



生物性危害

G2動物實驗及感染性危害處理



教材使用注意事項

本教材中所有投影片內容(含文字檔及圖檔)著作權皆屬於本部所有。

一、種子師資：對任一單張投影片之教材須完整擷取進行授課，不得將任一單張投影片內容任意進行修改及編輯。

二、作為一般授課使用之參考資料時需標註引用出處。



內 容

- 壹、生物性危害因子
- 貳、生物性危害預防與應變
- 參、生物醫療廢棄物暫存與處置
- 肆、生物安全管理



壹、生物性危害因子

生物性危害的來源

1. 宿主：受感染的人或動物

- ☞ 人：肺結核桿菌、冠狀病毒，
流行性感冒病毒、腸病毒
- ☞ 動物：狂犬病、狂牛症



2. 環境中之病原：

- ☞ 花粉
- ☞ 黴菌
- ☞ 污染水體中的退伍軍人
菌
- ☞ 物體表面的各種病毒：
冠狀病毒、流行性感冒病毒
等



危害進入人體的途徑

- **吸入(Respiratory tract)**

冠狀病毒、流行性感冒病毒、麻疹病毒、
肺結核桿菌

- **食入(GI tract)**

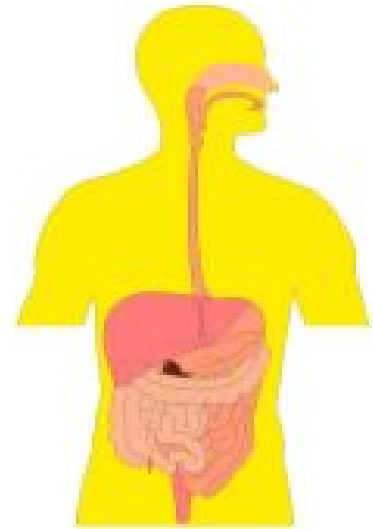
受污染之食物：傷寒桿菌、霍亂弧菌、
A型肝炎病毒

- **經由皮膚(Skin)或黏膜(Mucous membrane)**

砂眼披衣菌、血液傳播的疾病(愛滋病毒、B型肝炎病毒)

