

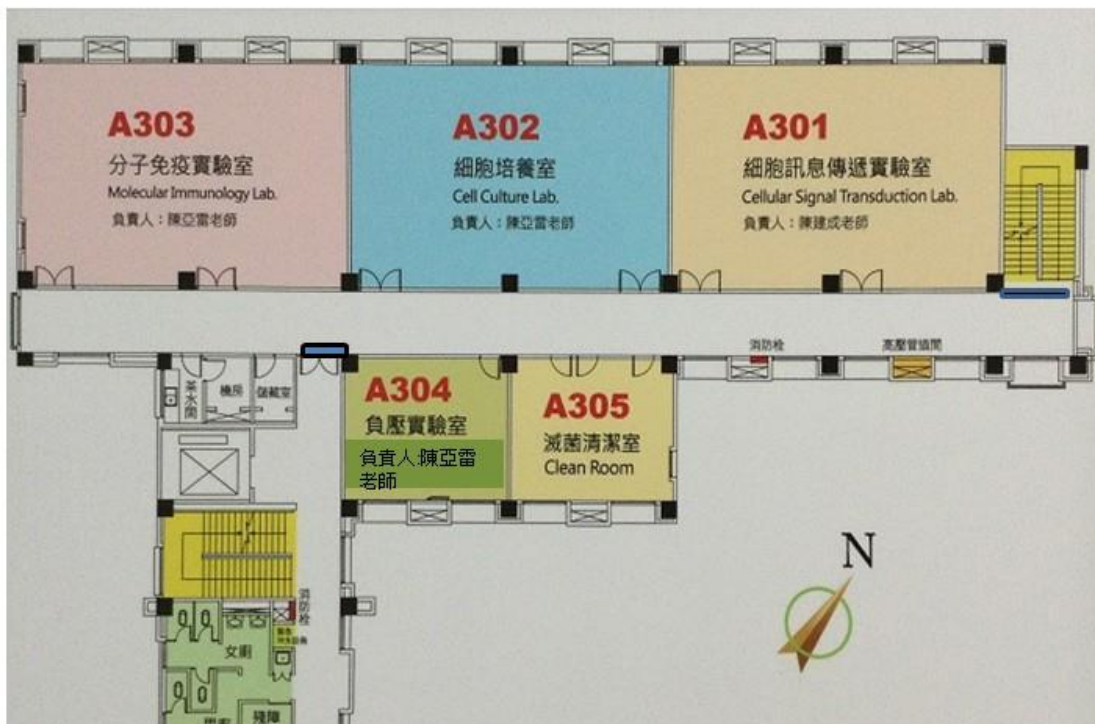
國立高雄師範大學
生物材料管制實驗室作業規範
NKNU-BT-003

1 前言

- 1.1 目的：為防範擁有生物材料的實驗室，因為人為疏失、操作失當或不正確使用器具或設備，造成實驗室意外，導致環境污染或個人的感染，訂定此操作程序，以避免或將可能的危險降至最低。
- 1.2 實驗室安全的關鍵在於工作者對工作特性的認知及良好的工作習慣
- 1.3 實驗室安全是每一位實驗室工作者的責任。為了維持安全的工作環境，每一位工作人員都需要遵守本操作程序的規定
- 1.4 本作業規範包括對實驗場所之範圍、人員與物品的流動路線、實驗室的設施、設備與空間(附配置圖說明)使用的規範
- 1.5 本作業規範說明實驗室使用之物理性與生物性防護與安全操作裝置的使用文件的規範
- 1.6 本作業規範說明對周遭環境安全保護措施與文件的規範

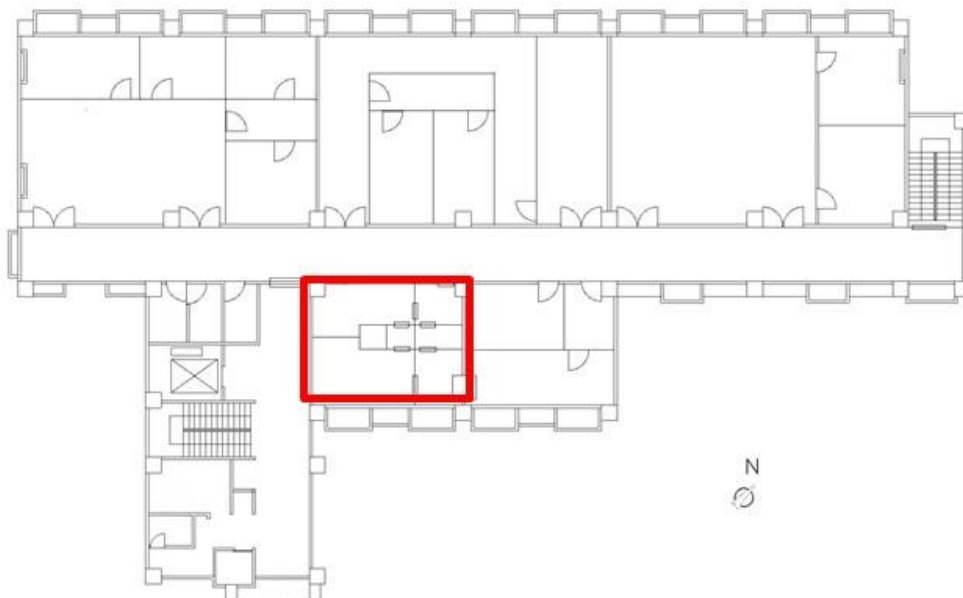
2 實驗室配置

2.1 生物材料管制區空間分配與人員進出圖(Fig.1)

