

# P2, P2+實驗室建構及設備之規範要求

鄭詠仁 博士  
台灣生物安全協會秘書長  
工研院機械所

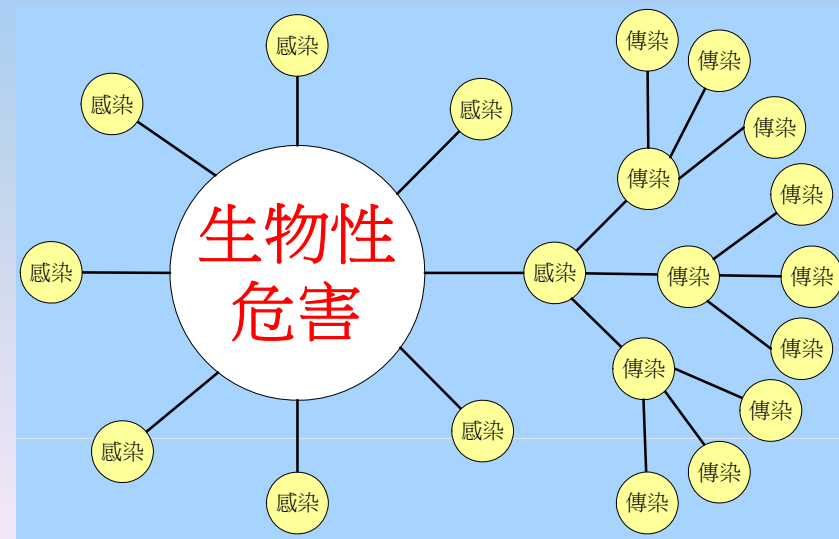
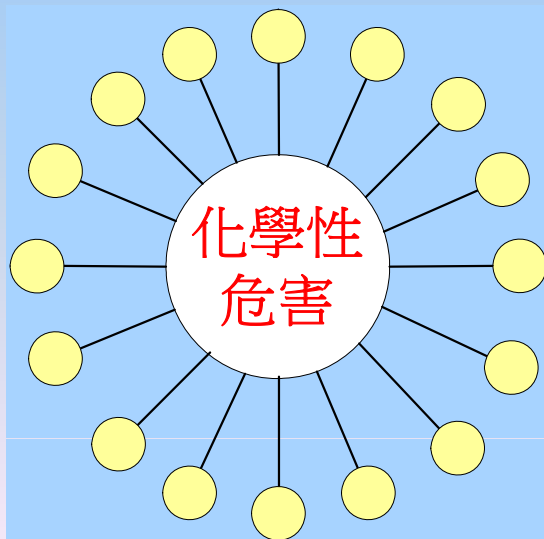
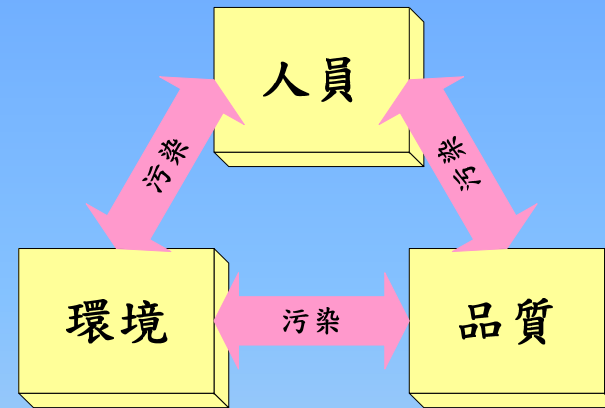
# Presentation Outline

- Risk Assessment and BSL (Biological Safety Level)
- Biosafety Containment
- Biosafety Lab. Guidelines



# 實驗室生物安全

- Biohazard
  - Range !
  - Unknowable !
  - Variable !



# Classification of Biohazards



As the level ↑ so does ;

- The risk of the organism to humans, animals, plants and/or the environment
- The procedural and facility requirements
- The level of containment required
- The degree of protection for personnel, the environment and the community.

# 風險評估因子

# 生物風險群組

# 生物安全等級

## 危害性

引起疾病的嚴重性

傳染便利性

傳染的途徑

對於其他種類的動物及植物可能的影響

## 特性

危害物質是否為原生種類

危害物的數量與分佈

## 反應性

目前是否存在有效療

治療藥劑或疫苗的存在量

人體的免疫作用

### RG-1

多數細菌  
枯草桿菌、酵母菌  
大腸桿菌K12型  
部分疫苗  
流行性感(1-2)...

### RG-2

大腸桿菌(1-2)  
登革熱  
肉毒桿菌  
腸病毒  
A、B、C、D、E肝病毒  
退伍軍人症...

### RG-3

炭疽桿菌  
結核菌  
HIV 1、2型  
日本腦炎  
漢他病毒  
SARS...

### RG-4

依波拉病毒  
剛果出血熱病  
拉沙熱病  
綠猴病(Marburg)  
...