- **叮咬(bite)**

病媒蚊叮咬：登革熱病毒、日本腦炎病毒、茲卡病毒
節肢動物以口器傳輸致病：血吸蟲病





生物性危害之傳播途徑

1a. 宿主→吸入

直接傳播

飛沫droplets

ex：冠狀病毒、流行性感冒病毒、腸病毒、流行性腦脊髓膜炎雙球菌



吸入

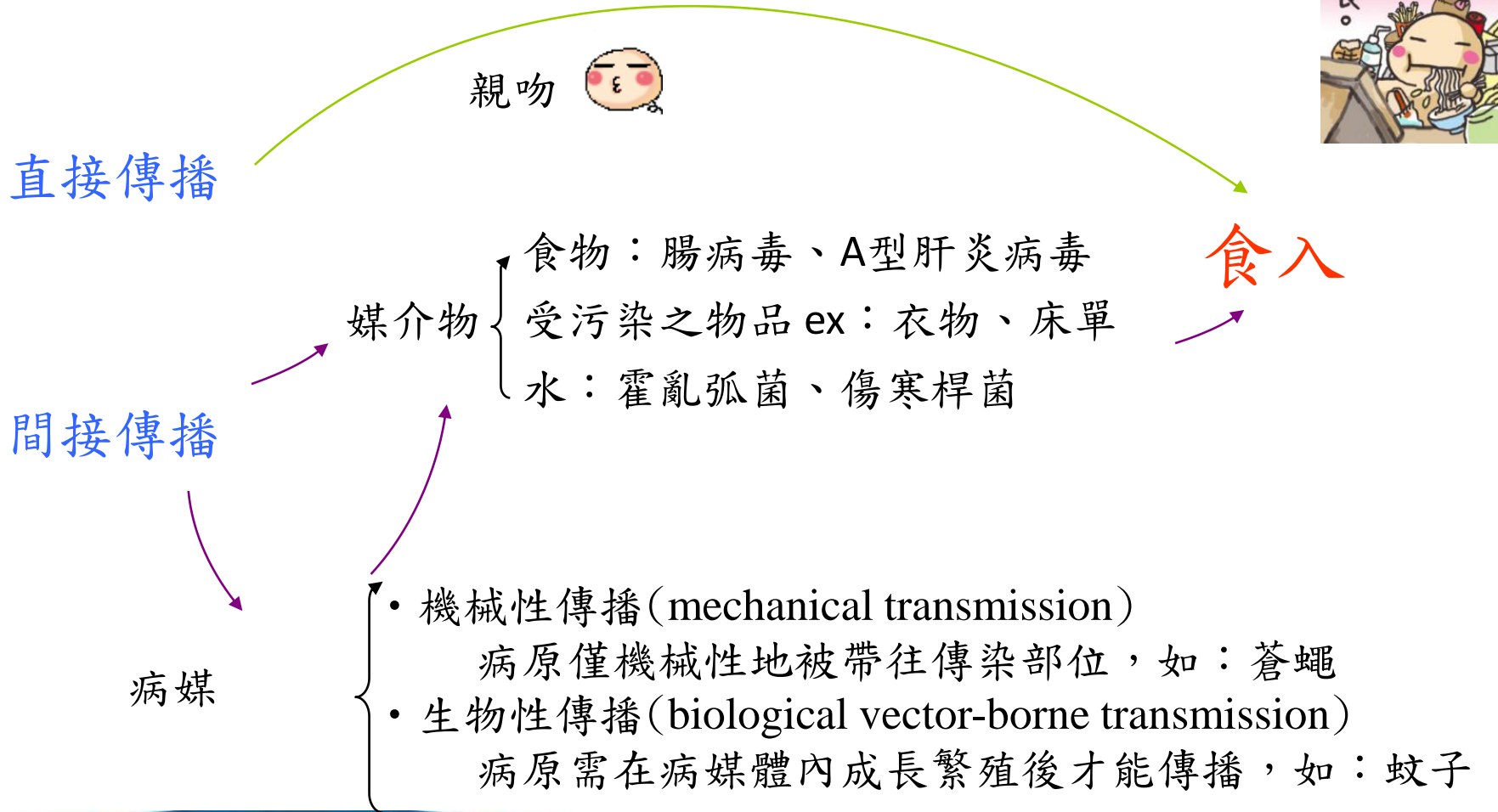
間接傳播

空氣airborne

ex：肺結核桿菌、麻疹病毒

生物性危害之傳播途徑

1b. 宿主→食入



生物性危害之傳播途徑

1c. 宿主→皮膚、黏膜

直接傳播

性行為、垂直感染、叮咬、接觸

EX：梅毒螺旋體細菌、愛滋病毒、
香港腳黴菌、B型肝炎病毒



皮膚
黏膜 → 體液
血液

間接傳播

尖銳物(針器、刀械)：B型肝炎病毒

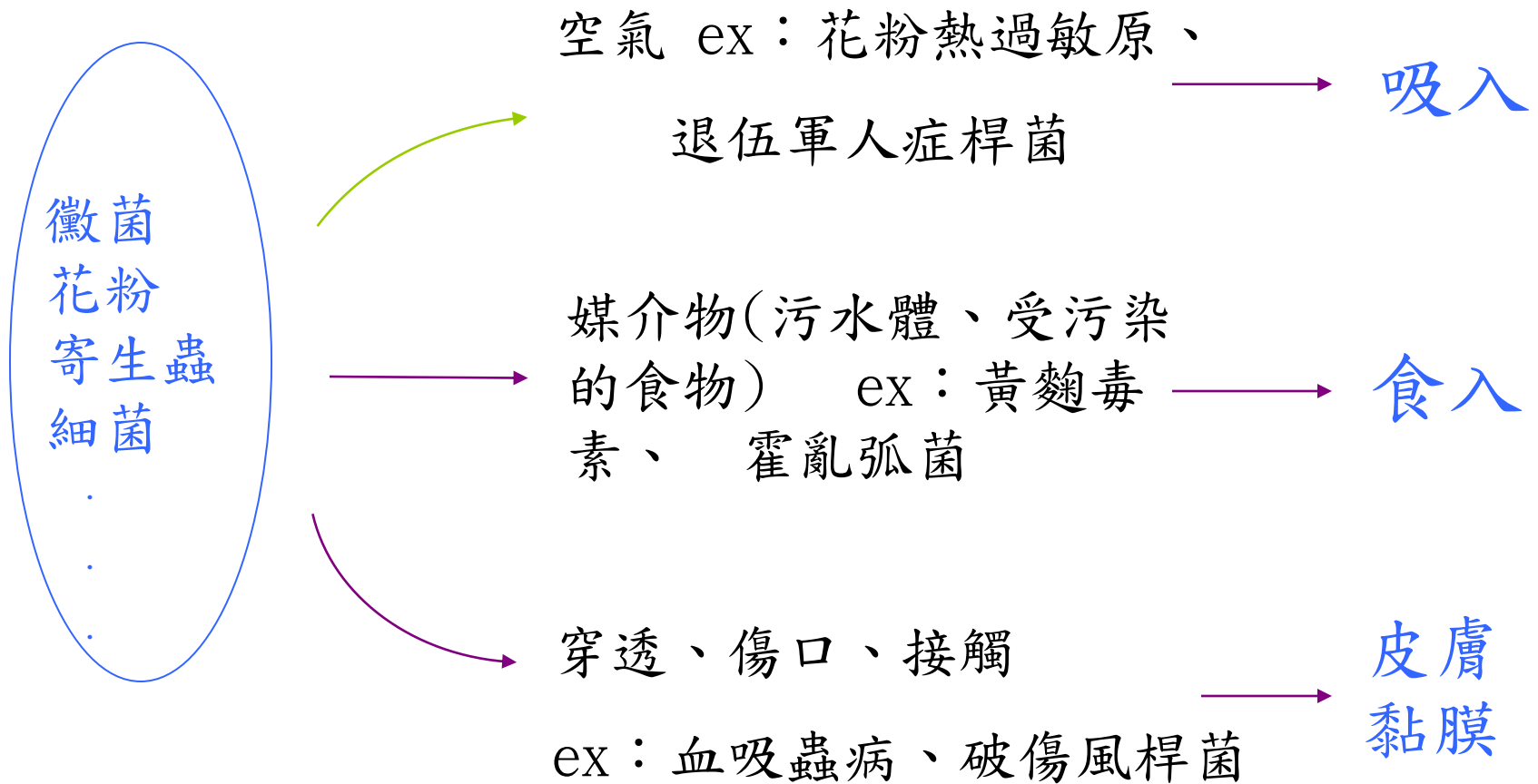
輸血：B型肝炎病毒、愛滋病毒

病媒(蚊子)：登革熱病毒、瘧疾原蟲



生物性危害之傳播途徑

2. 環境中之病原





生物性危害



- **感染** (Infection)：生物體在宿主內生長繁殖所致(如：流行性感冒、麻疹、肺結核)
- **過敏** (Allergy)：生物體以過敏原角色經重覆暴露致使人體免疫系統過度反應所致(如：過敏性肺炎、氣喘、過敏性鼻炎)
- **中毒** (Toxicosis)：暴露於生物體所產生之毒素（細菌內毒素、細菌外毒素、真菌毒素）所致(如：發燒、發冷、肺功能受損)
- **其他**：如隔離、醫療負擔、社會經濟影響、心理恐慌等

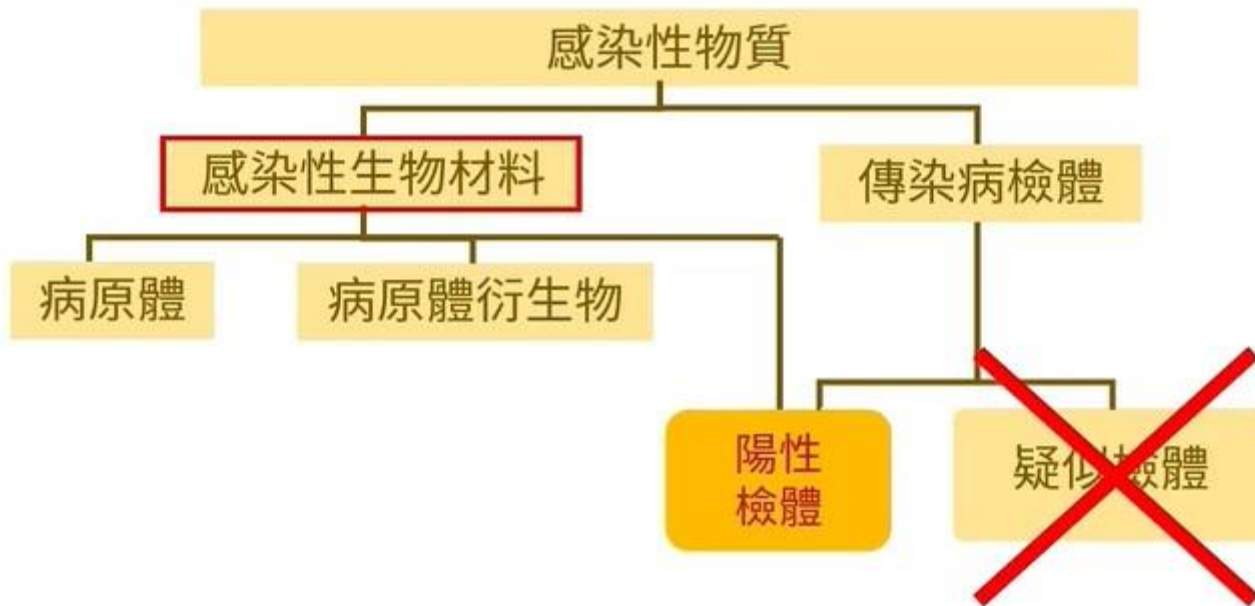


感染性生物材料

區分以下三類：

- 1.具感染性的病原體：指造成人類感染或疾病之病原微生物(病毒、細菌、真菌或寄生蟲)及其培養物(液)
- 2.病原體的衍生物：指經純化及分離出病原體組成成分(核酸、質體、蛋白質)或其分泌產物(生物毒素)
- 3.經確認含有病原體或其衍生物之物質：指經檢驗確認含有某種病原體、或其組成成分、或其分泌產物之傳染病病人陽性檢體(血液、痰液或尿液等)

感染性生物材料 vs. 感染性物質



實驗室生物安全主管基礎訓練數位學習課程-感染性生物材料管理法規



生物危害分級

依據：「感染性生物材料管理辦法」

衛生福利部疾病管制署 中華民國一百一十年十二月十五日衛生福利部
部授疾字第1100102022號令修正發布名稱及全文四十四條

第三條 本法（感染性生物材料管理辦法）第四條第四項之病原體，依其致病危害風險高低，區分為四級危險群

- 第一級：大腸桿菌K12型、腺相關病毒及其他未影響人體健康者。
- **第二級**：金黃色葡萄球菌、B型肝炎病毒、惡性瘧原蟲及其他影響人體健康輕微，且有預防及治療方法者
- **第三級**：結核分枝桿菌、人類免疫缺乏病毒第一型與第二型及其他影響人體健康嚴重或可能致死，且有預防及治療可能者。
- 第四級：伊波拉病毒、天花病毒及其他影響人體健康嚴重或可能致死，且通常無預防及治療可能者。