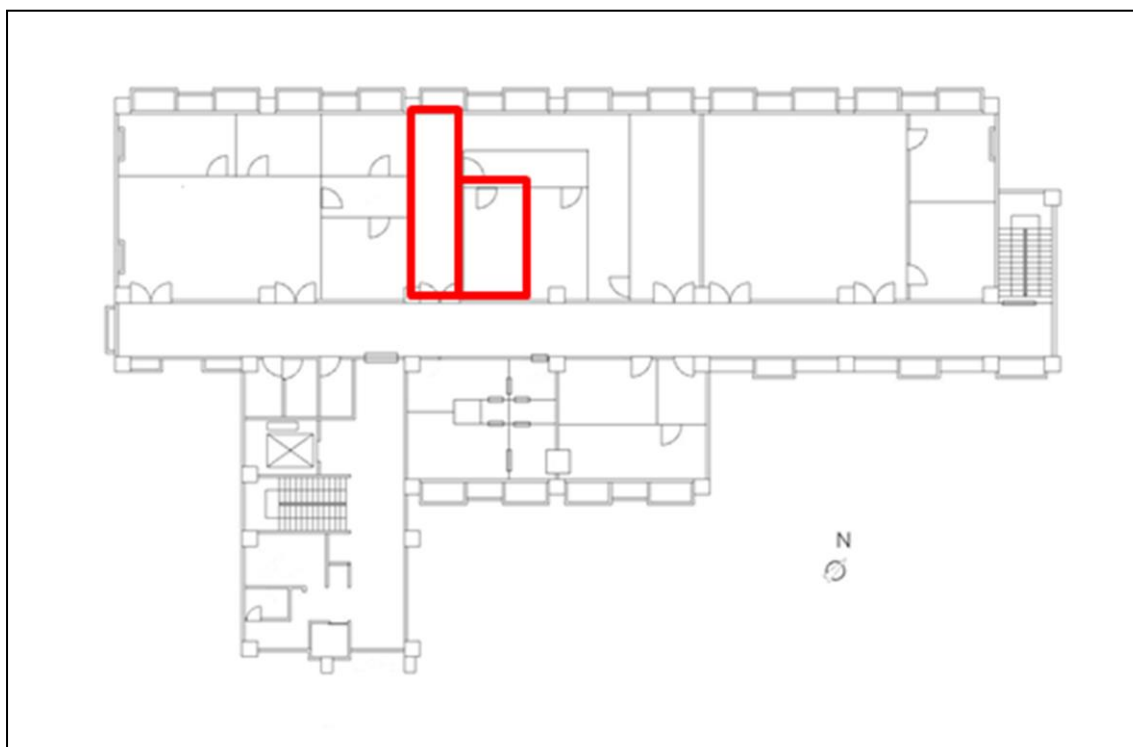


2.2 實驗室生物安全等級

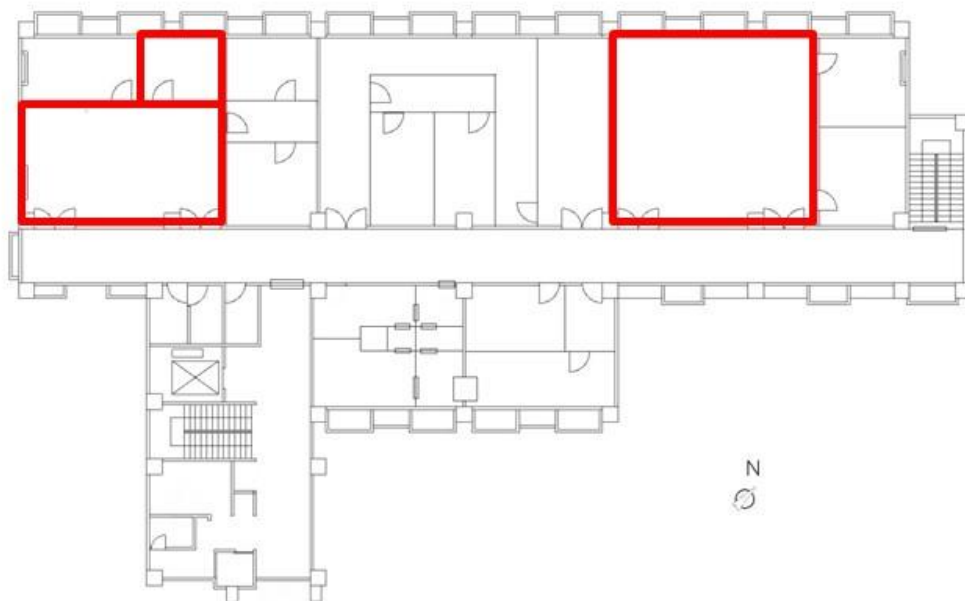
2.2.1 (負壓實驗室):



