

病原微生物实验室的生物安全

谈 智

江苏省疾控中心消媒所

南京 2019.10.23

- 生物安全相关法律法规及国家标准
- 生物安全实验室分类
- 生物安全与生物安全柜
- 生物安全柜的使用原则与方法

一、生物安全相关法律法规及国家标准

- 《病原微生物实验室生物安全管理条例》
- ——2004年11月12日 温家宝总理签发国务院令
- ——2018年3月19日李克强总理签发修正版（修改涉及7个条文）
- 《可感染人类的高致病性病原微生物菌毒种或样本运输管理规定》（2005卫生部令45号）
- 《人间传染的高致病性病原微生物实验室和实验活动生物安全审批管理办法》（2006卫生部令50号）

- 《人间传染的病原微生物菌（毒）种保藏机构管理办法》（2009卫生部令68号）
- 《人间传染的病原微生物名录》（卫生部文件（2006第15号）
- 《高致病性病原微生物实验室资格审批工作程序》（2007第162号）
- 《人间传染的病原微生物菌（毒）种保藏机构指定工作细则》（卫生部文件2011第43号）
- 《江苏省病原微生物实验室生物安全管理规定（试行）》

- GB19489-2008 《实验室 生物安全通用要求》
- GB50346-2011 《生物安全实验室建筑技术规范》
- WS233-2017 《病原微生物实验室生物安全通用准则》
- WS 589-2018 《病原微生物实验室生物安全标识》
- WS315—2010 《人间传染的病原微生物菌（毒）种保藏机构设置技术规范》
- YY0569-2011 《Ⅱ级生物安全柜》替代YY0569-2011 《生物安全柜》

■ 造成实验室的生物安全事故的三方面原因：

- 第一是实验室的**硬件环境**未达到要求；
- 第二是实验室的**管理**未到位；
- 第三是实验室的**操作人员**未遵守规范。

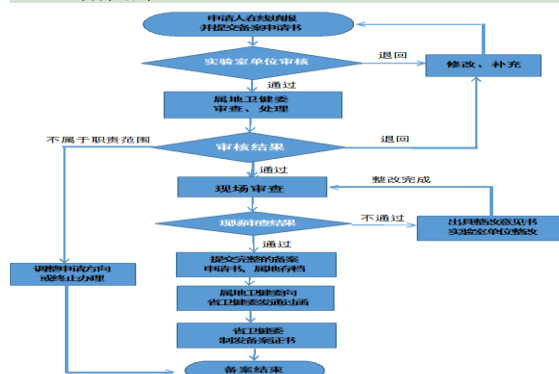
管理系统的登陆和使用

登陆路径：江苏省卫生健康委员会官网——应用系统——江苏省生物安全实验室备案管理系统。

备案网址：<http://218.94.1.78:81/jssys/news/>



备案流程



二、生物安全实验室的分类

- 根据操作对象的生物危害程度，分为一级、二级、三级、四级生物安全实验室。
- 低个体危害、低群体危害（涉及第四类病原微生物，通常情况下不会引起人类或动物疾病）——一级生物安全
- 中等个体危害、有限群体危害（涉及第三类病原微生物，能够引起人或动物疾病，但一般情况下对人和动物或环境不构成严重危害，传播风险有限，实验室感染后很少引起严重疾病，并具备有效治疗和预防措施的微生物）——二级生物安全



- 高个体危害、低群体危害（涉及第二类病原微生物，能够引起人类或动物严重疾病，比较容易直接或间接在人与人、动物与人、动物与动物间传播的微生物）——三级生物安全
- 高个体危害、高群体危害（涉及第一类病原微生物，能够引起人类或动物非常严重的疾病，以及我国尚未发现或已宣布消灭的微生物）——四级生物安全



- **生物安全实验室建筑规范(GB50346-2011)规定：**
根据所操作致病性生物因子的传播途径可分为a类和b类
a类：操作**非经空气传播**生物因子的实验室
b类：操作**经空气传播**生物因子的实验室
b1类：可**有效利用安全隔离装置**进行操作
b2类：**不能有效利用安全隔离装置**进行操作