生物安全實驗室等級

依據：「感染性生物材料管理辦法」2021.12.15
「實驗室生物安全規範」2021版本

第六條 生物安全實驗室，依其操作規範、屏障與安全設備及設施，分為四等級（Biosafety level）；其等級及操作之感染性生物材料如下：

- 一、第一等級(**BSL-1**)：不會造成人類疾病者。
- 二、第二等級(**BSL-2**)：造成人類疾病者。
- 三、第三等級(**BSL-3**)：造成人類嚴重或潛在致命疾病者。
- 四、第四等級(**BSL-4**)：造成人類嚴重致命疾病且無疫苗或治療方法者。



動物生物安全實驗室等級

依據：「感染性生物材料管理辦法」2021.12.15

「實驗室生物安全規範」2021版本

第七條動物生物安全實驗室，依其操作規範、屏障與安全設備及設施，分為四等級（Animal Biosafety level）；其等級及動物實驗操作之感染性生物材料如下：

- 一、第一等級(**ABSL-1**)：不會造成人類疾病者。
- 二、第二等級(**ABSL-2**)：造成人類疾病者。
- 三、第三等級(**ABSL-3**)：造成人類嚴重或潛在致命疾病者。
- 四、第四等級(**ABSL-4**)：造成人類嚴重致命疾病且無疫苗或治療方法者。



貳、生物性危害預防與應變

等級	操作程序	安全設備	實驗室設施
BSL-1	標準微生物操作程序	無	開放式實驗檯上 端式洗手槽
BSL-2	BSL-1 操作程序加： <ul style="list-style-type: none"> • 進出限制 • 生物危害警告標識 • “尖銳物”防範 • 生物安全廢棄物消毒或醫學監視策略 	初級防護設備： I 級或 II 級生 物安全櫃 個人防護設備： 實驗衣、手套、 面部保護裝備	BSL-1 設施外加： 高壓蒸氣滅菌鍋
BSL-3	BSL-2 操作程序加： <ul style="list-style-type: none"> • 進出管制 • 所有廢棄物消毒 • 實驗衣消毒 • 收集基線期的血清 	初級防護設備： I 級或 II 級生 物安全櫃 個人防護設備： 保護性實驗衣、 手套、呼吸保 護裝備	BSL-2 設施外加： <ul style="list-style-type: none"> • 物理性隔離 之迴廊 • 封閉式：雙門 進出 • 負壓環境 • 排氣不循環



等級	操作程序	安全設備	實驗室設施
BSL-4	BSL-3 操作程序加： <ul style="list-style-type: none"> • 進入前更衣 • 出口具沐浴設備 • 在設施出口消毒所有物 	初級防護設備： 所有操作均在 III 級生物安全櫃或穿著全身充氣之正壓工作服於 I 級或 II 級生物安全櫃內操作	BSL-3 設施外加： <ul style="list-style-type: none"> • 獨立的建築物或隔離區 • 專屬供氧、排氣、抽氣及除污系統



生物安全櫃 (Biosafety Cabinet, BSC) VS. 無菌操作台

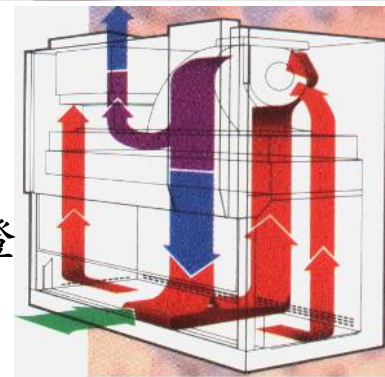
● BSC

- 利用乾淨之**負壓層流**空氣來隔絕其內部空氣外洩
- 主要目的：保護使用人及實驗室，順便保護產品

● 依防護效能：

- Class I：不常見
- **Class II：較常見**
 - A. 應有NSF/ANSI 49-2007(美規)/BS EN 12469:2000(歐規)認證
 - B. 分類及效能排序：A1, A2(原B3), B1, B2
- Class III：生物安全等級第4級適用

● 正壓無菌操作台：保護產品，空氣會外洩





正壓無菌操作台

- 非生物安全櫃，空氣往外吹，無保護使用者功能
- UV燈開啟期間需遮光 (通常是用布幕)
- 上方初級濾網應定期自行更換 (例：每 500 hrs)





生物安全櫃 vs. 正壓無菌操作台 vs. 化學氣櫃

- 不可將正壓無菌操作台作為生物安全櫃使用
 - 正壓無菌操作台空氣往外吹，無保護使用者功能
- 不可將化學氣櫃作為生物安全櫃使用
 - 化學氣櫃沒有保護生物實驗材料的功能
 - 視末端排氣過濾設備的種類差異，在化學氣櫃中操作感染性生物材料，有可能汙染外界空氣
- 亦不可將生物安全櫃作為化學氣櫃使用
 - 生物安全櫃的 HEPA 濾層無濾除氣態汙染物功能



動物生物安全

- 疾管署對於「動物生物安全」：從事人類或人畜共通傳染病病原體檢驗或研究且涉及動物實驗之實驗室生物安全管理
- 農委會動植物防疫檢疫局：屬於動物傳染病病原體檢驗或研究



需要考慮動物的習性

- 依據使用微生物其分類、傳播途徑與試驗內容；實驗動物習性與對使用微生物之感受性等，廣範圍評估後飼養於相對應防護等級的動物阻隔區（animal containment zone）
 - 現場安裝條件、動物特性、實驗操作內容
 - 使用初級隔離飼育籠（primary containment cage）或獨立通風籠具（individually ventilated cages）

初級隔離飼育籠具

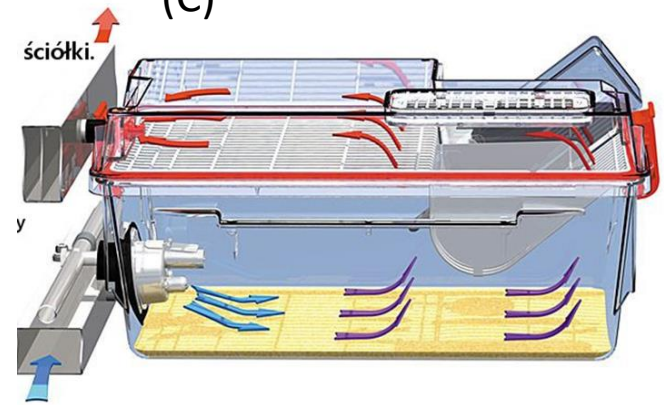
(A)



(B)



(C)



說明在一個透明塑膠製，含有HEPA過濾器排氣的通風小型隔離箱的一隻小鼠。這種裝置為小鼠等小型動物提供初級阻隔。

(A) Filter top cage, labexofma.com;