### BSL-1

生物製劑不可能引致健康成人的疾病

### BSL-2

生物製劑能夠引致人類的疾病但很少會很嚴重，通常能有效預防或處理者

### BSL-3

生物製劑能夠引致嚴重危險、毀滅性的人類疾病，但通常能有效預防或處理者

### BSL-4

生物製劑能夠引致嚴重危險、毀滅性的人類疾病，並且通常無法有效預防或處理者

# Biological Safety Level

- Risk groups (RG) relate to but do not “equate” to the biosafety level (BSL) of laboratories designed to work with organisms in each RG

**BSL = RG Information**

**+ Practices & Techniques**

**+ Safety Equipment**

**+ Laboratory Facilities**



# 實驗室感染

## 工作性質

<b>Research</b>	<b>2,307</b>
<b>Diagnostic</b>	<b>677</b>
<b>Biological products</b>	<b>134</b>
<b>Teaching</b>	<b>106</b>
<b>Unspecified</b>	<b>697</b>
<b>total</b>	<b>3,921</b>

Pike之調查報告

## 意外性質

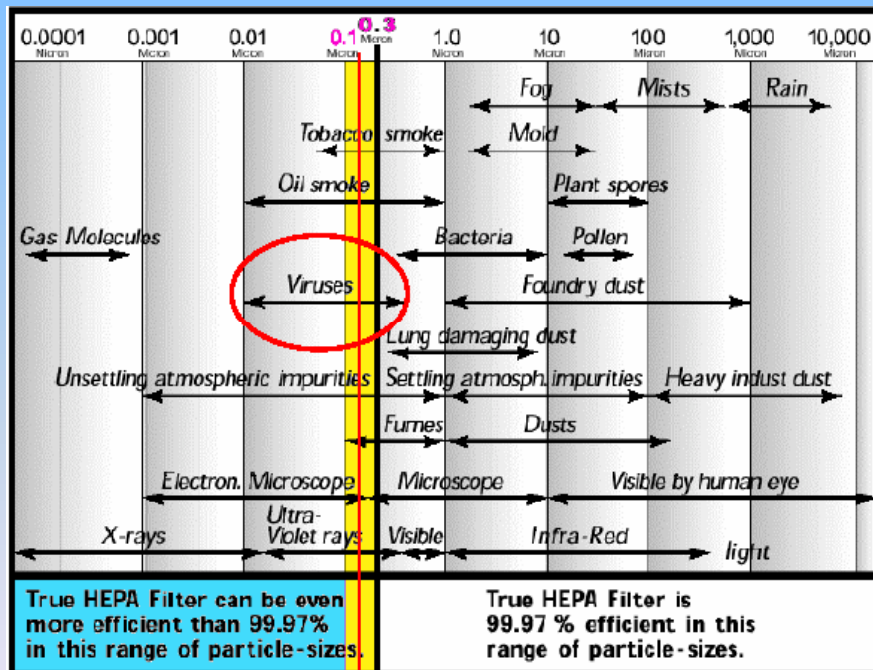
Accident	No. (%) of infections reported by:	
	Pike <sup>a</sup>	NADC <sup>b</sup>
Splashes and sprays	188 (26.7)	2 (5.9)
Needlesticks	177 (25.2)	3 (8.8)
Sharp objects	112 (15.9)	2 (5.9)
Animal or ectoparasite bite/scratch	95 (13.5)	2 (5.9)
Mouth pipetting	92 (13.1)	0
Other, unknown	39 (5.5)	25 (73.5)
Total	703	34

Sewell DL. *Clin Microbiol Rev* 1995;8:389-405.



# 生物微粒物理特性

## ● 大小、形狀、聚集、附著



Characteristics of unit-density particles at 20 °C , 1 atm

粒徑, dp (μ m)	重力沈降速度, V <sub>grav</sub> cm/s
0.01	$6.9 \times 10^{-6}$
<b>0.1</b>	<b><math>8.6 \times 10^{-5}</math></b>
1	$3.5 \times 10^{-3}$
10	$3.1 \times 10^{-1}$
<b>100</b>	<b><math>2.6 \times 10^1</math></b>

Source: Willeke & Baron, 1993

Drying Times for pure water droplets at 20 °C

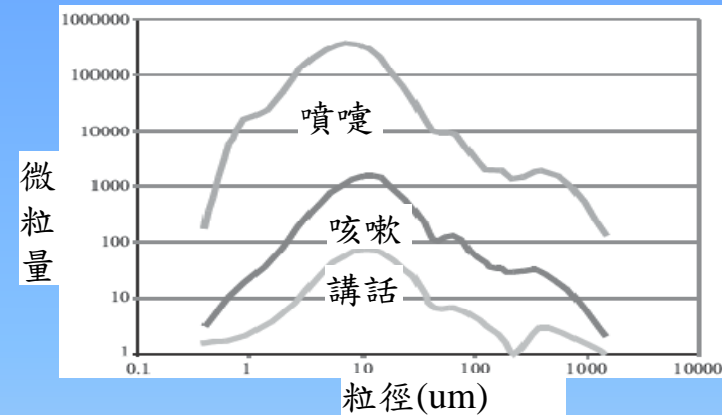
粒徑, dp (μ m)	Drying Time, (s)	
	RH=50 %	RH=100 %
10	0.1	$\approx 10^2$
60	6.8	
<b>100</b>	<b>10</b>	<b><math>\approx 10^4</math></b>

Source: Hinds, 1982



# Infectious Core

- Particles of diameters 1-3  $\mu\text{m}$  : 可長久懸浮不掉落
- 10  $\mu\text{m}$  需 17 分鐘
- 20  $\mu\text{m}$  需 4 分鐘
- 100  $\mu\text{m}$  僅需 10 秒鐘



圖、各動作產生之微粒量與分佈



Figure 2 Smoke visualization of exhalation flow from nose of the right mannequin penetrating into the breathing zone of the left mannequin, which are 0.4 m apart.<sup>94</sup> reproduced from Figure 12 in Reference<sup>94</sup> with the kind permission of Blackwell Publishing.



