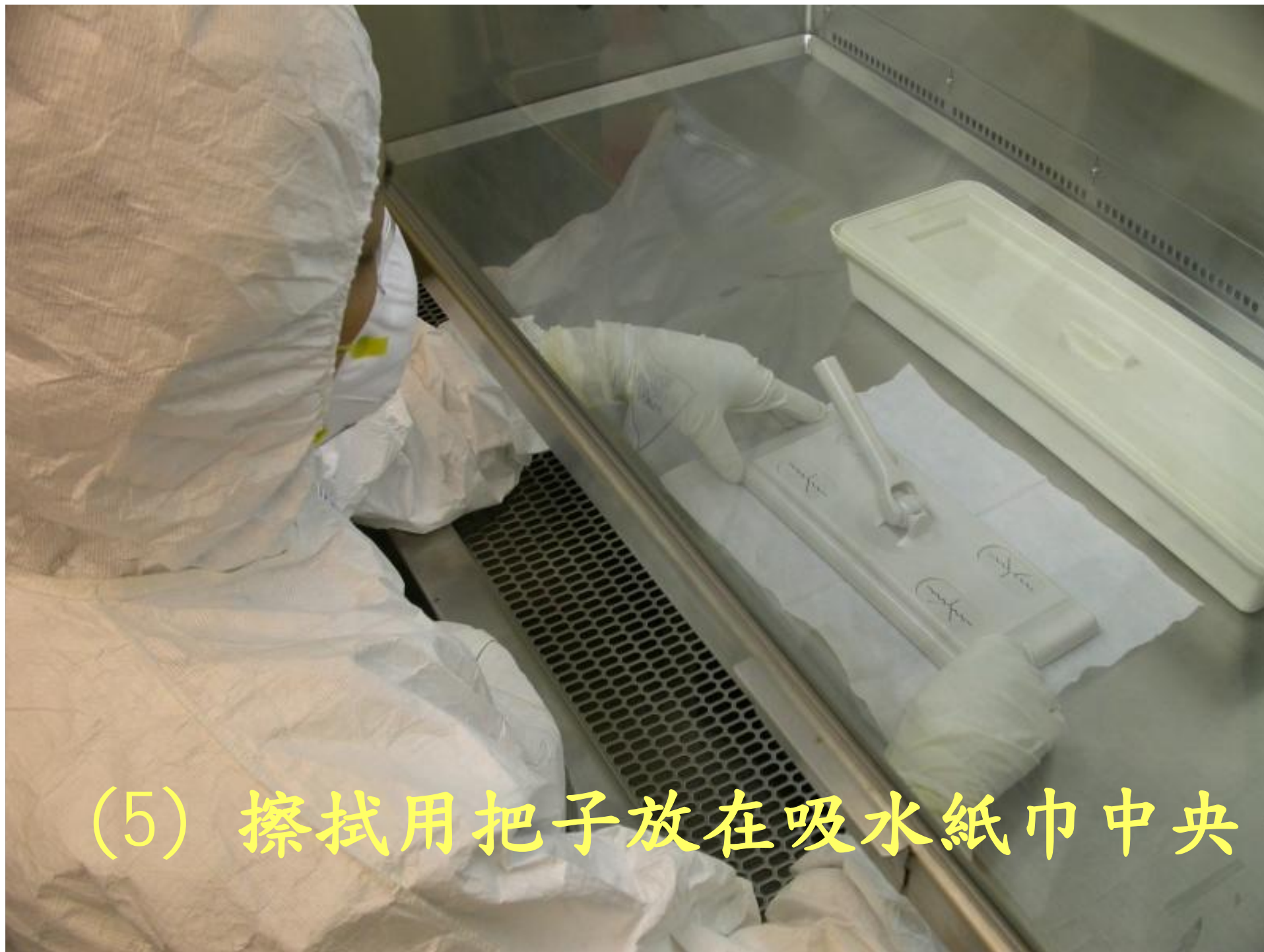
(2) 抗污紙墊向內折疊成一小團



(3) 折疊好之抗污紙墊用橡皮筋圈緊



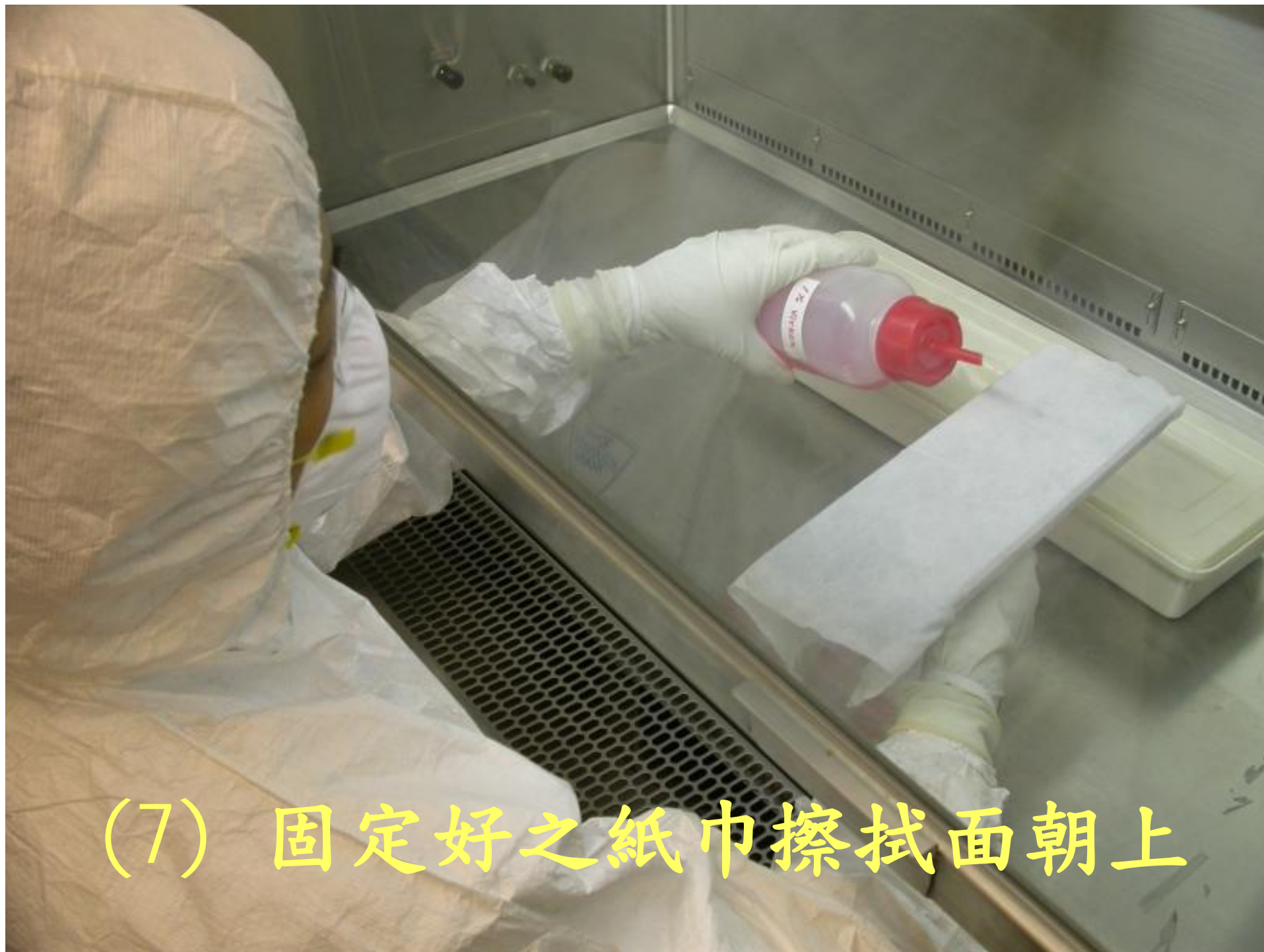
(4) 投入盛Virkon消毒劑之吸管盒



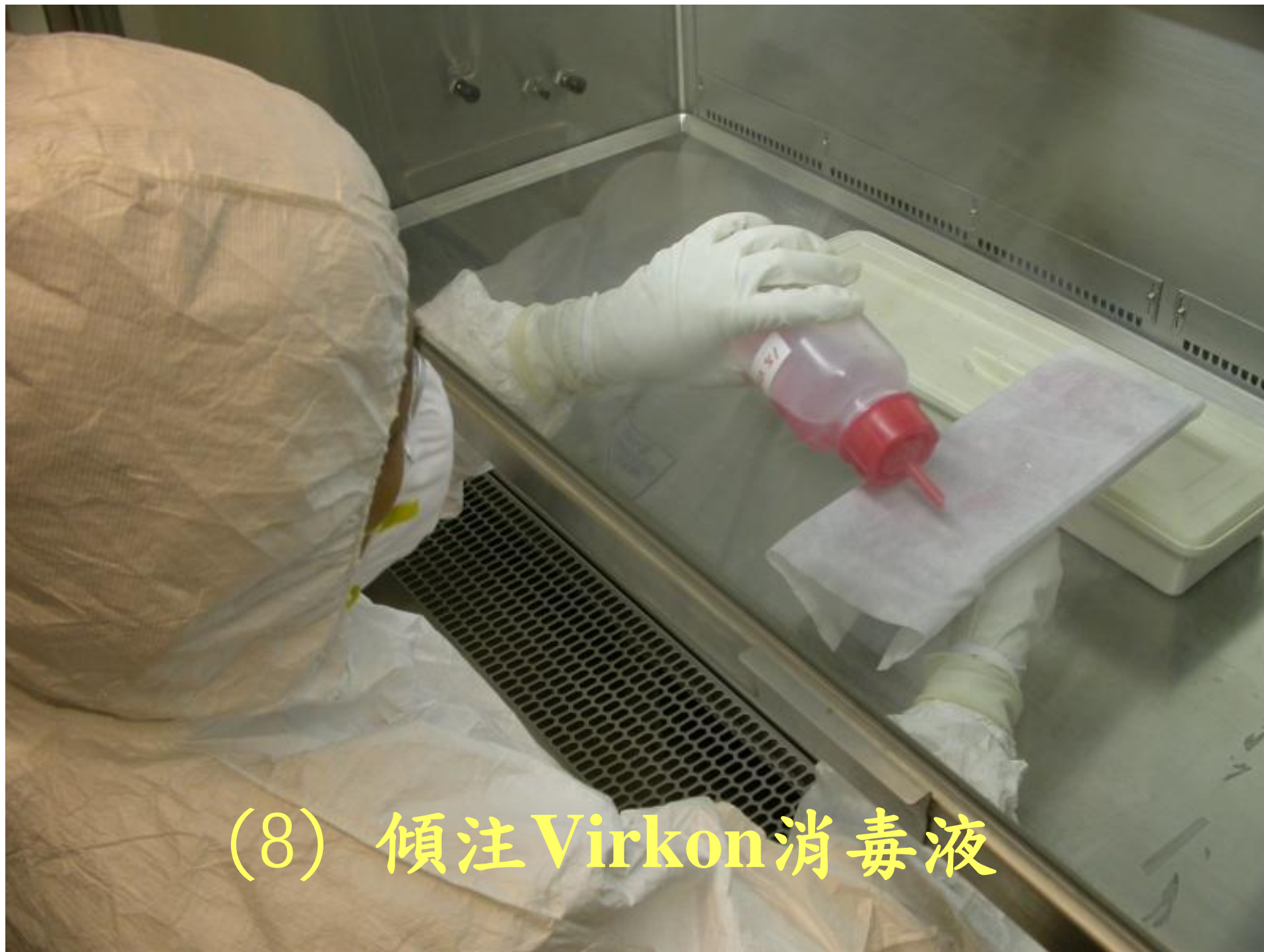