(B) HEPA 過濾排氣通風小型隔離箱，生物安全主管數位課程-動物作業安全

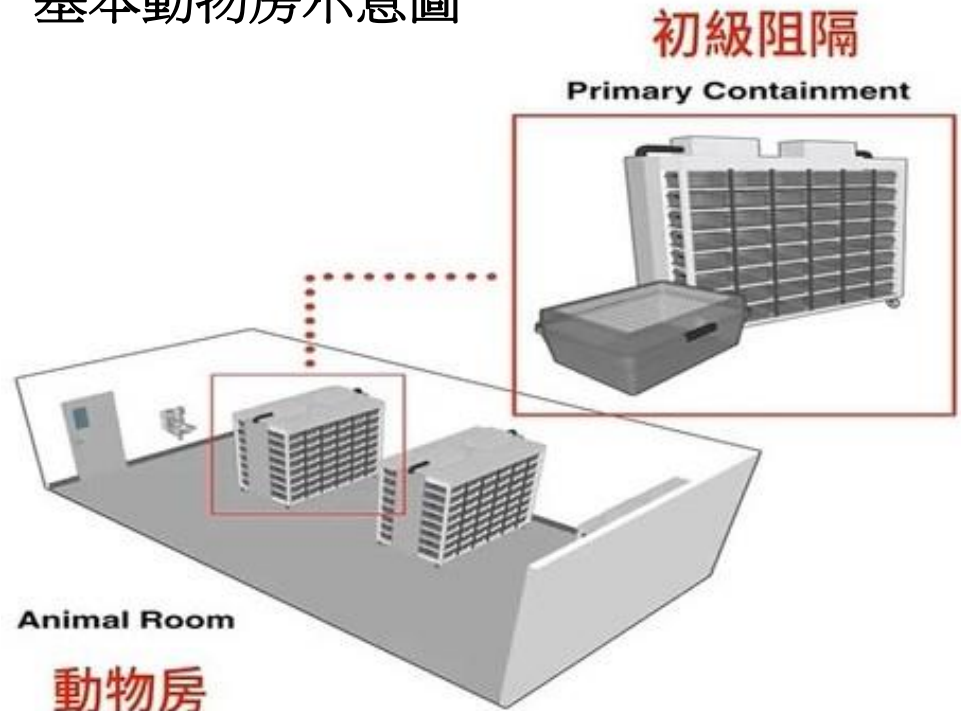
(C) Individually ventilated cages, animalab.eu

動物阻隔區域設計

基本動物房示意圖



通風飼育籠架，包含多個小型隔離籠具。排出的空氣經過過濾後再循環至室內，或直接排入室內排氣系統。



籠具類型反映處理病原體所需的生物安全等級

資料來源: 生物安全主管數位課程-動物作業安全



操作實驗可能致使動物暴露

- 更換飼育籠、添加飼料與飲水等應該在生物安全櫃(BSC)中進行
- 如果籠具或飼養設備超過BSC體積，則應該利用其他物理防護及屏障，並且配合正確使用個人防護具
- 以最少揚起粉塵之手法進行動物抓取、保定、換籠等程序
 - 參考疾管署BSL-Ag規範附錄一
 - BSC標準作業程序參考附錄二



參、生物醫療廢棄物暫存與處置



生物醫療廢棄物之定義

- 衛生保健廢棄物(Healthcare waste)：WHO
 - 從衛生保健機構產生的廢棄物，包括診斷、治療、預防、復健以及相關研究行為所產生的廢棄物。
- 生物醫療廢棄物 (Biomedical waste)：台灣
 - 指醫療機構、醫事檢驗所、醫學實驗室、工業及研究機構生物安全等級第二級以上之實驗室、從事基因或生物科技研究之實驗室、生物科技工廠及製藥工廠，於醫療、醫事檢驗、驗屍、檢疫、研究、藥品或生物材料製造過程中產生的廢棄物，**包括：基因毒性廢棄物、廢尖銳器具、感染性廢棄物。**



生物醫療廢棄物之處理流程

- 包括三大步驟—**貯存、清除及處理**
- 貯存之前須先做好**收集、分類、包裝及標誌**

生物醫療廢棄物 (2007.5.11 公告)	感染性事業廢棄物 (已廢止)
	



生物醫療廢棄物之分類及貯存方式

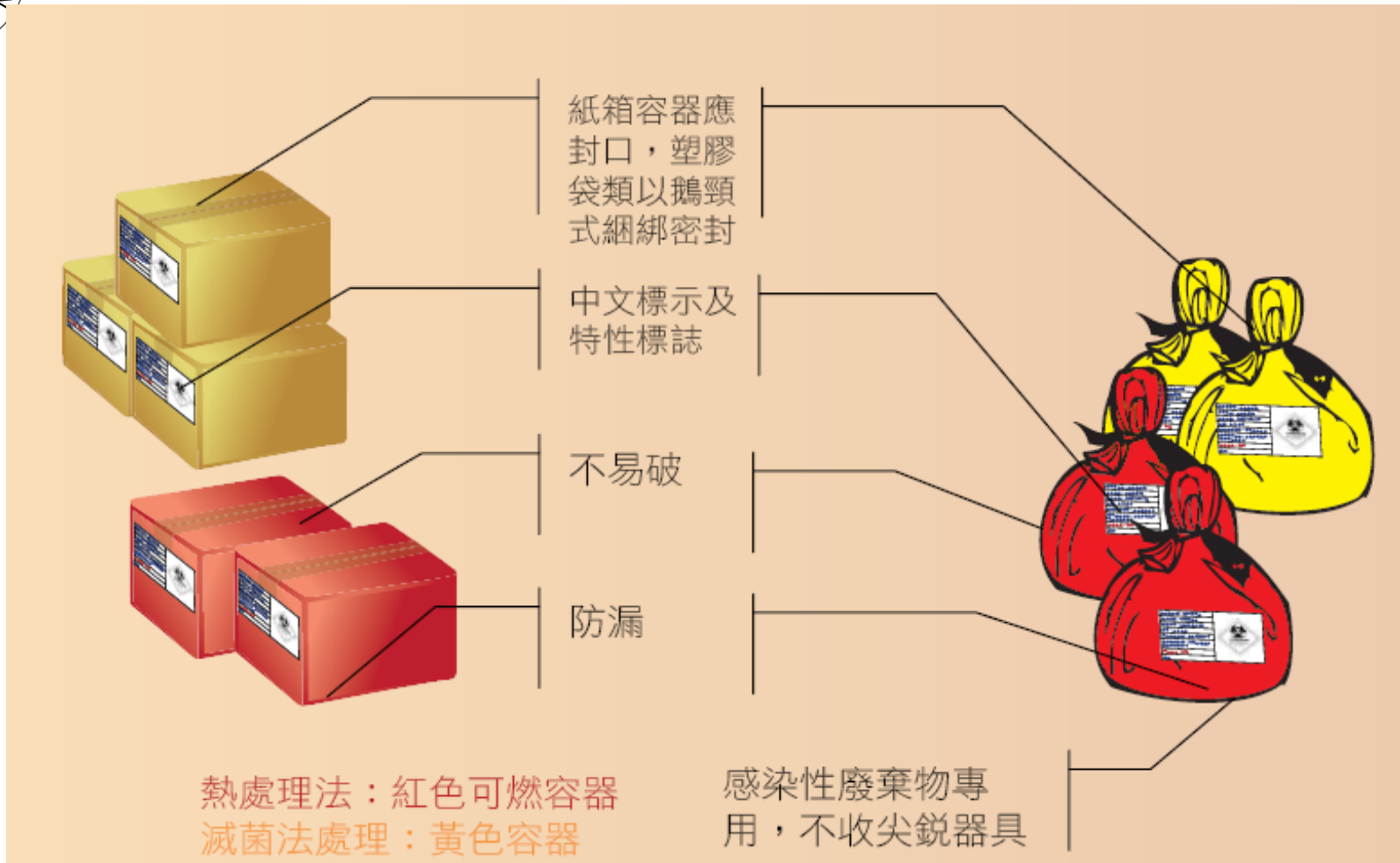
- 可燃性醫療廢棄物

- 以紅色可燃容器密封貯存，並標示生物醫療廢棄物標誌；其於常溫下(攝氏五度以上)貯存者，以一日為限，於冷藏者(攝氏零度至五度)，以七日為限，冷凍者(攝氏零度以下)，以三十日為限。