三、生物安全与生物安全柜

- 近年来的研究认为：实验室**65%的不明原因感染**是因为病原微生物形成**感染性气溶胶**随空气扩散，工作人员**吸入**了污染的空气感染的。
- 实验室中，许多操作都可以产生气溶胶，有人对239种操作进行了测试，其中可以产生气溶胶的操作占86.6%。搅拌、振荡、撞击、离心、超声波破碎、接种等都可产生气溶胶，实验室微生物气溶胶的产生，大多数是在不知不觉中形成的。

- 生物安全防护设施要有标准的硬件条件
- 生物安全柜是一种对操作人员、样品和环境提供安全保护的安全设备，也是实验室生物安全中一级防护屏障中最基本的安全防护设备。



生物安全实验室选用生物安全柜的原则：
GB50346-2011

防护类型	选用生物安全柜类型
保护人员，一级、二级，三级生物安全防护	I 级、II 级、III 级
保护人员，四级生物安全防护，生物安全柜型	III 级
保护人员，四级生物安全防护，正压服型	II 级
少量的、挥发性的放射和化学防护	II 级B1、排风室外的 II 级A2
挥发性的放射和化学防护	I 级、II 级B2、III 级

不同级别、种类生物安全柜与
排风系统的连接方式

生物安全柜级别	工作口平均进风速度 (m/s)	循环风比例 (%)	排风比例 (%)	连接方式
I 级	0.38	0	100	密闭连接
II 级	A1 0.38~0.50	70	30	可排到房间或套管连接
	A2 0.50	70	30	可排到房间或套管连接或密闭连接
	B1 0.50	30	70	密闭连接
	B2 0.50	0	100	密闭连接
III 级	—	0	100	密闭连接

GB50346-2011生物安全实验室建筑技术规范

- 生物安全柜的几个误区及引发的安全问题
- 误区一：洁净工作台代替生物安全柜



超净台



二级生物安全柜

- 超净工作台：依据JG/T292-2010 洁净工作台 检测

洁净工作台 clean bench
一种箱式局部空气净化设备，由箱体、风机、预过滤器、高效（或超高效）空气过滤器及电器控制系统组成。在工作状态下能始终保持工作空间内的风速、空气洁净度、噪声、振动和照明等性能参数满足使用者的要求。

- 生物安全柜：依据YY0569-2011 II 级生物安全柜 检测

生物安全柜 biosafety cabinet
防止操作过程中含有危险性生物气溶胶散逸的负压空气净化排风柜。

■ 洁净工作台和生物安全柜具有本质区别

- 洁净工作台将通过高效过滤器的净化空气向下吹过工作区，**用来保护样品**，由于工作区是正压区，气流通过操作窗口外溢，**只保护样品，而对操作人员和环境不提供保护**，如操作含有任何已知或潜在致病气溶胶，都会给操作人员带来极大隐患。
- 生物安全柜是一种负压净化工作台，可以防止操作者和环境暴露于实验室过程中产生的有害气溶胶，正确地操作生物安全柜，**能够完全保护操作人员、样品、工作环境**。



■ 误区二：生物安全柜的选择不当

根据结构设计、排风比例和保护对象和程度不同，生物安全柜分为Ⅰ级、Ⅱ级和Ⅲ级，其中Ⅱ级又分为A1、A2、B1、B2型。不同级别的生物安全实验室应选用不同级别的生物安全柜，也可根据要保护、防护的不同类型来选择适当的安全柜。

- YY0569-2005《生物安全柜》中规定了Ⅰ级、Ⅱ级和Ⅲ级生物安全柜的要求
- YY0569-2011《生物安全柜》中只规定了Ⅱ级生物安全柜的要求（A1、A2、B1、B2型）