(5) 擦拭用把子放在吸水紙巾中央



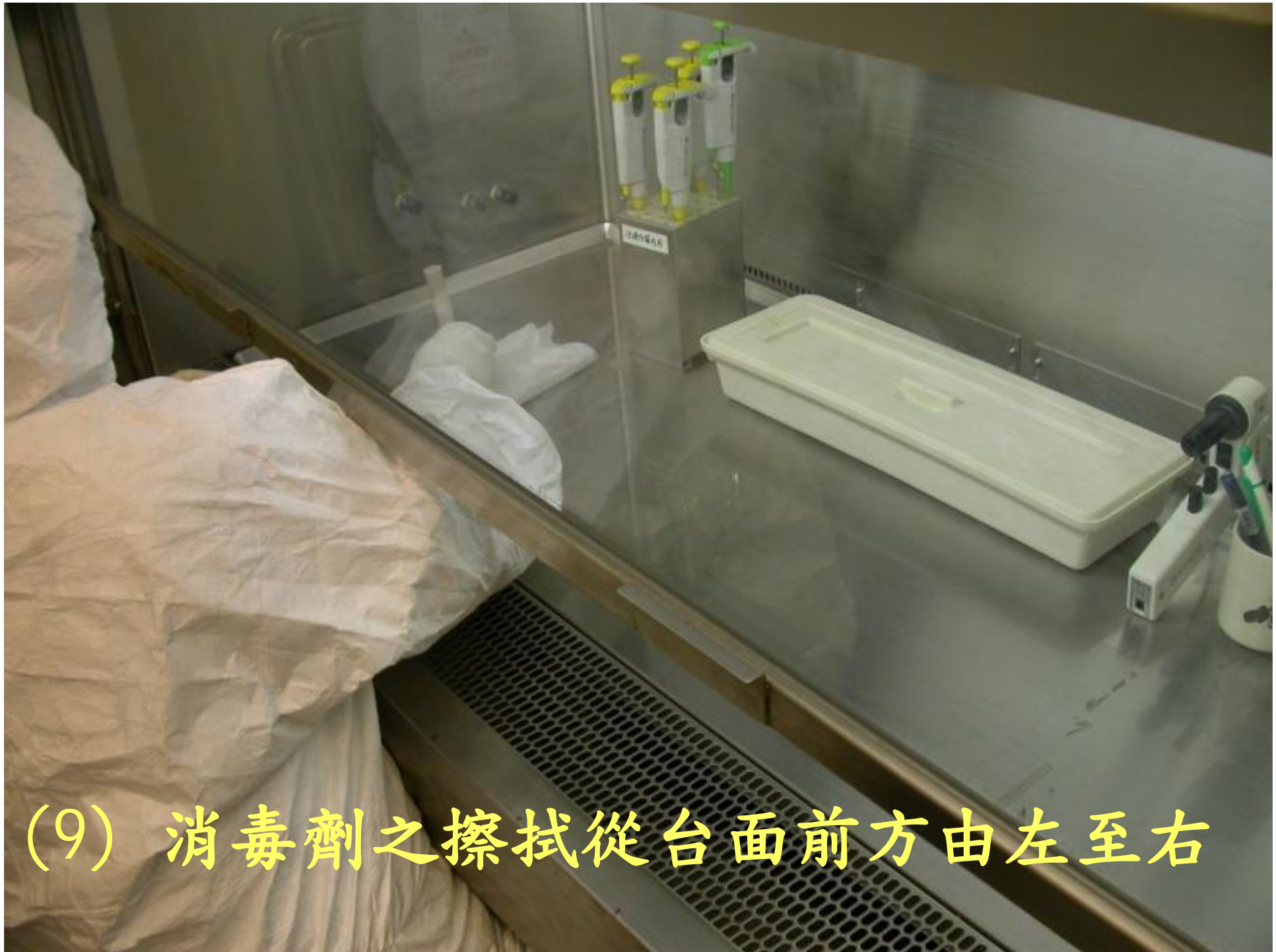
(6) 紙巾固定於把子上



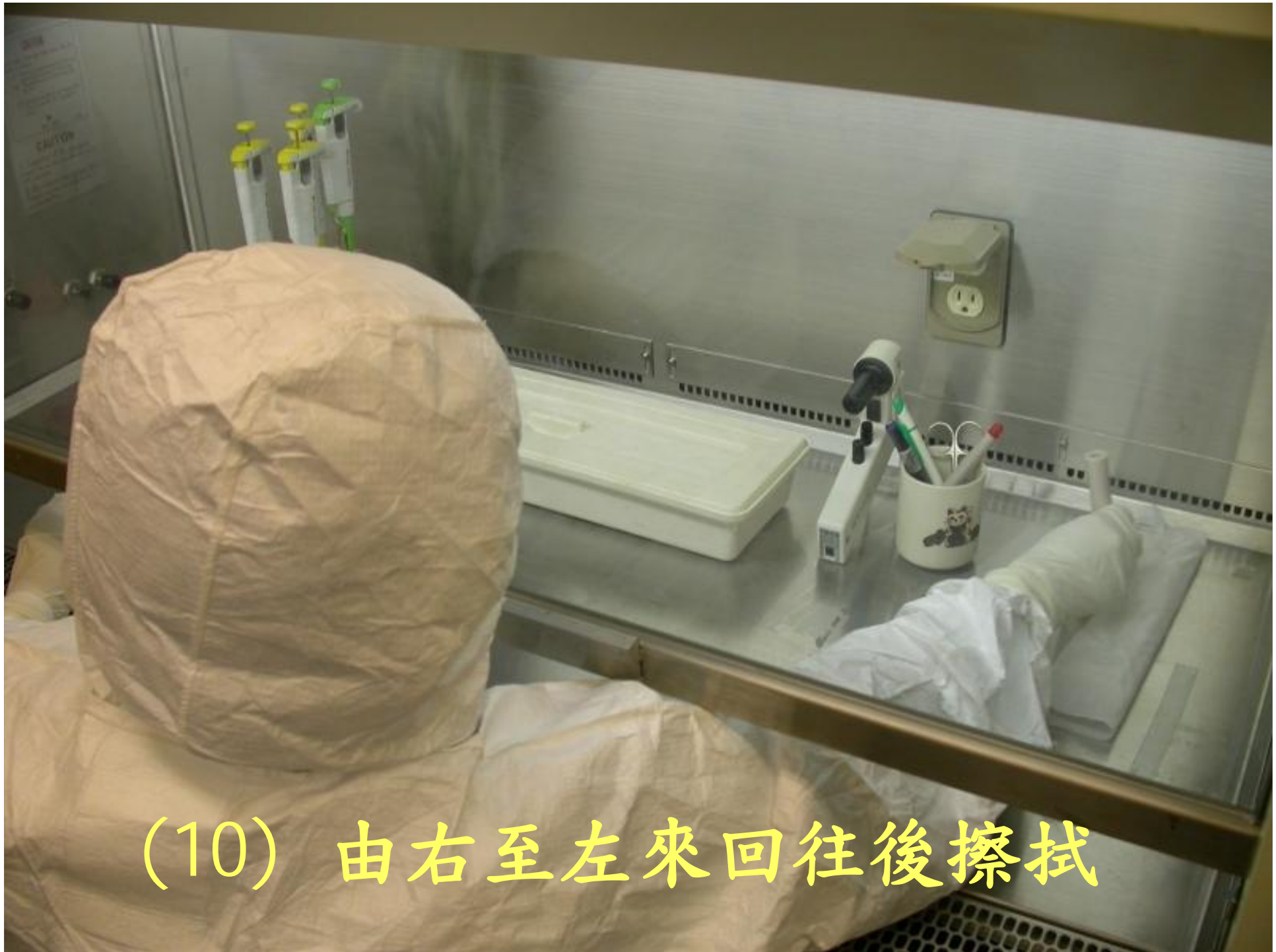
(7) 固定好之紙巾擦拭面朝上



(8) 傾注Virkon消毒液