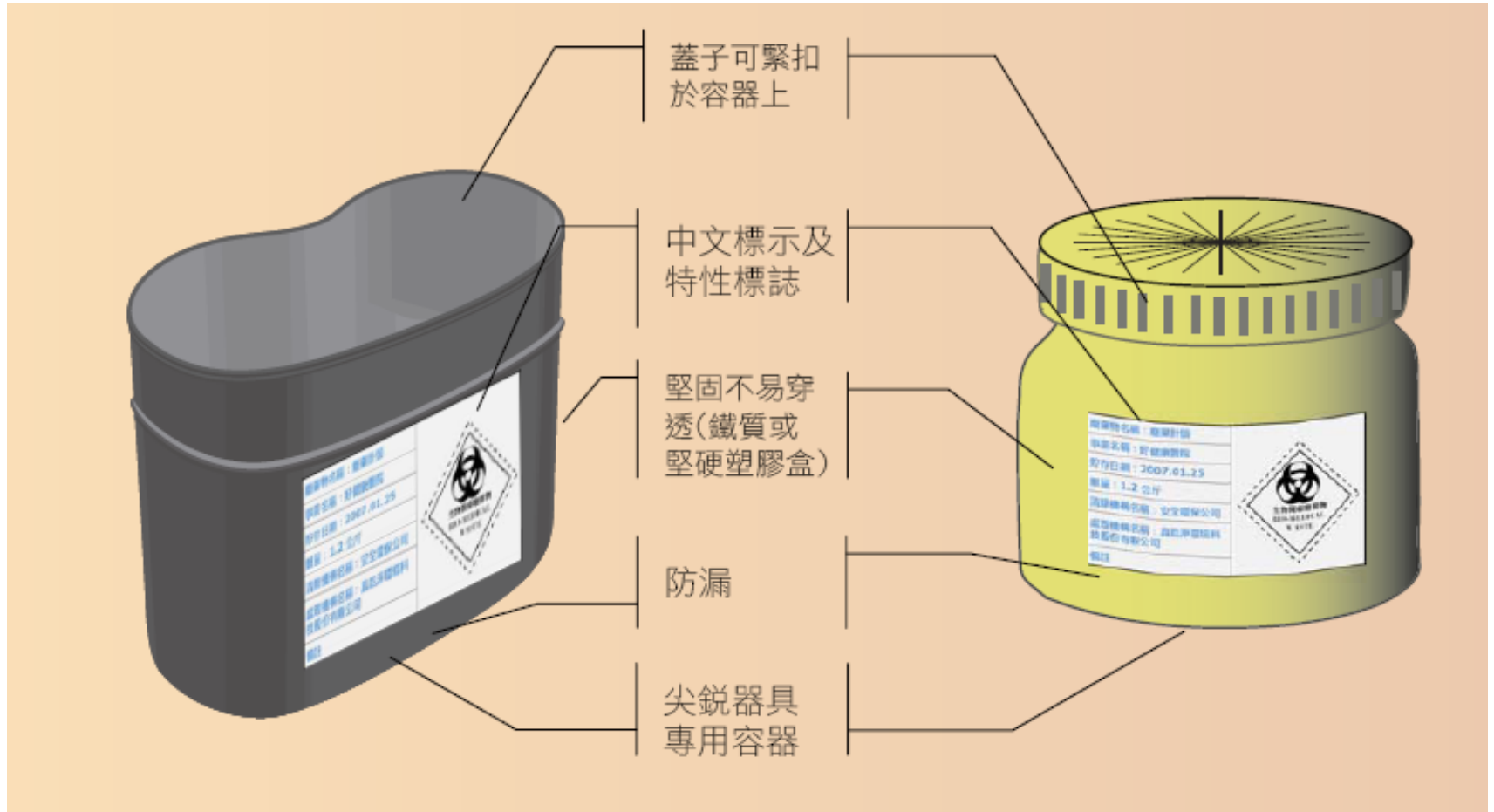
- 不可燃性醫療廢棄物

- 以不易穿透之黃色容器密封貯存，並標示生物醫療廢棄物標誌；該項廢棄物須進行滅菌處理。

(貯存時間、溫度及生物醫療廢棄物標誌，應標示於容器明顯處)



資料來源：行政院環保署 醫療機構事業廢棄物管理作業參考手冊 (97年版)



資料來源：行政院環保署 醫療機構事業廢棄物管理作業參考手冊 (97年版)

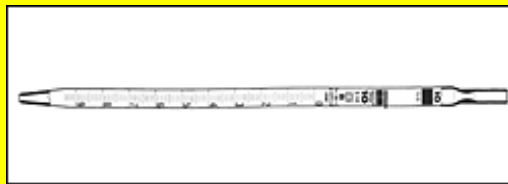


使用加蓋不會滲流之容器可用金屬或高密度塑膠容器

可燃性廢棄物
不可燃性廢棄物



針頭、刀片等拋棄式銳器需棄置於加蓋且防穿刺之硬殼容器中



消毒或高溫高壓滅菌後重複使用的污染（有潛在感染性）材料（如血清瓶、玻璃吸量管）

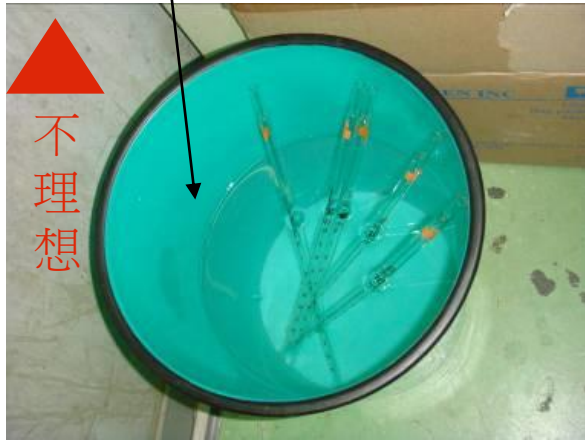


含感染性物質之廢棄物需滅菌後以事業廢棄物丟棄（如手套、拋棄式離心管、採血管等）



消毒或高溫高壓滅菌後重複使用的 污染(有潛在感染性)材料

0.5% 漂白水



垂直浸泡(無法全部浸泡到)

- ✓ 任何高溫高壓滅菌後重複使用的污染(有潛在感染性)材料不應事先清洗
- ✓ 任何必要的清洗、修復必須在高壓滅菌或消毒後進行。

Ex.

