



實驗室生物安全(2)

優良微生物技術及生物保全

黃瓊瑰

衛生署疾病管制局 生物安全專家委員

林口長庚病理科 技術主任

長庚大學生技系 講師



內容大綱

■ 病患檢體常見之感染源

■ 優良微生物技術

■ 實驗室內檢體的安全處理

■ 實驗室設備操作之注意事項

■ 生物保全



生物安全

臨床實驗室是一高危險的工作環境，工作人員經常接觸的各種病患檢體可能含有高感染性的 **HBV**、**HIV**、**HCV**、**TB** 等感染源

Table 1. Epidemiologic Statistics for Healthcare Workers and General U.S. Population (Adapted from CDC, *Guidelines for Infection Control in Health Care Personnel*; 1998, and CDC, NCID Division of Viral and Rickettsial Diseases; 2000.)

Group at Risk	Statistics	HBV	HCV	HIV
Healthcare Workers (8 - 9 million)	New cases per year*	800 - 1000 [†]	500 - 1000 [‡]	57 in 23 yrs (since 1978)**
	Deaths per year*	100-200 [†]	Unknown	Unknown
	Total infected*	Unknown	80 000 - 180 000 [§]	57 documented cases 139 possible cases
U.S. Population in General (250 - 300 million)	New cases per year	78 000 [#]	25 000 [#]	42 651 ^{††}
	Deaths per year	5000 [#]	8000 - 10 000 [#]	16 371 ^{‡‡}
	Total infected	1.25 million [#]	2.7 million [#]	830 274 ^{††}

* Occupationally acquired.



血液中的致病源

■ 檢體中會造成人體感染之致病源包括

■ 肝炎病毒(HAV, HBV, HCV, HDV, HEV, HGV)

■ 反轉錄病毒(HIV-1,2 SIV, HTLV I/II)

■ 傳染性海棉狀腦病變 (Creutzfeldt-Jakob, Kuru)等



血液中的致病源-肝炎病毒

HBV

HBV 存在血液中之濃度為 10^8 to 10^9 infectious particles /mL。

由於血液中含量濃度高，因此為傳染力最強的致病源，依照防護HBV感染的策略即可預防HIV及HCV。

HBV常在之檢體包括 blood, semen, urine, peritoneal fluid, cerebrospinal fluid, saliva, tissue and blood products。

HCV存在血液中之濃度 10^2 to 10^3 particles/mL。



血液中的致病源-反轉錄病毒

HIV 存在血液中之濃度 10^0 to 10^4 infectious particles /mL。

HIV 常存在之檢體包括 blood, semen, vaginal secretions, saliva, tears, breast milk, cerebrospinal fluid, amniotic fluid, alveolar fluid, and urine。

HTLV I/II 存在於淋巴球中，藉由 breast milk、semen、vaginal secretions 及 blood 傳染。



血液中的致病源感染途徑-直接接觸

皮下侵入：包括污染的注射針筒刺傷，刀片割傷，此途徑感染率高

■ HBV 感染率約6% ~30%，平均18%

■ HIV感染率約0% ~ 0.9%，平均0.4%

■ HCV感染率約 0 ~ 7 %，平均3.5%。

皮膚傷口接觸：長時間的接觸，比較可能會由皮膚滲入感染。

黏膜接觸：體液污染眼睛，口，鼻。

HIV或HBV皮膚接觸後是否感染與下列因素有關：

■ 病毒濃度

■ 接觸時間

■ 皮膚是否有傷口

■ 受污染者之HBV免疫狀況



血液中的致病源感染途徑

間接接觸：非直接接觸到體液，而是HBV附著於電話，試管，檢驗儀器上，因不良的工作習慣，如吃東西，咬指甲，吸煙等，造成黏膜接觸感染，HIV及HCV尚未証實有此途徑感染