講話,  
1.0m/s

咳嗽,  
10m/s

噴嚏,  
100m/s

## Infectious Core

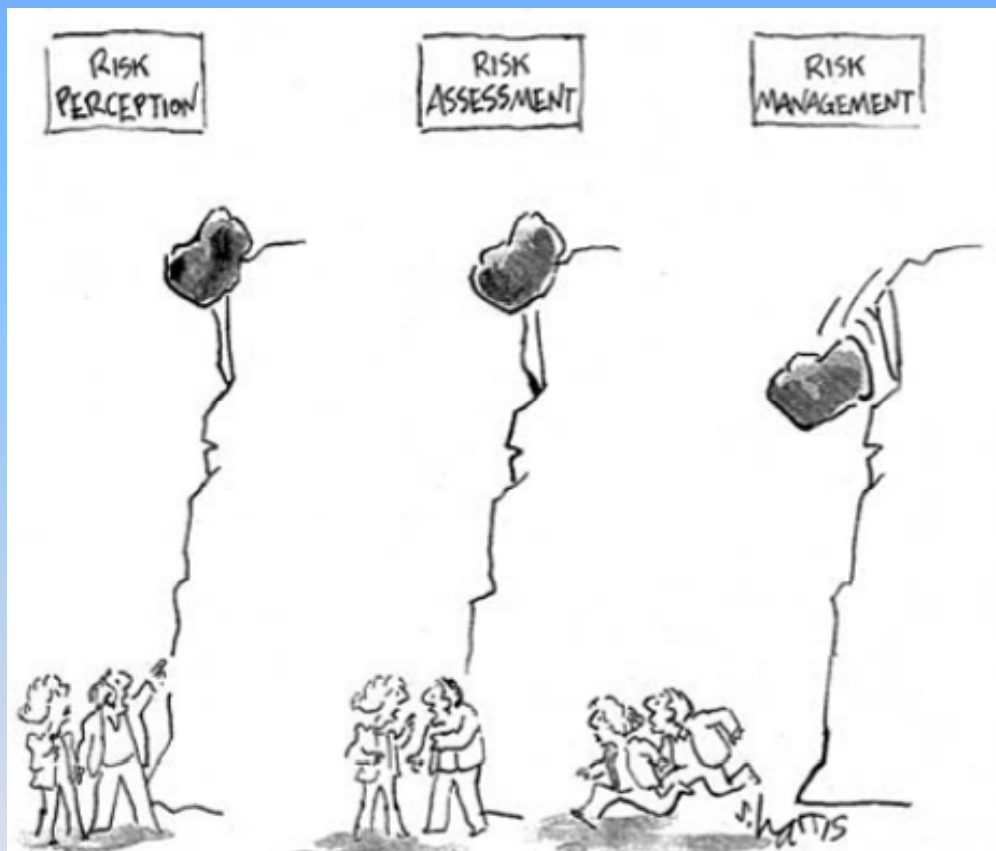
<50 $\mu\text{m}$ 微粒在空氣中蒸發，幾秒內形成1~10 $\mu\text{m}$ 懸浮感染核，造成在空間較為長時間的停滯。

# 具感染性的飛沫

含有感染源的飛沫

- 'Naked' (不含水或其他氣體) viruses: 0.02 to 0.3  $\mu\text{m}$
- Bacteria: 5 to 100  $\mu\text{m}$
- Fungal spores: 1 to 10  $\mu\text{m}$ ,
- diameters 1 ~3  $\mu\text{m}$  remained suspended almost indefinitely

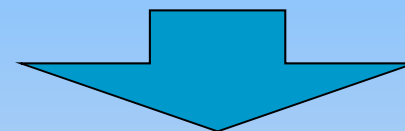
# Risk Assessment



Risk Assessment is the responsibility of the facility supervisor and the Principal Investigator

## ● JOB HAZARD ANALYSIS

- Laboratory supervisor
- Laboratory workers
- Biosafety officers
- Other specialists



## ● USES

- Facility design
- Personnel training
- Equipment expenditures
- SOP development and revision
- Incident investigation
- Laboratory Emergency response

# Aspects of Laboratory Safety

## ● *LABORATORY SECURITY*

- Card Key system
- Access rosters

## ● *CONTAINMENT FACILITIES*

- Air handling equipment
- Generator systems
- Barriers
- Positive-pressure
- protective suits
- Class III microbiological cabinetry

## ● *EMPLOYEE SAFETY*

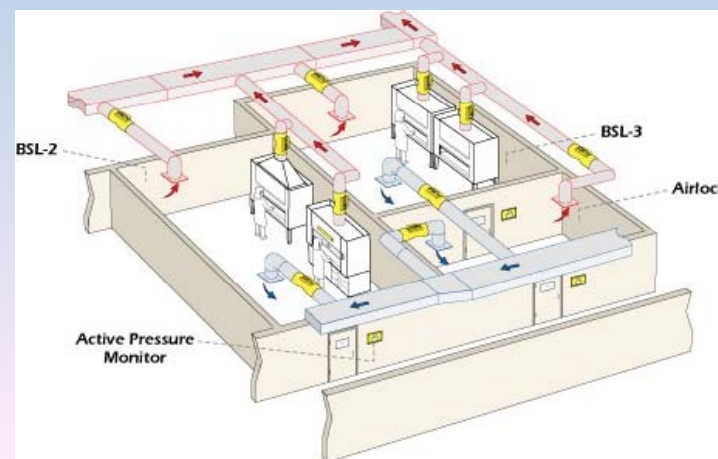
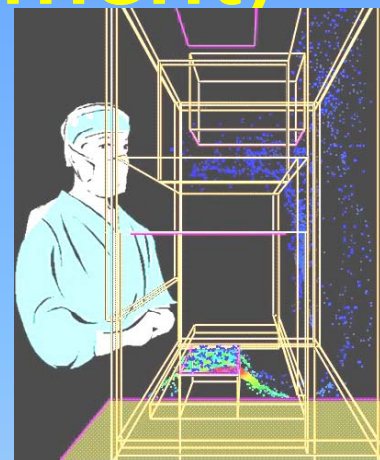
- Special immunizations
- Health screening
- Patient Isolation suite
- Training