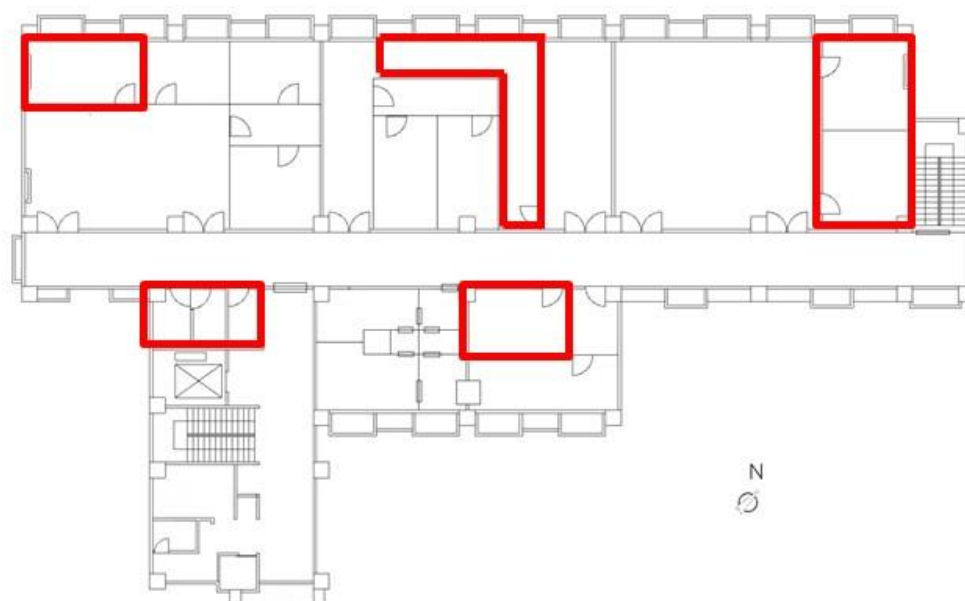
2.2.2 BSL-2 Lab :