表1 生物安全柜分类

级别	类型	排风	循环空气比例 %	柜内气流	工作窗口进风平均风速 m/s	保护对象
Ⅰ级	—	可向室内排风	0	乱流	≥0.40	使用者和环境
Ⅱ级	A1型	可向室内排风	70	单向流	≥0.40	使用者、受试样本和环境
	A2型	可向室内排风	70	单向流	≥0.50	
	B1型	不可向室内排风	30	单向流	≥0.50	
	B2型	不可向室内排风	0	单向流	≥0.50	
Ⅲ级	—	不可向室内排风	0	单向或乱流	无工作窗进风口，当一只手套筒取下时，手套口风速≥0.7	主要是使用者和环境，有时兼顾受试样本

■ 表格来源于YY0569-2005《生物安全柜》，目前被YY0569-2011替代

- 在**操作少量挥发性化学试剂或放射性核素**时，可选择**Ⅱ级B1型**生物安全柜；**操作大量挥发性化学试剂或放射性核素**时，必须使用**Ⅱ级B2型**生物安全柜。
- 目前全世界应用最广的是Ⅱ级A2型安全柜，它能够满足医院和实验室的一般用途，另外，从节能角度也较为经济。



- 在实际工作中，很多单位认为设备选型应具有一定的超前性，常常在A2型能满足应用的情况下选用B2型，造成问题很多。
- 首先B2型安全柜排气量达到每小时1600立方（型号不同有差异），**如果房间没有足够的补充风量，安全柜根本无法正常工作**。有很多实验室无奈只好打开门开机，这不符合实验室规范要求；此外，室内空气大量外排，要保证实验室内温度满足实验要求，需要空调和加热器的负荷非常大，现已建好的实验室根本无法满足，也造成能源浪费。



- 还有些单位在选择安全柜时被一些所谓“新功能”的广告宣传误导。
- 例如没有双路电源的情况下，选择带电动前窗的安全柜存在风险。**安全柜在无双路供电系统情况下，如果突然停电，电动窗无法关闭，有害物外泄会造成污染。**
- 安全柜的选择应主要从安全柜的性能考虑，如根据高效过滤器、风路设计、报警装置、负压保护等指标比较安全柜的优劣，而不应被广告的宣传所误导。



■ 误区三：安全柜安装问题多多

- 生物安全柜的理想位置：应位于远离人员活动，物品流动以及可能会扰乱气流的地方。
- 生物安全柜两侧、后侧应留30 cm，顶部留出足够30~35 cm的空间；为减少气流扰动，保证安全柜正常工作，**生物安全柜应放置在远离实验室入口、门窗、暖气、走道，避开送风口，避免外界气流对柜内气流造成扰动。**



- 购置Ⅱ级A2生物安全柜后，误以为排风管道连接到室外比排到室内安全。

- 实际情况：生物安全柜排风出口带有高效过滤器，所排出的气体被证明是安全的，对室内环境没有影响；另外，将室内舒适工作环境的洁净空气排到室外会大大增加运行成本。因此，**除了操作危险度较高的实验对象或能产生化学气味的化学试剂，Ⅱ级A2生物安全柜排风排到室内是安全可行的。**

- 生物安全柜放置的房间必须有足够的送风量。
- Ⅱ级A2排气量约在700~1200 m³/h，B2则在1000~1600 m³/h,有的型号更高，**如果没有足够的补充送风，生物安全柜所在房间成为高负压状态，生物安全柜无法正常工作。**



■ 生物安全柜排风管道的连接：

- Ⅱ级A2型生物安全柜排风管以前采用硬连接，可能存在的问题：
A2型生物安全柜使用**密闭硬管连接到带抽风机的排风系统时，其安全运行完全依赖于排风系统**，如当排风的速度升高或降低，生物安全柜内不平衡发生变化，会产生污染环境、样品的严重后果。
- 美国NSF49:2002标准中**禁止Ⅱ级A2生物安全柜使用密闭硬管连接。**
- **如果Ⅱ级A2安全柜外排气体时，建议排风管采用套管连接，套管安装在生物安全柜的排风管上，与安全柜高效过滤器之间保留2.5 cm的缝隙，以便让房间的空气也能吸入到建筑物的排风系统中，这种连接方式是最安全的连接方式，柜内的气流平衡独立于排风系统，无论排风系统如何波动柜内气流平衡都不会受到影响。**