## ● *ENVIRONMENTAL SAFETY*

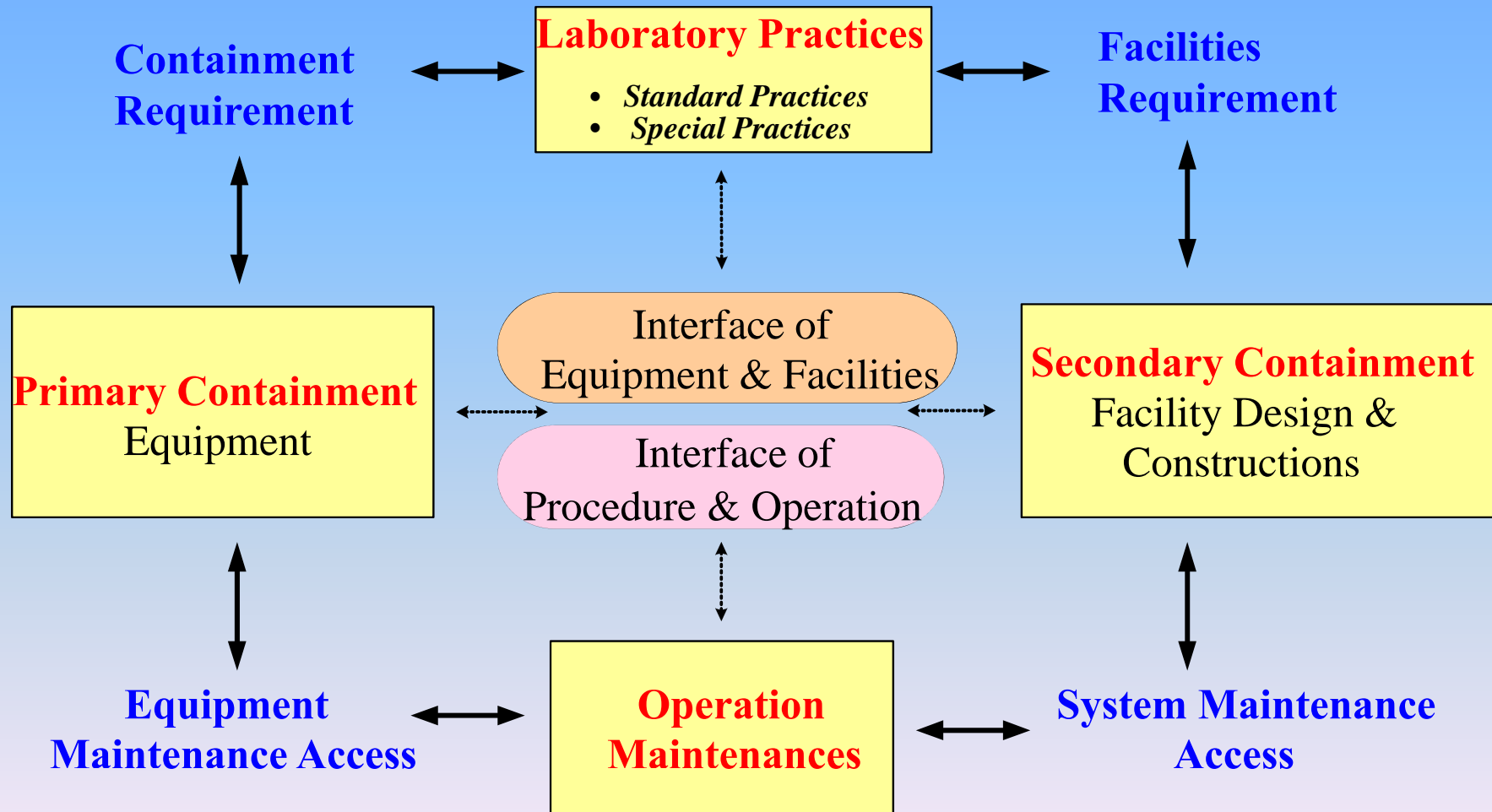
- Decontamination
- Air
- Liquids
- Solids
- Strict laboratory safety procedures

# 生物危害之圍阻 (Bio-hazard containment)

- 有害物質應被圍阻在設定的環境範圍內
- 使用生物安全櫃為控制氣流之第一道防護措施。
- 使用氣鎖、負壓、空氣濾網及備援機組附自動切換功能為第二道保護措施以防有害物質自動物室或工作環境意外造成洩漏。
- 提供各項告示裝置來指示操作條件為安全、臨界或不安全狀況對工作人員較有保障。
- 建議對重要之警報、流量及實驗室排氣櫃之窗框位置提供中央監控功能。