2.2.3 BSL-1 Lab :

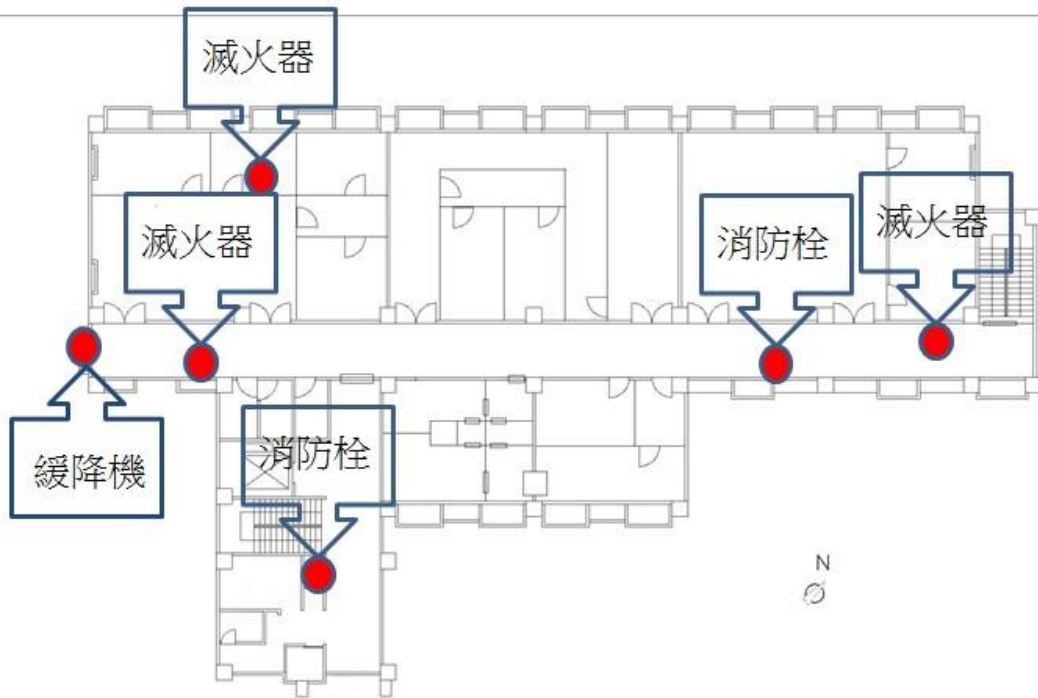


2.3 非污染區

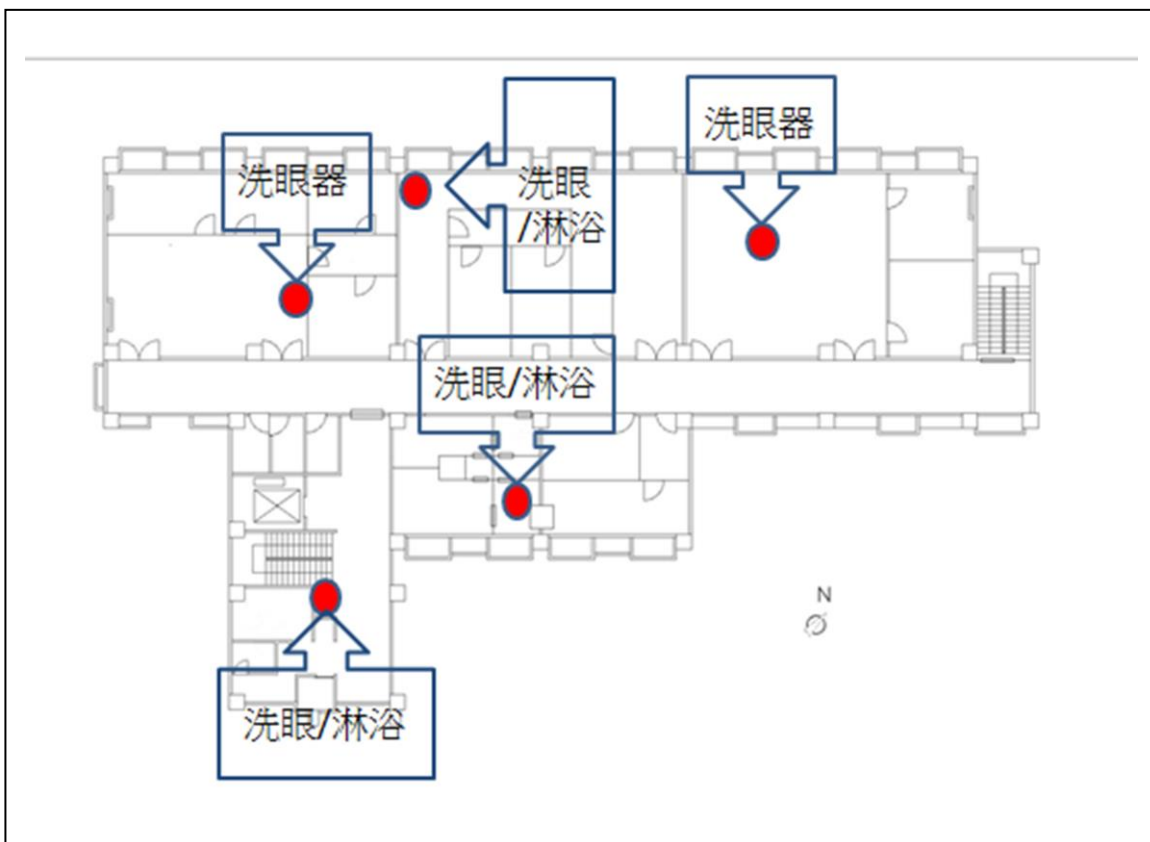


3 安全設備

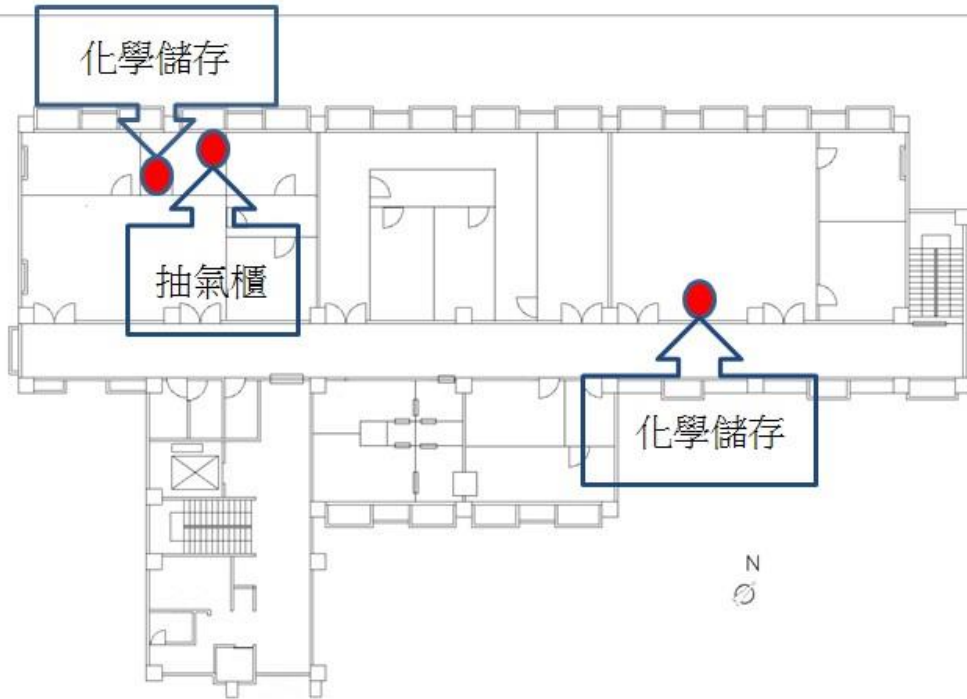
3.1 消防設備位置



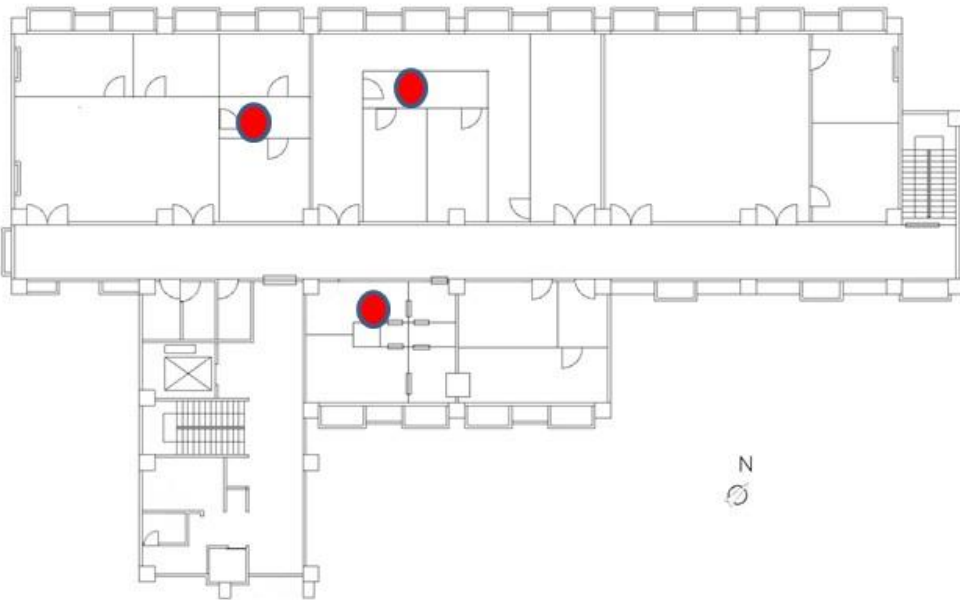
3.2 洗眼/淋浴設備



3.3 化學藥品防護設備



3.4 緊急備用個人防護設備



4 操作規範

4.1 將氣霧 (Aerosols) 減至最低的方法：盡量減少會產生氣霧之動作，產生氣霧的動作包括

- 4.1.1 培養液之更換或將上清液移至另一容器
- 4.1.2 用吸管或震盪器混合液體
- 4.1.3 滴加細菌懸浮液於固體培養基表面或製作染色抹片
- 4.1.4 含細菌之器具 (培養管、培養瓶、吸管或微吸管頭) 掉落
- 4.1.5 檢體或菌液濺灑
- 4.1.6 將可能含細菌之檢體切碎或磨碎
- 4.1.7 離心時試管破裂
- 4.1.8 由注射器推出感染性液體

4.2 尖銳物/玻璃製品

- 4.2.1 實驗操作過程盡可能避免使用易傷手之尖銳物。
- 4.2.2 非使用注射器不可時，用過之針頭不可套回針套。
- 4.2.3 開冷凍乾燥菌種前，安瓶需先用玻璃切割器，切割欲折斷部位，(手要戴防割材質手套)，酒精棉擦拭後安瓶插入套管內，外面覆蓋滅菌紗布，才可折斷安瓶。
- 4.2.4 使用注射器抽取感染性液後，如需排除氣泡部分，針頭必須朝上，插入底部填塞棉花之滅菌短試管，以避免產生氣霧。