糞口傳染：主要為HEV及HAV或其他腸道傳染之NANB virus

空氣傳染：離心或打開蓋子會造成aerosol，而侵入呼吸道，黏膜



血液中的致病源

HBV/HIV環境的存活

HBV 在乾燥的血液於室溫下，可存活至少7天。

HIV 在乾燥的血液於室溫下，可存活幾小時。

對乾掉之血液亦應視為一般液態血液，應謹慎。

實驗室使用之接觸血/體液之各類儀器設備等應定期消毒。



內容大綱

■ 病患檢體常見之感染源

■ 優良微生物技術

■ 實驗室內檢體的安全處理

■ 實驗室設備操作之注意事項

■ 生物保全



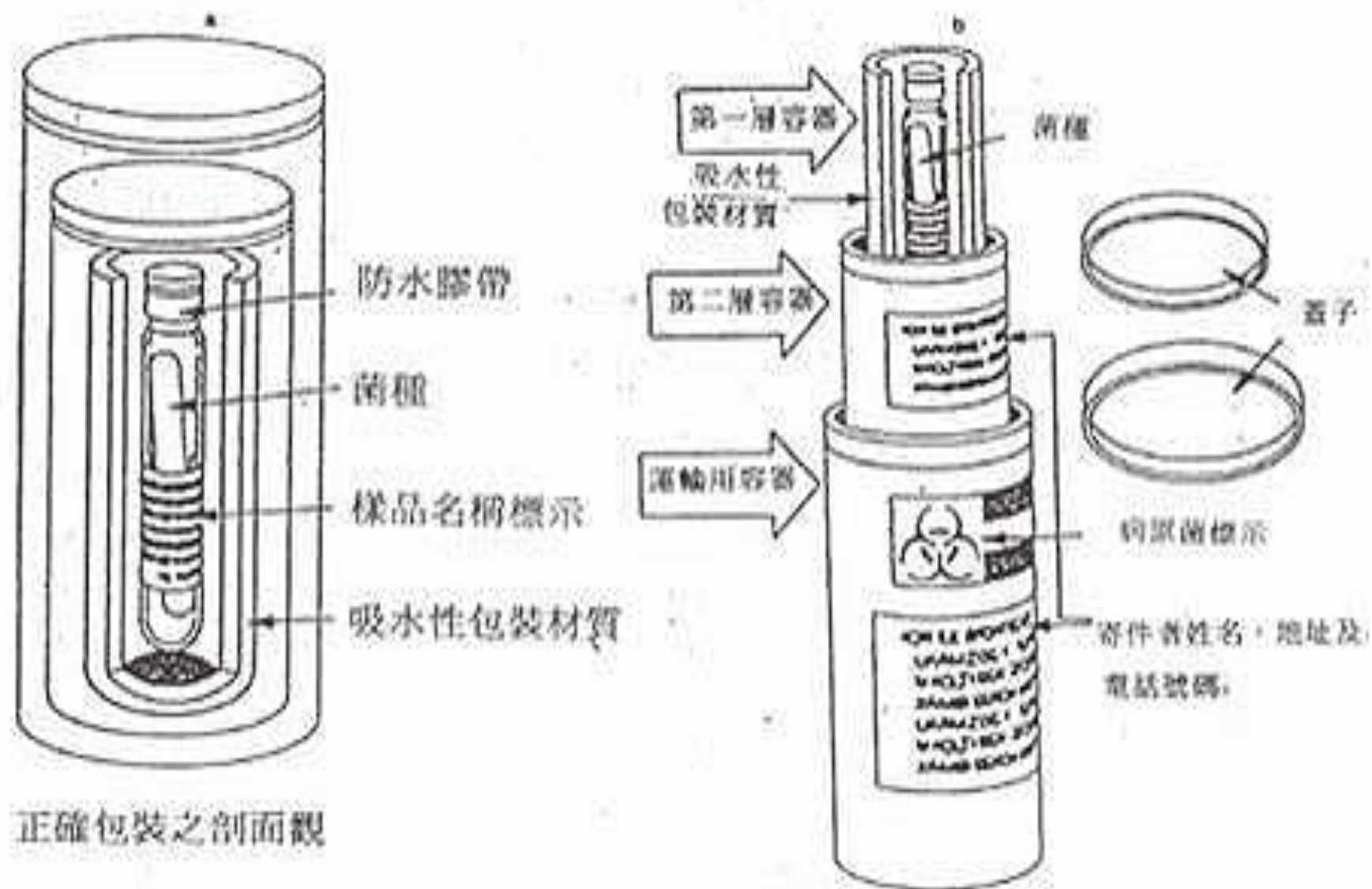
實驗室內檢體的安全處理

實驗室內檢體的不適當蒐集，傳送和處理將使工作人員暴露於感染的險境。



檢體容器

檢體的容器不可用玻璃材質，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、患者姓名、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。