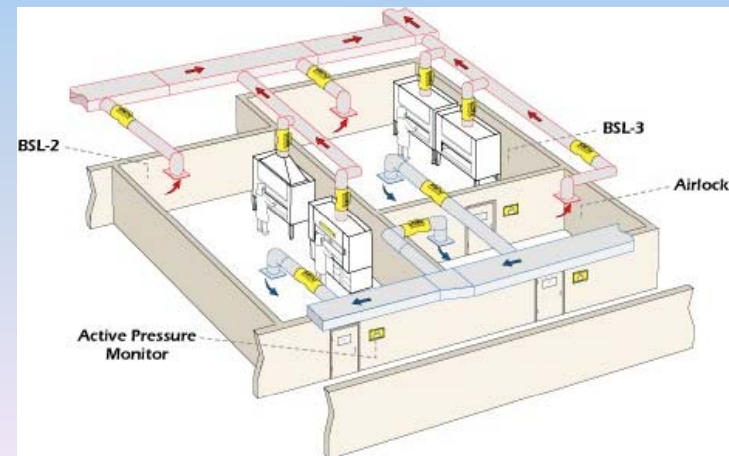
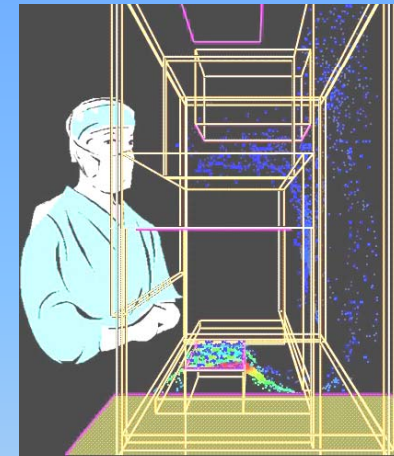


# Laboratory Biological Safety



# Biosafety Containment

- **Primary Containment** – contain the agent at the source
  - Biological safety cabinet
  - Animal caging
  - Specialized lab equipment (centrifuges, fermenters, etc.)
- **Secondary Containment** – contain the agent within the room or facility in case an agent escapes from the primary barriers
  - Building & Room Construction
  - HVAC Issues:
    - *Negative Pressure and Air Change*
    - *Directional airflow*
    - *Exhaust filtration*
  - Other Engineering Controls:
    - *Solid waste treatment*
    - *Wastewater treatment*





# 生物安全櫃(Biological Safety Cabinet, BSC)

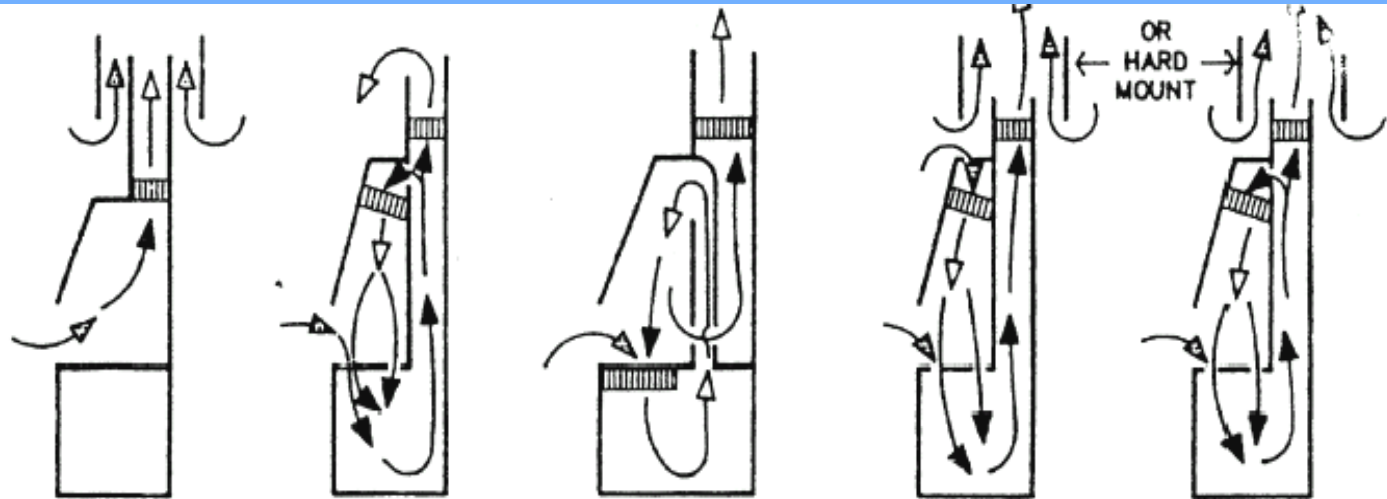
- 安全櫃為生技研究中，最基本之操作工具。
- 屬於初級屏障(Primary Containment)，為人員與試品直接接觸的平台。
- 依CDC/NIH標準，BSL-2級以上實驗室應使用經認證之二級安全櫃，以確保操作者安全。
- Swine Flu: *Biosafety Guidelines for Laboratory Workers / CDC, US*
  - Diagnostic work on clinical samples from patients who are suspected cases of swine influenza A (H1N1) virus infection should be conducted in a BSL-2 laboratory
    - All sample manipulations should be done inside a biosafety cabinet (BSC)
  - Viral isolation on clinical specimens from patients who are suspected cases of swine influenza A (H1N1) virus infection should be performed in a BSL-2 laboratory with BSL-3 practices (enhanced BSL-2 conditions)



# Primary Containment-BSC

**LEGEND**

- ▲ - CONTAMINATED AIR
- △ - ROOM AIR
- △ - HEPA-FILTERED AIR
- + - YES
- - NO
- U - USER
- P - PRODUCT
- ▨ - HEPA FILTER
- N/A - NOT APPLICABLE