■ Ⅱ级B2必须通过硬管连接。

- 密封地连接到排风系统上，**排风系统的排风量和静压必须与安全柜制定要求一致。在安装有多个Ⅱ级B型生物安全柜时，应各自使用独立的排风管道，不能共用排风管道。**



■ 误区四：有生物安全柜，就一切“OK”了

- **安全柜的使用和局限应向每个操作者说明，严格按照要求操作。**如使用提前开机“自净”、柜内物品的摆放合理、定期保养验证等。当操作失误或发生泄漏、破损时，生物安全柜不能够保护操作者。
- **生物安全柜前的空气幕很脆弱，极易受到干扰而造成污染。**
- 实验中不能随意开启前窗的位置，操作动作缓和，手臂避免频繁出入安全柜，以防止打扰气流。在安全柜工作时，开关房门、人员在房间内走动、甚至在操作人员背后咳嗽等都会形成湍流而增加微生物气溶胶溢出量，而造成实验室污染。



- **严格遵照微生物学标准操作规程和生物安全实验室操作规程，并使用规范的实验器材。**

■ 做好个人防护（对于生物防护级别高的操作）

个人防护是防止实验室气溶胶感染的最后一道防护，通常由物理防护和疫苗免疫两种，物理防护主要是对呼吸道和眼睛的防护，如防风镜（眼罩）、口罩、防护面罩、正压头盔和正压工作服等。

■ 做好生物安全柜的管理

生物安全柜投入使用后，其管理是一项重要的工作，也是一项薄弱的环节。

由于设备人员、实验人员责任界限不清，疏于管理，给实验室安全带来极大隐患，必须建立科学的管理制度，严格执行，责任落实到人，并进行监督，确保实验室安全。



■ 误区五：生物安全柜监控成空白

■ 生物安全柜的检测时机：

生物安全柜在**安装完毕**、
生物安全柜**移动位置后**、
生物安全柜**检修后**、
生物安全柜**更换高效过滤器后**、
生物安全柜**一年一度的常规检查及安全评估**。
——GB50346-2011《生物安全实验室建筑技术规范》、
WS233-2017《病原微生物实验室生物安全通用准则》

■ 检测项目：

表 10.2.3 生物安全柜、动物隔离设备等现场检测项目

项 目	工 况	执行条款	适用范围
垂直气流平均速度	正常运 转状态	本规范第10.2.4条	Ⅱ级生物安全柜、单向流解剖台
工作窗口气流流向		本规范第10.2.5条	Ⅰ、Ⅱ级生物安全柜、开敞式解剖台
工作窗口气流平均速度		本规范第10.2.6条	
工作区洁净度		本规范第10.2.7条	Ⅱ级和Ⅲ级生物安全柜、动物隔离设备、解剖台
高效过滤器的检漏		本规范第10.2.10条	三级和四级生物安全实验室内使用的各级生物安全柜、动物隔离设备等必检，其余建议检测
噪声		本规范第10.2.8条	各类生物安全柜、动物隔离设备等
照度		本规范第10.2.9条	

四、生物安全柜的使用原则与方法

1、使用原则：

- (1) 柜内尽量**不要使用明火**！
- (2) **缓慢移动原则**：为了避免影响正常的风路状态，柜内操作时手应该尽量平缓移动。
- (3) **避免震动原则**：柜内尽量避免震动仪器（例如离心机、旋涡振荡器等）的使用。
- (4) **不同样品柜内移动原则**：柜内两种及以上物品需要移动时，一定**遵循低污染性物品向高污染性物品移动原则**，避免污染性高的物品在移动过程中产生对柜体内部的大面积污染。