行政院衛生署疾病管制局

Centers for Disease Control, R.O.C. (Taiwan)

P620-感染性檢體運送包裝





實驗室內檢體之傳送

為避免意外的洩漏或溢出，檢體要**直立**在試管架上再放入第二層容器內(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。





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體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。



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**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。



行政院衛生署疾病管制局

Centers for Disease Control, R.O.C. (Taiwan)

實驗室設備操作 之注意事項



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體
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，接口有沒有棉花堵塞，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



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



(7)使用注射器抽取感染性液體



(8) 排除空氣



(9)排除空氣



(10)使用鑷子套回針頭蓋



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，留置一段相當的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



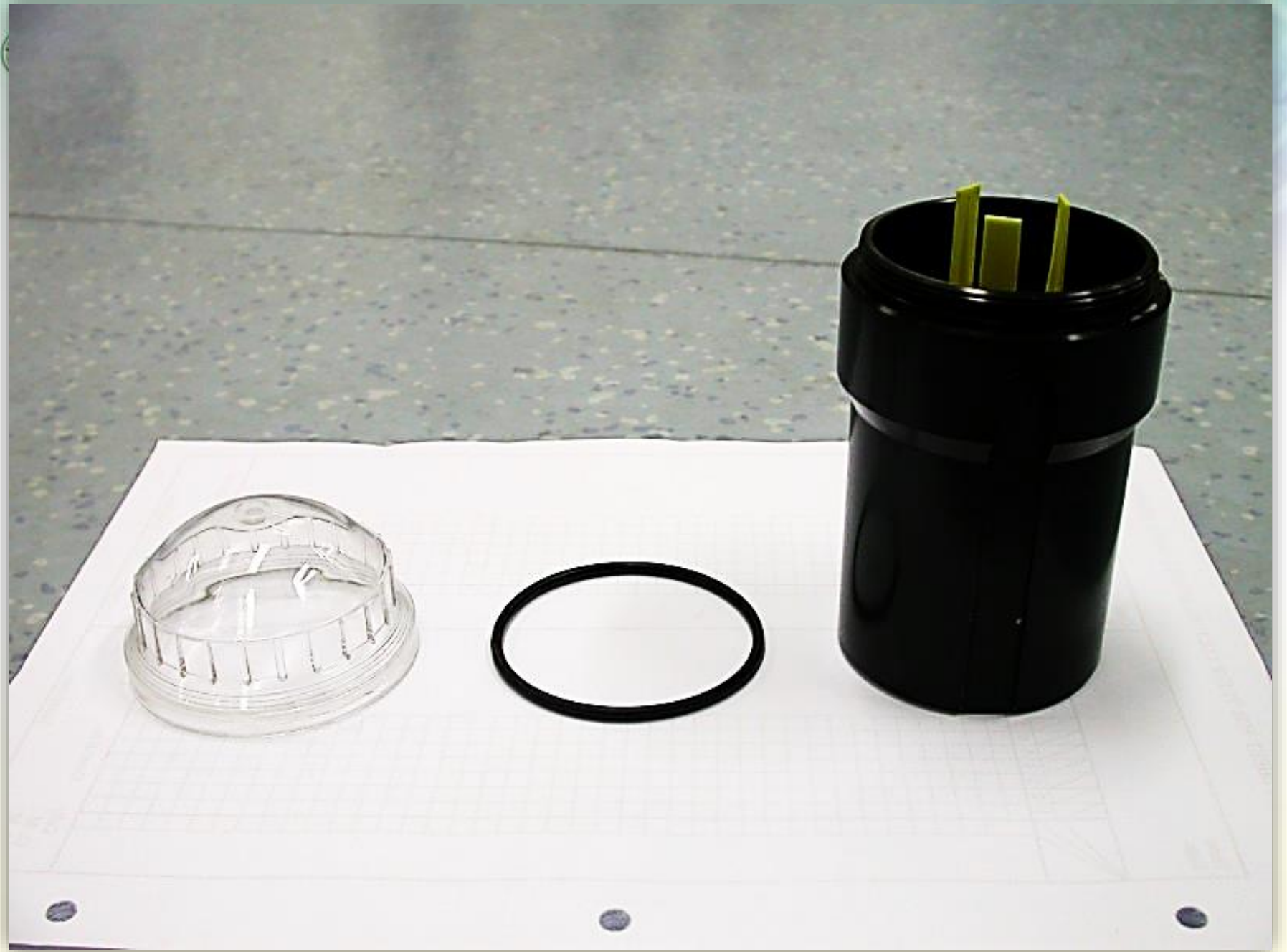
離心機之使用 (I)