1. 操作 RG1 及一般細胞培養使用的吸量管，需浸泡消毒液後再行清洗
2. 操作 RG2 以上的感染性材料，玻璃吸量管或血清瓶等重複用之材料在操作過程中可先浸泡消毒液，並經高溫高壓滅菌後再清洗。



水平浸泡(卸下吸量管前先吸消毒液，再將其全部浸泡到消毒盒中)



動物屍體之暫存與處理

- 動物房舍中必須設置容量充足的冷藏設備以暫時貯存屍體。
- 屍體由冷凍庫取出後需先解凍再予焚化以避免燃燒不完全及浪費燃料。解凍時亦須在適當的場所，以避免解凍水之污染(防漏容器)。
- 無害性動物屍體，直接做掩埋處理或焚化；感染性的動物屍體應該以裝載生物危害物質的塑膠袋妥善包裝，經高溫高壓滅菌後，再以一般處理無害性動物屍體方法貯存、掩埋或焚化。
- 放射性動物屍體，應以裝載放射性物質的塑膠袋妥善包裝，利用專用烘箱，以 60-70 °C 將屍體水分烘乾，為避免烘乾過程產生惡臭，可利用微波爐加熱使水分分離。經乾燥後的動物屍體可依廢棄放射性材料處理。



肆、生物安全管理



生物材料保存

- 第一級危險群病原體、非屬生物毒素之衍生物（如核酸、質體、蛋白質）或陽性檢體之保存與處理，由設置單位自行規定管理之
- 設置單位對**第二級**以上危險群病原體或生物毒素之保存，應辦理下列事項：
 - 備有保存清單及存取紀錄。
 - 指派專人負責管理
 - 設有門禁管制
 - 訂定生物保全相關管理手冊。



實驗室設施維護與檢驗

- 定期維護
 - 排氣與空調設施
 - 高壓滅菌鍋與生物安全櫃
 - HEPA 或初級濾網過濾
- 定期檢測
 - 生物安全櫃操作效能（氣流風速、HEPA 完整性與過濾效能、光度、照度、噪音、震動）
 - 高壓滅菌鍋操作效能



實驗操作者的自我風險評估

四項要領

1. 我的實驗操作使用那些**生物材料**?

- 預測潛在之安全考量
- 了解危害物質進入身體的途徑
- 生物醫學研究相關知識
- 實驗操作者對生物性、化學與物理危害需具備的知識

2. 使用這些材料的**潛在危險**為何?

- 危害辨識
- 風險評估



實驗操作者的自我風險評估

四項要領

3. 我如何**避免**自己、同事及環境因實驗操作而**暴露**於潛在危機中？

- 實驗使用物品的相關參考資料(BSDS、SDS)
- 優良實驗室操作程序(GLP)
- 行政面的控管

4. 我如何**維護**自身、同事及環境安全

- 實驗設備的工程控管
- 個人防護裝備



隔離設施的設計要件與元素

標準實驗室/微生物操作

- 設定標準流程(Standards of Protocols, SOPs)
- 人員訓練
- 管制進出

初級防護 Primary barriers

- 生物安全操作櫃(Biosafety cabinets, BSCs)
- 個人防護裝備 (Personal protective equipments, PPE)

次級防護 Secondary barriers

- 空調系統(HVAC): HEPA過濾
- 生物醫療廢棄物處理



最重要的是生物安全操作櫃(BSC)

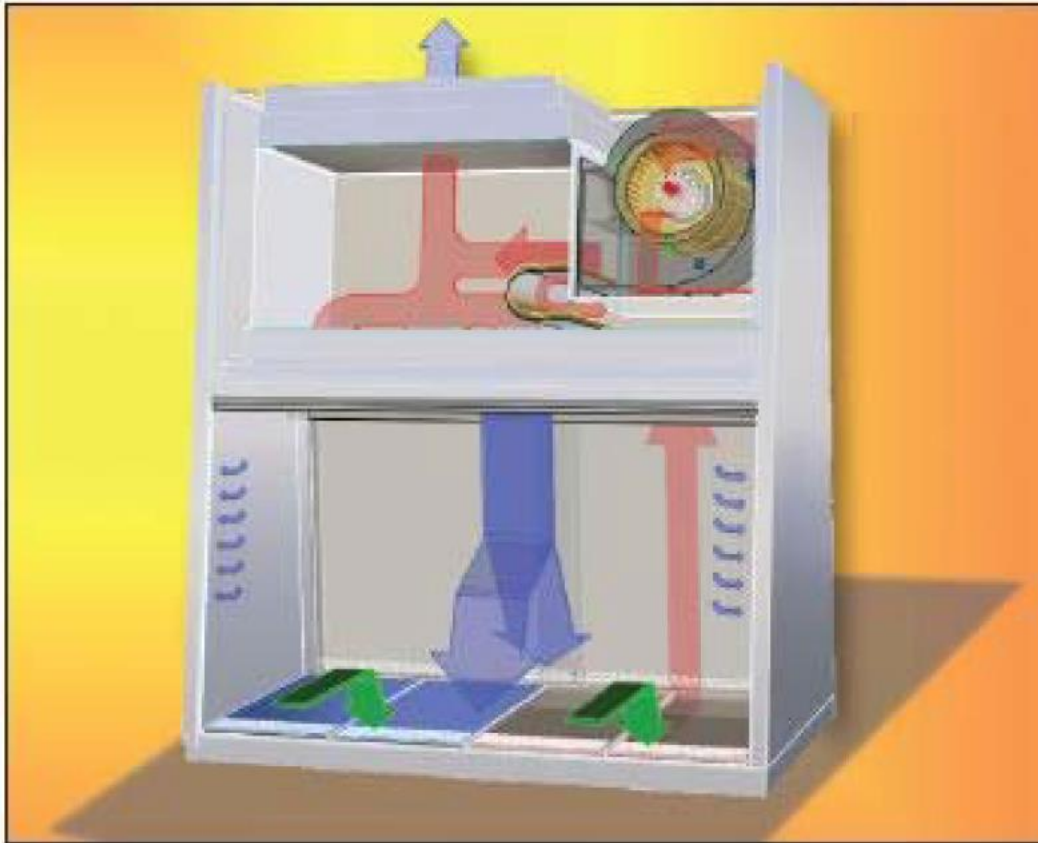


Figure 5: single sided animal containment workstation

Blue arrows: HEPA filtered air

Red arrows: contaminated air

Green arrows: room air

(Courtesy of XQ Lin, Esco)

適當選用、正確操作、定期維護

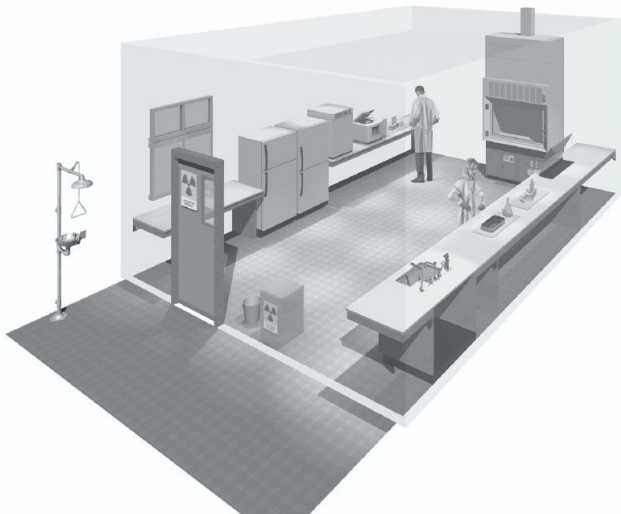
Biosafety in laboratory animal facilities: a practical approach, Belgium



ABSL-1實驗室，能夠應對哪些風險？

Easily cleaned and decontaminated

1. 實驗動物與髒污飼育盒之移動路徑應該避免公共區域，感染性與非感染性動物實驗室應該分開
2. 動物飼養區換氣次數建議10-15 ACH
3. 換氣系統之設計應顧及實驗室清潔和洗籠時產生的熱量與高濕度。



- Requirements:
 - Laboratories have doors
 - Sink for hand washing
 - Work surfaces easily cleaned
 - Bench tops are impervious to water
 - Sturdy furniture
 - Windows fitted with flyscreens
- Other design and construction issues:
 - Location – not separated
 - Structure – normal construction
 - Ventilation – no special requirements