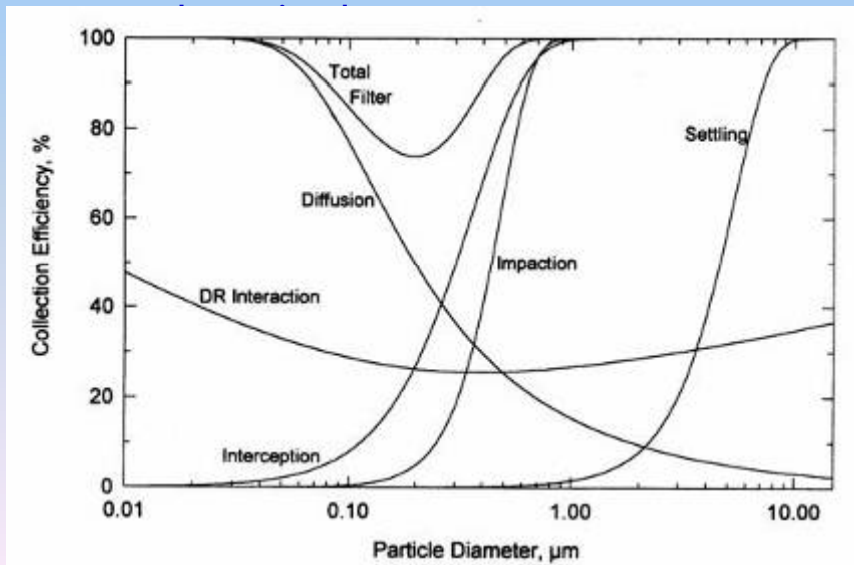


CLASS	I	II	II	II	II
TYPE	N/A	A1	B1	B2	A2
INFLOW (lfpm)	75	75	100	100	100
% RECIRCULATION	0	70	30	0	70
DOWNFLOW (lfpm)	0	75	50	80	68
EXHAUST (cfm/ft <sup>2</sup> )	50	45	65	65	65
USE: BIOHAZARDS	+	+	+	+	+
TOXIC, VOLATILES	+	-	+/-	+	+/-
PROTECTION	U	U/P	U/P	U/P	U/P

※ Laminar Flow (Clean Bench) ≠ BSC

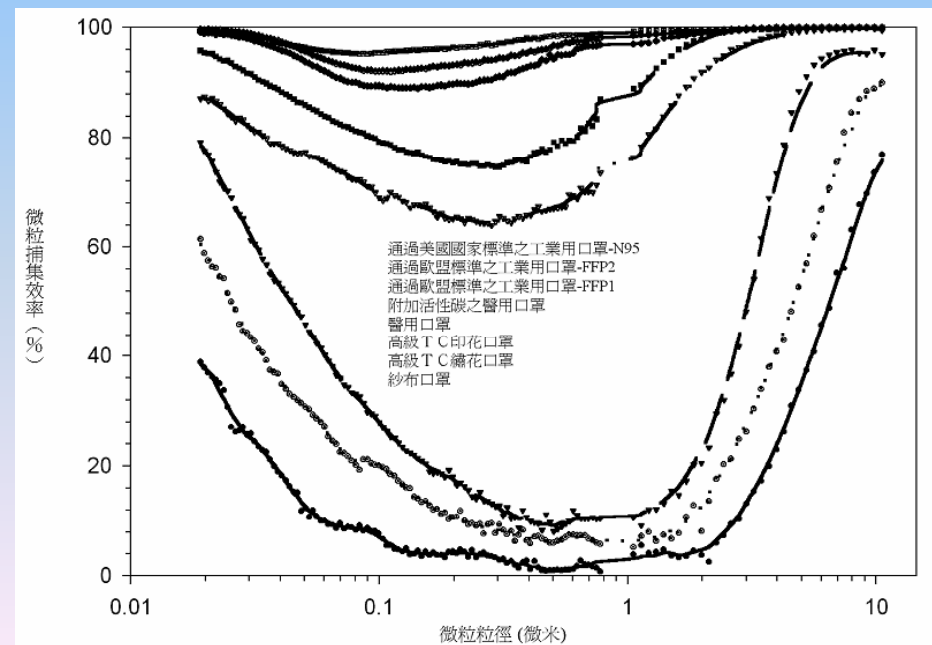
# Secondary Containment - Exhaust filtration

- High efficiency particulate air(HEPA) filter
  - Efficiently removes microscopic contaminants from air
  - Removes particles 0.3  $\mu\text{m}$  with a minimum efficiency of 99.97%
  - **DOES NOT** capture volatile