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. 離心管及檢體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能耐你所要的離心力及轉速
6. 離心管之檢體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. 檢體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，放好檢體後確實稱重平衡



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. 離心危險第三及第四等級之病原體必須用有氣密蓋之安全離心管套
13. 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
14. 每日檢視轉子及離心管套是否有腐蝕或線狀龜裂
15. 每次使用後離心管套、轉子及離心機腔室要作清消
16. 離心時轉速不可加速太快



氣密離心套管



離心套管正確擺放



離心管錯誤擺放



高壓蒸氣滅菌鍋

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. 物品送入鍋內前先確認另一端之鍋門已關緊。
6. 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。
7. 排氣過濾/安全閥檢查/定期清洗/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消毒劑(例如維康粉約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. 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
2. 操作完畢容器要在BSC內靜置一段時間才能打開
3. 使用Vortex混合感染性液體時，手應執於液面上適當之高度處液體才不會衝到蓋子
4. 使用音波振盪器操作人員的聽力要加以保護
5. 塑膠容器(PTFE)特別受推崇，因為玻璃可能破裂而釋放出感染性物因而傷到操作人員



(5) 感染性液體混合之試管手持法



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持溫度之穩定
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. 易燃性液體不可以存放在冰箱(櫃)內
7. 冰櫃內保存物必須列清單保存
8. 超低溫冰櫃需加鎖且專人管理



玻璃及尖銳物

1. 盡可能以**塑膠製品**替代玻璃品，只有 **Borosilicate glass** 可以用，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(有感染性液體)之空氣，針頭必須置入內塞棉花之滅菌小試管，注射筒才緩緩推出空氣



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，因內容物可能是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. 消毒安瓶外表
2. 手戴雙層手套(手術手套外加防切割手套)
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，安瓶置入塑膠試管，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



生物保全

“實驗室生物保全”則是指研究機構及個人用來防範病原體或毒素遺失、被竊、濫用、轉移或有意釋出而採取之安全措施。

實驗室生物保全活動應能代表研究機構之不同需求，必要時應由科技主任、主要研究人員、生物安全官、實驗室工作人員、後勤維護人員、行政人員、資訊技術人員，以及執法機構與安全工作人員來參與。



生物保全計畫

每個研究機構都必須根據設施需要、實驗室工作類型以及當地狀況等來制定及實施特殊實驗室生物保全計畫。

實驗室生物保全計畫

- 生物體之類型
- 其物理位置
- 接觸生物體之人員資訊



生物保全計畫

物品清單及儲存位置

進入人員之識別資料

使用敘述

設施內及設施間進行內部或外部運送之紀錄

對材料進行任何無活化及 / 或丟棄情況之紀錄



生物保全計畫

違反保全事件

■ 實驗室生物保全之違規情況

■ 物品清單結果之差異

■ 應明確規定公共衛生及保全當局在違反保全事件發生時之介入程度、角色及責任。



生物保全訓練

- 所有人員都應接受實驗室生物保全訓練。
- 協助工作人員理解保護這些材料之必要性以及有關生物保全措施之原理
- 應包括複習有關國家標準及研究機構特殊規定。
- 訓練中，要呈現發生違反保全事件時，闡釋人員所擔負責任及角色之規定。



行政院衛生署疾病管制局

Centers for Disease Control, R.O.C. (Taiwan)

參考資料

實驗室生物安全手冊