ABSL-2實驗室，能夠應對哪些風險？

1. 嚙齒類動物使用的具有過濾閥蓋的實心材質飼育容器
2. 使用IVC、隔離飼育箱等設備，有效降低空氣傳播致病原在動物飼育區擴散
3. 使用正確隔離方式，避免節肢動物等有害生物進入

- Requirements:

- Laboratories have lockable doors
- Sink for hand washing
- Work surfaces easily cleaned
- Bench tops are impervious to water
- Sturdy furniture
- Biological safety cabinets installed as needed
- Adequate illumination
- Eyewash readily available
- Windows fitted with flyscreens
- Location - separated from public areas

實驗動物的動線需要考慮哪些？

哪些設備需要考慮通風與節能？

WHO Laboratory Biosafety Manual, 2004

- Ventilation – directional
 - Air flows into lab without re-circulation to non-lab areas

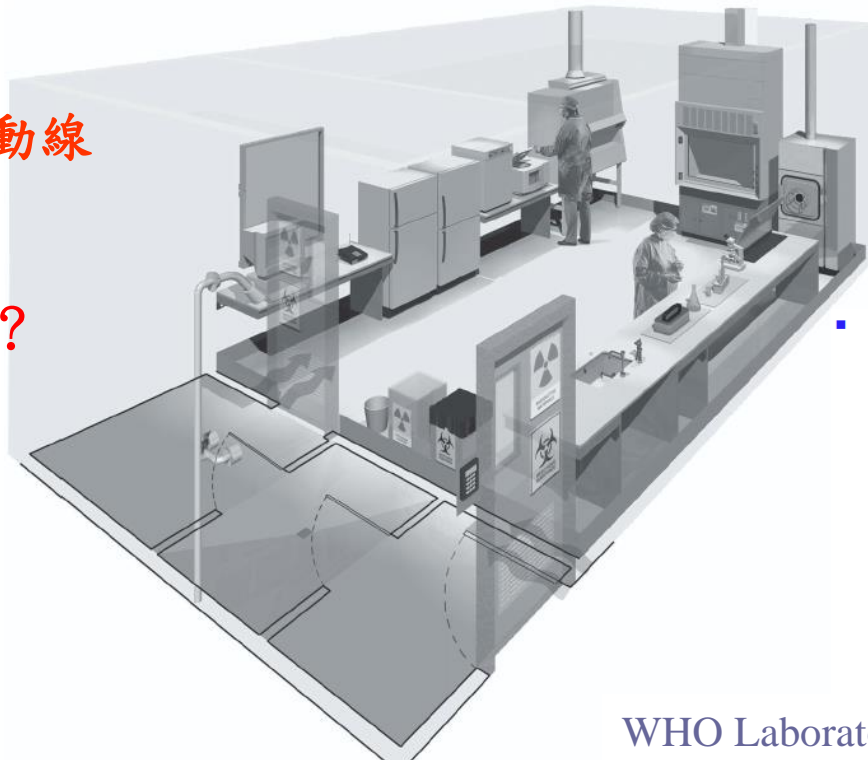
ABSL-3實驗室，能夠應對哪些風險？

1. 穿孔處(管線、門與門框周圍開口)，應該密封處理，預防蟲害、負壓洩漏且容易消毒清潔
2. 實驗室維持常時負壓運轉，每道屏障或實驗室之壓力值至少為-12.5 Pa
3. 動物飼養於隔離籠具系統，並且具有主動換氣功能

人員與污染物的動線
需要考慮哪些？

為什麼需要前室？
Single-pass air?
Double door?

排氣HEPA過濾？



全封閉的設計消防、
通風與節能如何兼顧？

Designing a BSL3 Facility,
Sandia national labs, 2007

- BSL-1 and 2 Facilities PLUS
 - Enclosures for aerosol generating equipment
 - Room penetrations sealed
 - Walls, floors and ceilings are water resistant for easy cleaning
 - BSC class II or III to manipulate infectious material
 - Separate building or isolated zone within a building
 - Directional inward airflow
 - Single-pass air
 - Double door entry
 - BSCs mandatory

試驗隔間、生物安全操作櫃與管道封實，阻絕空氣外流

Sealed pipe penetrations



BSL-3 lab in Canada



Baum, AIA, Biosafety Laboratories: Containment vs Exclusion, 2010



資料來源

- 編撰者：中原大學生物科技學系
陳怡寧 副教授
- 編修者：長榮大學 團隊-莊啓佑
- 參考資料：
 1. 生物性危害(96、100、102年度編修)
一大專校院實驗場所安全衛生考試中心
 2. 動物生物安全第一等級至第三等級實驗室安全規範(第一版)-
衛生福利部疾病管制署(103年)
 3. 感染性生物材料管理辦法
 4. 實驗室生物安全規範
 5. 衛生福利部疾病管制署 生物安全主管基礎訓練數位課程-
感染性生物材料管理法規、動物作業安全及大規模作業



案例分享

生醫2-痢疾桿菌外溢。



災害經過

- A學生於8月7日，自P2實驗室冷凍櫃取SH2308與SH2308-10A二菌於無菌操作台沾菌於培養皿上，劃開四區後置入37°C incubator中培養。8月8日自培養皿選一菌落接種於培養液中，再置入37°C incubator中培養。8月9日取出菌液，依抽取細菌genomic DNA流程抽取DNA，進行至proteinase K步驟。8月10日完成proteinase K步驟之後續步驟，所抽取DNA於-20°C冰箱中存放。8月11日該生回家後發病掛急診，8月17日糞便檢體痢疾桿菌呈陽性反應。8月18日疾管博士自實驗室取該生最近三株痢疾桿菌與該生糞便分離株之分子分型(PFGE)比對。8月21日分析結果證實與一實驗菌株PFGE型相同。