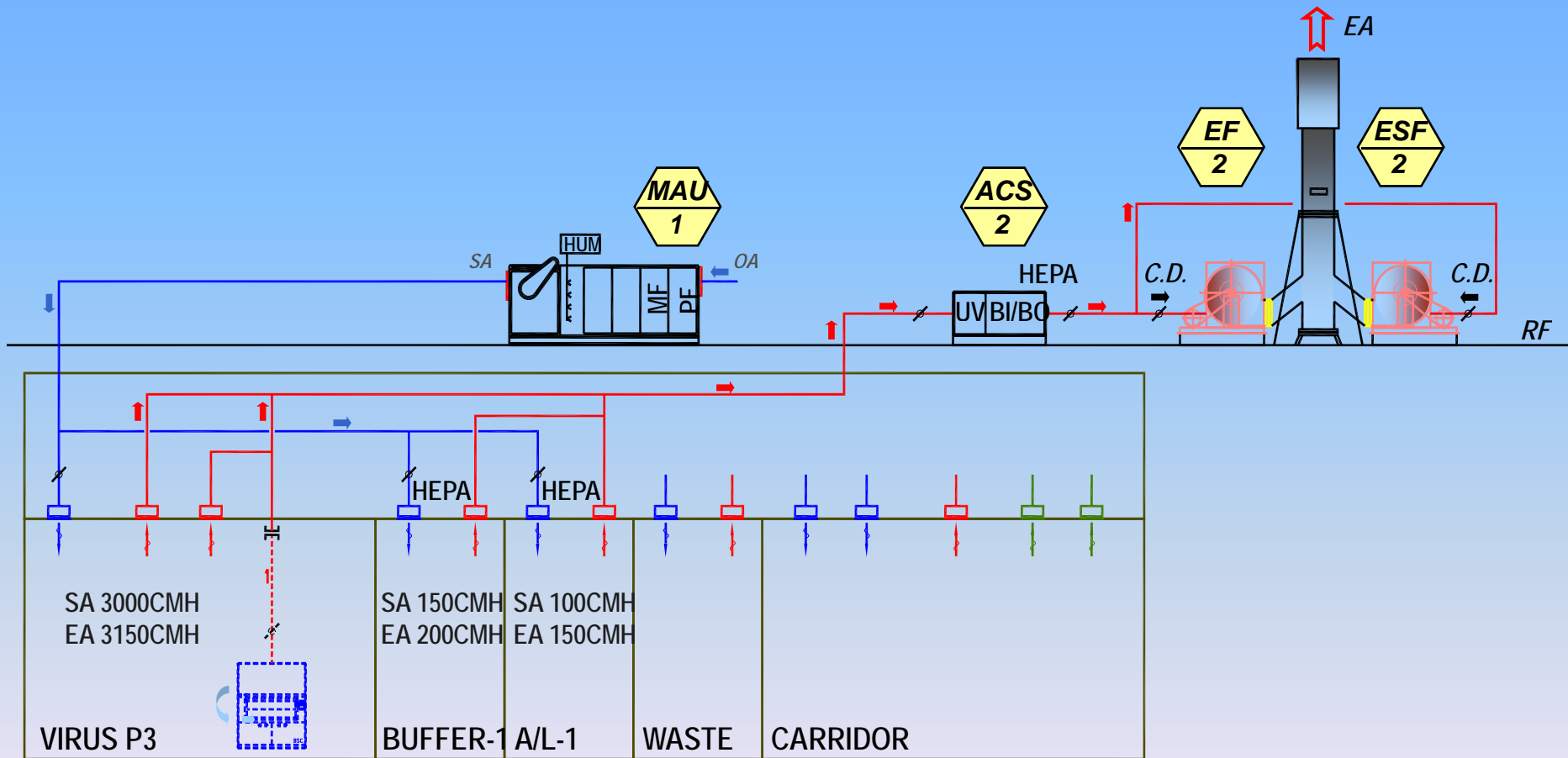


## ● Mask

通過美國國家標準之工業用口罩-N95  
通過歐盟標準之工業用口罩-FFP2  
通過歐盟標準之工業用口罩-FFP1  
附加活性炭之醫用口罩  
醫用口罩  
高級T C印花口罩  
高級T C繡花口罩  
紗布口罩

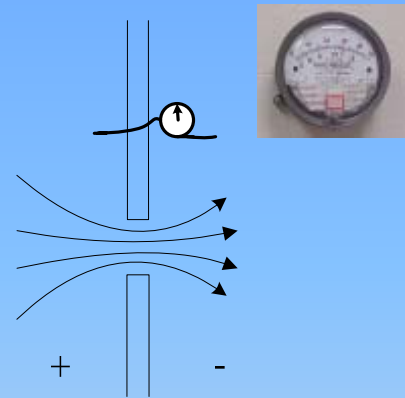


# Secondary Containment – HVAC&R System



BSC

# Secondary Containment - Negative Pressure

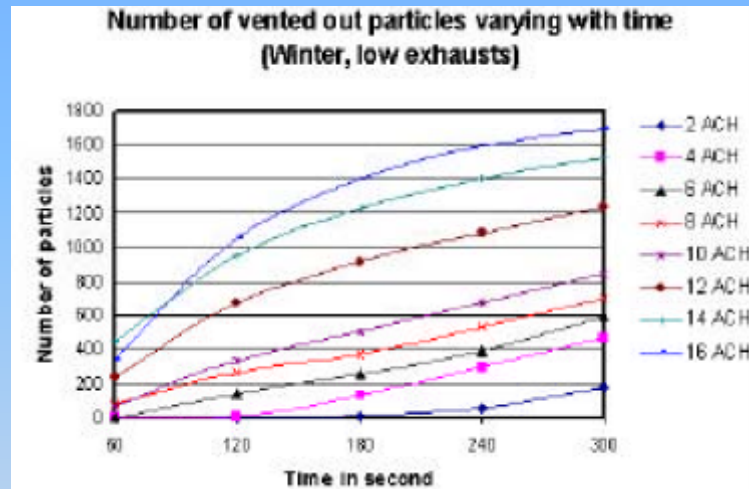


Space Types	Relative Pressure(a)	Remarks
Offices - conference rooms	(+ +)	
Corridors	(+ +)	
Dry laboratories	(+)	
Laboratories with fumehoods	(+)	
High hazard (volatile hazard)	(- -)	Hazard concern is fire or explosion
Clean areas (b)	(+ + +)	
Pathogen-free areas (b)	(+ + +)	
Animal rooms	0	
Biohazard rooms	(-)	Hazard concern is Biological

a - Outdoor ambient is -0-  
b - No particle rating

# Secondary Containment - Air Change Rate

## ● Dilute Contaminated Air



ACH	Time for Dilute Eff. (min)		
	90%	99%	99.9%
2	69	138	207
4	35	69	104
6	23	46	69
8	17	35	52
10	14	28	41
12	12	23	35
15	9	18	28
20	7	14	21
50	3	6	8