(9) 消毒劑之擦拭從台面前方由左至右



(10) 由右至左來回往後擦拭



(11) 消毒劑擦拭後待數分鐘把子換
紙巾, 傾注蒸餾水



(12) 蒸餾水擦拭



(13) 擦拭過之紙巾棄入盛消毒劑之吸管盒



(14) 把子收入不鏽鋼盒內

選購生物安全櫃應考慮之事項 (I)

1. 要使用於操作那一危險等級之病原體
2. 該廠牌之生物安全櫃是否通過國家或國際公認單位之認證（請其提供認證之文件）
3. 代理商是否有訓練合格之維修工程師（提供證照影本）
4. 該廠牌生物安全櫃之排氣HEPA裝設位置（側面或上方）
5. 該廠牌生物安全櫃的高度（含角架之高度）
6. 欲安裝之實驗室樓層的天花板高度
7. 排氣HEPA是否加裝排氣管（硬接法或是Canopy接法，測試孔位置）

選購生物安全櫃應考慮之事項（II）

8. 該廠牌生物安全櫃的風扇馬達是單一或兩只，馬達轉速是可變速還是固定
9. 排氣HEPA之厚度（15cm，29.2cm）
10. 應要求安裝後之現場測試
11. 欲安裝生物全櫃之實驗室空間是否足夠
12. 實驗室空調冷氣量是否足夠
13. 實驗室HEPA裝設位置
14. 實驗室設計是否適合作生物安全櫃的燻蒸消毒