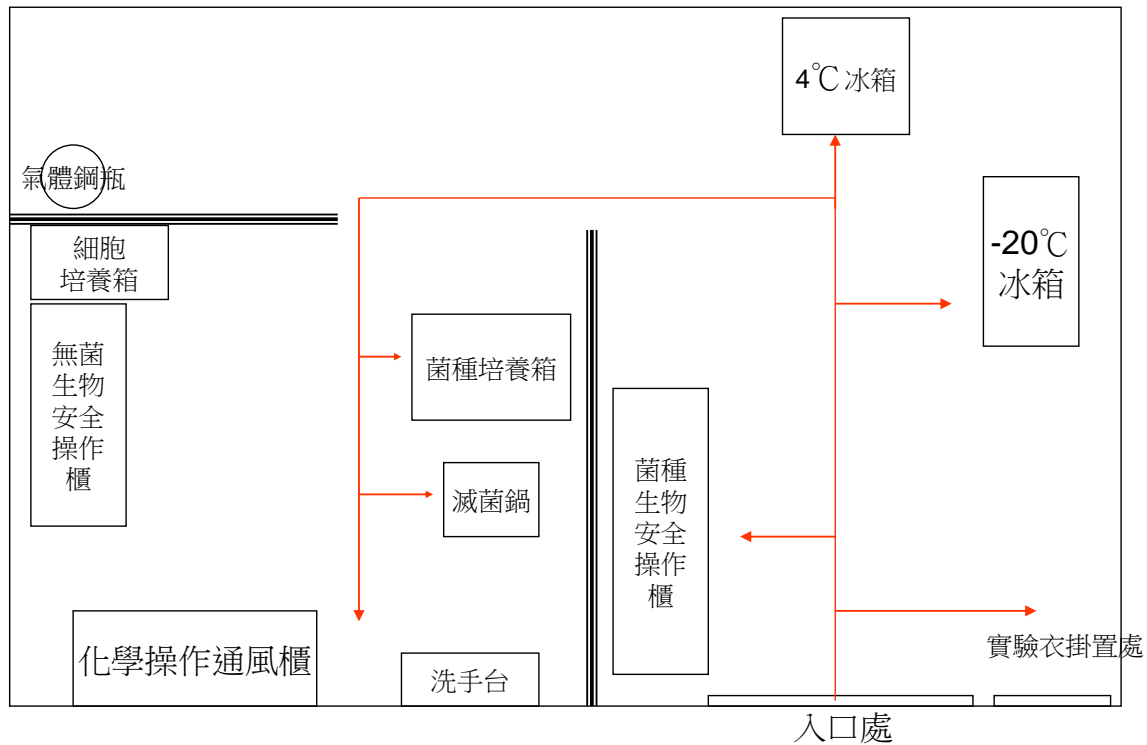


現場概況

- 經現場勘查無菌操作台是從上方經濾網進氣，下方於於檯面前後緣各有一吸氣帶，將氣吸引經濾網過濾於室內排氣，如圖A1或B1)。經現場模擬操作狀況發現必須打開玻璃屏幕，以雙手伸入氣櫃內操作，以香測試發現操作時若培養皿放置位置於無菌操作台中央時，玻璃屏幕稍高，煙會往外溢散，若培養皿放置位置較靠外緣，煙亦會往外溢散。另根據實驗操作程序顯示培養皿必須在操作台與incubator間開開關關移動數次。實驗廢棄物以操作台內UV照射後置於塑膠袋內綁好後放置於冰箱，幾天後一併處理。

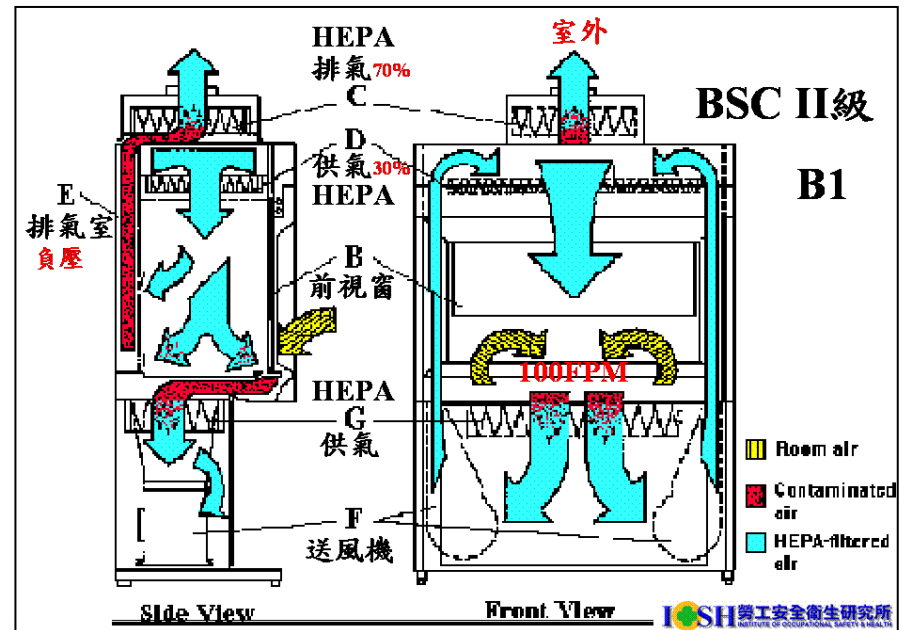
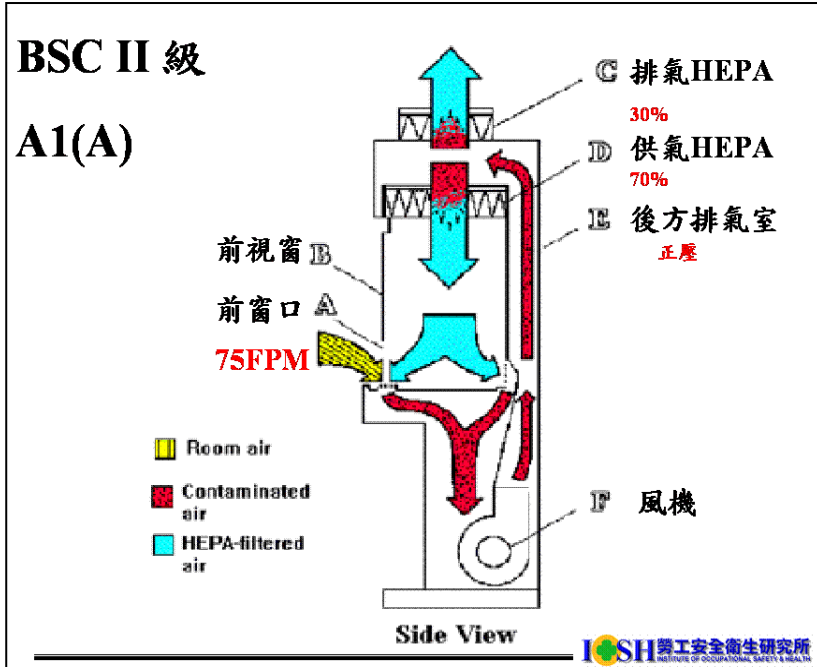


實驗室配置圖



P2實驗室動線圖

A1及B1





現場圖示



P2實驗室入口處



P2實驗室無菌操作台





現場圖示

-4°C冰箱(存放實驗廢棄物)



P2實驗室 -20°C冷凍櫃





災害原因分析

- 直接原因
 - 痢疾桿菌外溢。
- 基本原因
 - 未建立菌株處理實驗室標準規範。



災害原因分析

• 間接原因

- 無菌操作台功能不佳，未能完全防止氣流外洩。
- 實驗室操作流程動線規劃欠佳。如操作者之操作程序顯示細菌培養皿必須在操作台與incubator間數度往返開開關關移動數次。操作者必須於操作完畢後再進入洗手台洗手消毒後，必須再經過操作的污染區才會離開P2實驗室，可能有暴露菌種感染的風險。
- 在生物操作櫃操作時可能因操作者太靠近前緣吸風口處，以香測試有洩漏或溢出的風險，間接吸附或殘留在實驗衣上。
- 操作者處理廢棄物時會先以UV照射三十分鐘後才打包放入4°C冰箱暫存，但操作者的乳膠手套可能有暴露或接觸菌種的風險。



防災對策及建議事項

1. 所有需開啟的門（房門、冰箱、櫃子..）儘量更改成能不以手操作為原則，洗手台也應改為自動或腳動，屋內設備儘量簡單，以不設抽屜為宜。
2. 建議實驗室動線可做適度修正，將P2實驗室等含洗手台、菌種操作櫃、菌種培養箱、-20°C冰箱、4°C冰箱以及滅菌鍋統一置於P2實驗室內，與其他細胞培養等生物操作櫃區隔。操作者進出實驗室均能洗手消毒完成，可避免再次穿越操作的污染區。另外實驗衣於每次實驗結束後可進行簡易酒精消毒，並定期清洗及滅菌消毒，保持實驗衣清潔，避免菌種殘留感染。
3. 實驗操作各流程建立標準步驟(含廢棄物處理的流程)，新手進入實驗室前須接受相關教育訓練。
4. 應邀請專家學者開會討論P2實驗室標準規範，如菌種操作櫃本身設計改善，符合P2實驗室規格的生物操作櫃。菌株處理安全衛生標準作業程序。
5. 辦理相關研討會對大專院校相關實驗室人員進行教育訓練。
6. 邀請專家學者對有相關實驗室之學校進行輔導改善。