- 4.2.5 工作中意外割傷，應立即作處理並向安全管理人及實驗室負責人報告及製作記錄，以利追蹤監視。

4.3 生物危害廢棄物之處理

- 4.3.1 培養物、組織、體液標本、或具有潛在傳染性的廢物一律放入內鋪有兩層耐高溫塑膠袋的廢棄桶內，以利處理滅菌
- 4.3.2 用過之吸管、滴管、微量吸管頭浸入盛消毒液之容器內、檢體瓶、培養瓶、試管、離心管及其他裝感染性及潛在感染性廢物，放進內襯耐高溫塑膠袋之廢棄桶內
- 4.3.3 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
- 4.3.4 動物屍體需浸泡於漂白水或固定液內，24 小時以上送出，儲存於 -80°C 冰箱，定時焚燒

4.4 生物危害材料之儲存：操作方式依照生物安全等級處理，儲存於管制區之 -80°C 冰箱，填寫生物材料儲存單，冰箱需上鎖。

4.5 生物危害材料之運送

- 4.5.1.1 材料需確定管口鎖緊，用消毒液擦拭外管後，置於乾淨試管架，再放入傳遞箱
- 4.5.1.2 不可滅菌之器皿，或需再利用的器具，需經臭氧殺菌後，放入傳遞箱

4.5.1.3 組織需放入無菌的緊密容器，經消毒液擦拭外管後，置於乾淨試管架，再放入傳遞箱

4.5.1.4 萃取出之 DNA 或 RNA，用消毒液擦拭外管後，置於乾淨試管架，再放入傳遞箱

4.5.2 危險性生物材料校內運送原則

4.5.2.1 第一層包裝

4.5.2.1.1 第一層使用 PC 或 PP 材質之不漏水容器，蓋子旋緊，容器外標明病原物或檢體名稱、病原物繼代歷、感染價、容量、收存日期。每支容器最多只能裝滿三分之二容量。