2、生物安全柜正确使用方法：

- (1)、操作前应本次操作所需的全部物品移入安全柜，避免双臂频繁穿过气幕破坏气流；并且在移入前用70%酒精擦拭表面消毒，以去除污染。

工作前准备：

开紫外线灯30min

关紫外线灯，开安全柜的日光灯和风机

将实验所需物品集中用消毒剂擦拭后放在台面相应位置

等待5min，净化工作区的空气污染物

(2)、安全柜内不放与本次实验无关的物品。

柜内物品摆放应做到清洁区、半污染区与污染区基本分开，操作过程中物品取用方便，且三区之间无交叉。物品应尽量靠后放置，但不得挡住气道口，以免干扰气流正常流动。

- (3)、操作时应按照从清洁区到污染区进行，以**避免交叉污染**。为防可能溅出的液滴，可在台面上铺一用消毒剂浸泡过的毛巾或纱布，**但不能覆盖住安全柜格栅**。

- (4)、柜内操作期间，**严禁使用酒精灯等明火**，以避免产生的热量产生气流，干扰柜内气流稳定；且明火可能损坏HEPA滤器。

(5)、工作时尽量减少背后人员走动以及快速开关房门，以防止安全柜内气流不稳定。

(6)、在实验操作时，不可打开玻璃视窗，应保证操作者脸部在工作窗口之上。在柜内操作时动作应轻柔、舒缓，防止影响柜内气流。



(7)、工作完成后，关闭玻璃窗，保持风机继续运转10~15分钟，同时打开紫外灯，照射30分钟。

(8)、柜内使用的物品应在消毒后再取出，以防止将病原微生物带出而污染环境。试验结束后，及时清理工作台面。



(9)、一旦实验过程中产生溢出物，用纸巾置于其表面吸附清理，并同时在上面洒上足够浓度的消毒液及时消毒。

从安全柜内部拿取可能产生污染的物品时，一定要进行表面消毒处理。



■ (10)、将产生气溶胶的器皿尽可能摆放在安全柜工作区靠里的位置。

洁净的物品应放置在距离产生气溶胶器皿至少150mm外，降低交叉污染的可能性。

将盛有样品的试管或试盘的表面密封以防止下沉气流侵袭样品。



(11)、使用生物安全柜后，对安全柜内壁、后壁、工作台面、去水盘表面及前窗内侧进行消毒处理。

使安全柜进行一段时间的气体空排后，关闭前操作窗口并开启紫外灯消毒。

(12)、安全柜应定期进行检测与保养，以保证其正常工作。工作中一旦发现安全柜工作异常，应立即停止工作，采取相应处理措施，并通知相关人员。



3、生物安全柜内的溢洒处理：

依据：GB19489-2008《实验室生物安全通用要求》

- 处理溢洒物时不要将头伸入安全柜内，也不要将脸直接面对前操作口，而应处于前视面板的后方。选择消毒剂时需要考虑消毒剂对生物安全柜的腐蚀性和消毒剂对试验操作的病原微生物的有效性。
- 如果溢洒的量不足1ml时，可直接用消毒剂浸湿的纸巾（或其它材料）擦拭。



■ 如溢洒量大或容器破碎，建议按如下操作：

- (1) 使生物安全柜保持开启状态；
- (2) 在溢洒物上覆盖吸水材料，喷洒消毒剂，至少静置30分钟后，用镊子清除吸水材料和玻璃碎片，再次喷洒消毒剂消毒污染区域，作用一定时间以发挥消毒作用。必要时，用消毒剂浸泡工作表面以及排水沟和接液槽；
- (3) 在安全柜内对所戴手套消毒后，脱下手套。如果防护服已被污染，脱掉所污染的防护服后，用适当的消毒剂清洗暴露部位；
- (4) 穿好适当的个体防护装备；



- (5) 小心将吸收了溢洒物的纸巾（或其它吸收材料）连同溢洒物收集到专用的收集袋或容器中，并反复用新的纸巾（或其它吸收材料）将剩余物质吸净；破碎的玻璃或其它锐器要用镊子或钳子处理；
- (6) 用消毒剂擦拭或喷洒安全柜内壁、工作表面以及前视窗的内侧；作用一定时间后，用洁净水擦干净消毒剂；
- (7) 如果需要浸泡接液槽，在清理接液槽前要先报告实验室负责人；可能要用其它方式消毒后再进行清理。如果溢洒物流入生物安全柜内部，需要评估后采取适用的措施。



谢谢