4.5.2.1.2 每支第一層容器，外面再包圍吸水材。

4.5.2.1.3 多支第一層容器，應防止相互碰撞。

4.5.2.2 第二層包裝

4.5.2.2.1 第二層包裝使用硬質 PP 或 PE 塑膠筒，蓋子旋緊必須不漏水。

4.5.2.2.2 第二層容器外面再包圍塑膠發泡材。

4.5.2.3 第三層包裝

4.5.2.3.1 第三層包裝使用厚硬盒包裝。

4.5.2.3.2 寄送病原物之詳細資料裝入塑膠袋夾在第二層及第三層之間。

4.5.2.3.3 裝入厚紙箱，外面標明送達單位、寄送單位、聯絡電話、貼上生物危險標誌。

4.5.2.3.4 所有檢體由專任助理或研究生直接送達，並且完成簽收。

4.5.2.4 必須低溫運送時

4.5.2.4.1 第二層容器包裹塑膠發泡材後放入厚質保麗龍箱內，四週放乾冰或冰寶或使用檢體運送專用之塑膠保溫箱。

4.5.2.4.2 使用乾冰運送用時，第一層容器必須要氣密。

4.5.2.4.3 使用乾冰時需考慮二氧化碳之散發，避免容器爆裂。

4.5.2.4.4 保麗龍箱外面要以厚硬紙箱包裝。

5 實驗設備使用

5.1 生物安全櫃之使用

5.1.1 實驗操作前，確定生物安全櫃氣流方向正確，負壓正常

5.1.2 至少先開機運轉 5 分鐘，確認氣流穩定後再開始實驗操作。

5.1.3 在生物安全櫃內操作時，避免破壞操作口之空氣屏障(Air Barrier)

5.1.3.1 手盡可能減少進出動作，不能避免時進出動作要緩和，手臂進出時與生物安全櫃面板垂直。

5.1.3.2 進出後須等 1 分鐘，氣流穩定後才開始操作。

- 5.1.3.3 避免其他人員在同一空間內移動或開關門
- 5.1.4 生物安全櫃內
 - 5.1.4.1 不可以有東西阻擋氣柵 (Grills)
 - 5.1.4.2 盡量在離氣柵約 10 公分距離處操作實驗
 - 5.1.4.3 不可將物品儲存於生物安全櫃內
 - 5.1.4.4 生物安全櫃內不可放置太多物品，以免影響氣流
- 5.1.5 實驗操作完畢
 - 5.1.5.1 生物安全櫃至少持續運轉 5 分鐘，使污染空氣完全清除才可關機
 - 5.1.5.2 用含消毒液之紗布清潔生物安全櫃工作檯
 - 5.1.5.3 再用含無菌水的紗布擦拭幾次，以免不銹鋼腐蝕
- 5.1.6 所有感染性廢棄物都必須丟棄在可滅菌之廢棄物容器，並置於生物安全操作櫃中，實驗結束後綁緊並取出滅菌。
- 5.2 吸管輔助器 (Pipette Aid) 之使用
 - 5.2.1 使用具過濾器之吸管輔助器。
 - 5.2.2 使用過之吸管應退棄於含消毒液之容器。
 - 5.2.3 使用時因不慎受污染，應立即消毒處理並更換過濾膜，以防他人因不知而繼續使用。過濾膜應有備份置於實驗室內。
- 5.3 微吸管頭 (Micro Pipettor Tip) 之使用
 - 5.3.1 應選用有 Filter 之微吸管頭。
 - 5.3.2 使用過之微吸管頭應退棄於含消毒液之容器。
- 5.4 離心機之使用
 - 5.4.1 確認離心機蓋具安全設計裝置。
 - 5.4.2 檢視離心套管氣密蓋或 Rotor 蓋圓型墊環是否裝妥。
 - 5.4.3 確認裝在水平離心頭之套管是否一樣。
 - 5.4.4 確認所要用之離心管材質是否合乎所要的轉速或離心力。
 - 5.4.5 平衡套管及離心物重量。
 - 5.4.6 確認套管與檢體已裝妥並成對角線位置。
 - 5.4.7 啟動離心，使用高轉速離心時應緩緩加速，不可急速轉到所要之轉速。
 - 5.4.8 完全停止前不可打開離心機
- 5.5 超低溫冰櫃
 - 5.5.1 採用 2.0 ml 保存管保存，封緊瓶口，容器外面清楚標示內容物。
 - 5.5.2 使用不銹鋼儲放架以便檢體之存取，減少佔用儲存空間。
 - 5.5.3 冰櫃內結冰時，或至少每年清除一次。
 - 5.5.4 病毒實驗室定期或每次進入時記錄溫度；結核菌實驗室每次進入時紀錄溫度。
 - 5.5.5 冰櫃內物品少時應置放冰寶 (冷媒劑)，以維持溫度之穩定。取出之冰寶須滅菌丟棄。
- 5.6 冰箱

- 5.6.1 儲放冰箱內之培養基、緩衝液等液體類容器應緊閉瓶口並標示內容物、日期及儲放者。
- 5.6.2 冰箱內置一溫度計以便溫度觀測及記錄。
- 5.6.3 實驗告一階段應整理冰箱內之存放物，不用的東西一律高壓滅菌處理。
- 5.6.4 冰箱內禁放具爆炸性之化學品。
- 5.7 二氧化碳培養箱
 - 5.7.1 培養容器外表應標示培養物以利識別。
 - 5.7.2 隨時注意二氧化碳桶壓力錶，特別是例假日之前，避免二氧化碳耗盡影響培養物之生長。
 - 5.7.3 有培養物滲漏、污染時立即清除消毒。
- 5.8 恆溫水槽
 - 5.8.1 注意水位不可低於電熱管，隨時添加水量。
 - 5.8.2 定期清洗恆溫水槽。
 - 5.8.3 人員離開之前關閉不用的水槽加熱器。
 - 5.8.4 有感染物污染時水溫調高到 75°C 持續加溫一小時，待溫度降下後加消毒液，清洗，更換蒸餾水。
- 5.9 傳遞箱
 - 5.9.1 定期擦拭傳遞箱內及 UV 紫外線殺菌。
 - 5.9.2 定期檢測燈管紫外線強度，必要時更換燈管確保殺菌效果。
- 5.10 高壓蒸氣滅菌鍋之使用
 - 5.10.1 使用前先確認鍋門已關緊
 - 5.10.2 滅菌物貼滅菌溫度指示帶
 - 5.10.3 確定滅菌完成，需先確認內鍋壓力已歸零才可打開鍋門，工作中不可開紫外燈。
- 5.11 排煙櫃：
 - 5.11.1 防護罩不可拉開過高
 - 5.11.2 手臂進出排煙櫃動作需緩慢，以免影響氣流
 - 5.11.3 化學藥品儘量保持關閉
 - 5.11.4 不可將頭伸入排煙櫃內
 - 5.11.5 排煙櫃內不可使用延長線
 - 5.11.6 不可將物品或藥品儲存於排煙櫃內
 - 5.11.7 藥品噴濺或溢漏，需立即清理不可任期揮發
 - 5.11.8 使用完畢將防護照蓋緊

7、設施使用

7.1. BSL-2 實驗室

7.1.1. 進出入管制：門禁管制人員進出入

7.1.2. 個人防護

7.1.2.1. 必要時使用個人防護用具：進入緩衝室（入），依標示穿隔離衣、穿鞋套、戴 N95 口罩、戴手術帽、戴外科長手套、戴手套。

7.1.2.2. 禁止攜帶進入實驗室項目

7.1.2.2.1. 嚴禁私人手機使用。

7.1.2.2.2. 取下手錶、手環、戒指、耳環及髮飾。

7.1.2.2.3. 脫下影響穿著防護衣之個人外套。

7.1.3. 負壓實驗室功能

7.1.3.1. 確定實驗室內氣流方向及換氣量

7.1.3.1.1. 氣流方向：氣流方向是從無生物材料污染區域至污染可能程度增加的區域（走道→緩衝室→實驗室），可用一張薄紙測試

7.1.3.1.2. 換氣量：進入實驗室前，於中央監控系統啟動為正常模式，換氣量 12 次/時以上。

7.1.3.1.3. 實驗結束後，於中央監控系統設定為節能模式。

7.1.3.1.4. 工程人員至少每年測量一次氣流量的變化

7.1.3.1.5. 中央監控系統分層管制

7.1.3.1.6. 確定實驗室內負壓為 3.5 mmAq-4.5 mmAq

7.1.3.1.7. 查看實驗室外負壓壓力表顯示值是否在設定範圍內。

7.1.3.2. 遵守人員、物品、廢棄物動線

7.1.4. 實驗室程序

7.1.4.1. 實驗室設備使用記錄：開始操作實驗前，先將生物安全櫃打開，在等待氣流穩定的時間，記錄實驗室設備使用記錄後由傳遞箱送出。

7.1.4.2. 實驗操作前，確定生物安全櫃氣流方向正確，負壓正常

7.1.4.3. 在生物安全櫃內操作時，避免破壞操作口之空氣屏障（Air Barrier）

7.1.4.4. 手盡可能減少進出動作，不能避免時進出動作要緩和，手臂進出時與生物安全櫃面板垂直。

7.1.4.5. 進出後須等 1 分鐘，氣流穩定後後才開始操作。

7.1.4.6. 避免其他人員在同一空間內移動或開關門

7.1.5. 結束程序：

7.1.5.1. 除污程序

7.1.5.1.1. 當天工作完，現場必須整理乾淨。

7.1.5.1.2. 使用過之器材，除非不能用高溫滅菌之可重複使用器材，可用 UV 照射，適當消毒液浸泡外，一律採用高壓滅菌處理。

7.1.5.1.3. 離開實驗室前移除非必要之電源插電（如水浴槽、離心機、顯微鏡等）

- 7.1.5.1.4. 離開實驗室時應在生物安全櫃內
- 7.1.5.1.5. 以含消毒液紗布擦拭檯面，再以含蒸餾水之紗布擦拭一次
- 7.1.5.1.6. 脫去外層手套，置入滅菌袋中
- 7.1.5.1.7. 綁緊滅菌袋，移出生物安全櫃
- 7.1.5.1.8. 置入第二層滅菌袋並綁緊
- 7.1.5.1.9. 打開房門進入緩衝室（出）
- 7.1.5.1.10. 更換廢水桶，將廢水桶置入滅菌鍋滅菌
- 7.1.5.1.11. 依序脫掉防護衣、頭套、鞋套、手套、N95 口罩、洗手

7.1.6. 實驗室維護程序

7.1.6.1. 實驗室維護

- 7.1.6.1.1. 實驗室需符合疾管局規定，定期實施功能測試

7.1.6.2. 儀器設備維護

- 7.1.6.2.1. 進入時紀錄各種儀器溫度、二氧化碳濃度及使用狀況
- 7.1.6.2.2. 各項儀器定期維護並記錄
- 7.1.6.2.3. 機電設備維護：參考工務室作業流程

7.1.7. 實驗室之定期清潔

- 7.1.7.1. 使用不掉纖維之抹布，浸消毒劑擦拭後再用清水擦拭一遍

- 7.1.7.2. 地板以無塵室專用之滾輪粘紙拖拭

7.1.8. 實驗室之消毒

7.1.8.1. 實驗室燻蒸消毒之時機

- 7.1.8.1.1. 實驗結束，告一階段或轉換實驗不同病原物之前要用福馬林作燻蒸消毒

7.2. BSL-2 實驗室

7.2.1. 進出入管制

7.2.2. 個人防護：

- 7.2.2.1. 使用合適之個人防護用具
- 7.2.2.2. 實驗室內禁止飲食
- 7.2.2.3. 離開實驗室需將污染之實驗衣換下
- 7.2.2.4. 離開實驗室要洗手

7.2.3. 實驗室功能：每日紀錄溫度/溼度

7.2.4. 結束程序：

- 7.2.4.1. 當天工作完現場必須清理乾淨
- 7.2.4.2. 廢棄物應依照規定分類放置，生物危害廢棄物應雙層包裝綁緊袋口高壓滅菌後才可丟棄
- 7.2.4.3. 操作區域每日執行至少 1 次清潔除污程序。

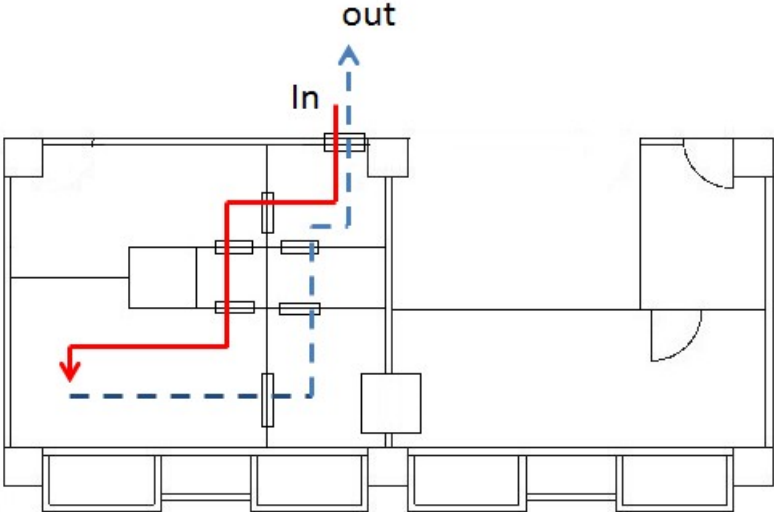
8、健康監測

- 8.1. 工作人員有任何身體之異常或不適，必須向實驗室安全管理人及實驗室負責人報告並暫停入內工作。
- 8.2. 工作人員事先留存背景血清，必要時定期採取，以利健康管理及追蹤監視。
- 8.3. 每年作健康檢查並存檔

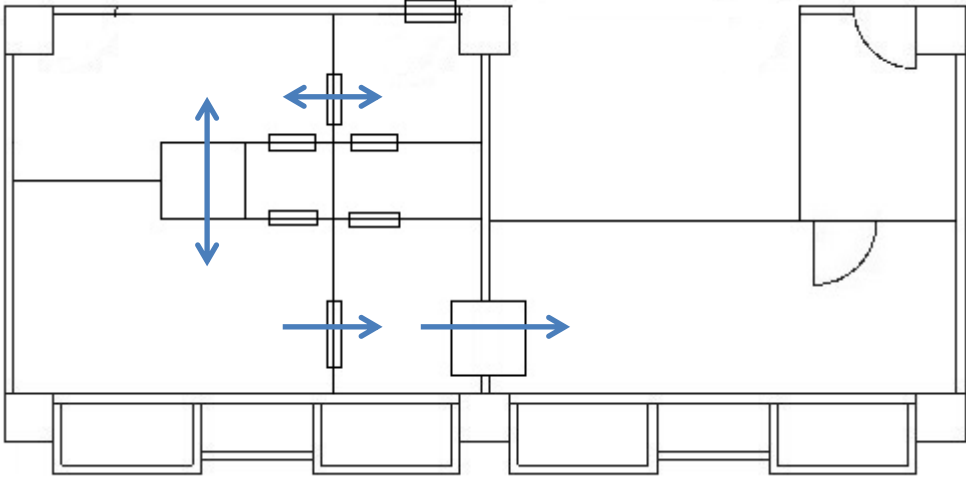
9. 稽核

- 9.1 實驗場所將進行內部稽核與外部稽核
- 9.2. 稽核目的是將不符合事項予以適當的矯正或預防
- 9.3 稽核方式先進行實驗室自我評量，再由環安衛人員予以稽查確認
- 9.4 外部稽核則不定期由衛生單位派員實施之

負壓實驗室人員動線圖



負壓實驗室物品動線圖



負壓實驗室廢棄物動線圖