## ● Calculation of ACH (Air Change per Hour)

依空氣換氣次數計算：

$$Q_c = V \times N$$

式中  $Q_c$ : 室內空氣循環量 ( $m^3/hr$ )

$V$ : 室內體積 ( $m^3$ )

$N$ : 換氣率 (次/小時)

依氣流速度計算，

$$Q_v = V \times A$$

式中  $Q_v$ : 室內空氣循環量 ( $m^3/hr$ )

$v$ : 氣流速度 ( $m/hr$ )

$A$ : 房間面積 (或回風口總面積) ( $m^2$ )

# ACH And OA of HVAC System

Minimum Air Changes per Hour and Outside Air Rates\*

Type of Room	ACH Rate	Outside Air Rate	Outside Air to ACH Rate
General Office	4 to 10	20 cfm per person	—
Classroom	6 to 20	15 cfm per person	—
Corridor	—	0.10 cfm per sq ft	—
Auditorium	4 to 15	15 cfm per person	—
Cafeteria	12 to 15	12 cfm per person	—
Hospital Rooms			
Patient	4	—	1/3
Protective Isolation	15	—	1/3
Infectious Isolation	6	—	1/3
Laboratories			
Biochemistry	6 to 10	—	1/3
Animal	10 to 15	—	100%
Autopsy	12	—	1/6
Chemical Storage Room	6	—	1/3

*Source.* American Society of Heating, Refrigeration and Air-Conditioning Engineers (ASHRAE); HVAC (heating, ventilation, and air-conditioning); Applications 1995 and American National Standards Institutes (ANSI)/ASHRAE Standard 62-1989).

\**Note.* ACH =air changes per hour; cfm = cubic feet per minute.

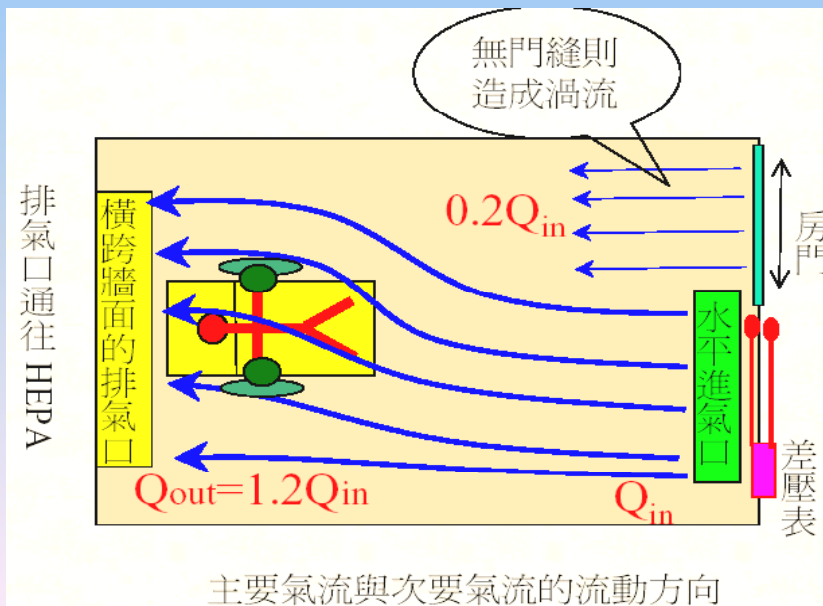
# Secondary Containment

## - Directional airflow

### Functions

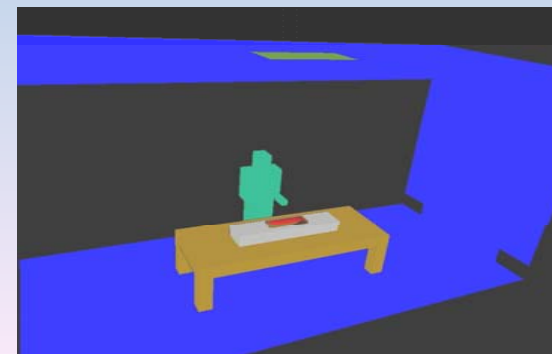
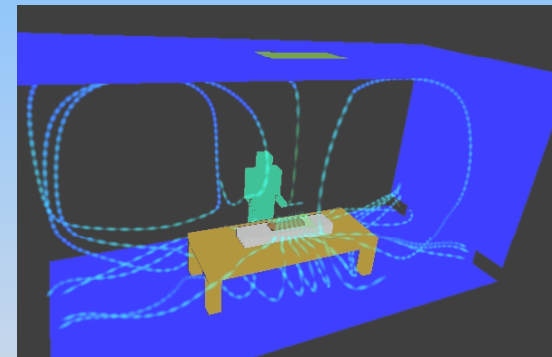
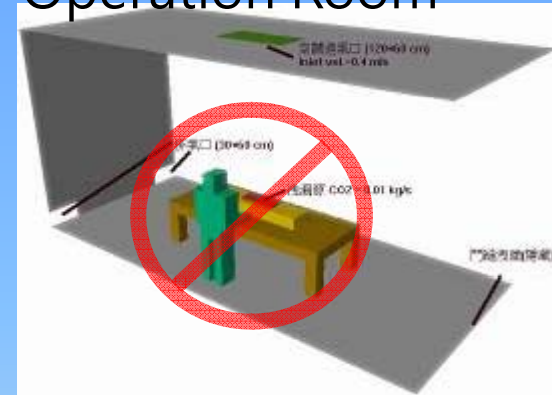
- Reduce indoor vortex
- Speed up the contaminant exhaust
- Improvement Efficiency of HVAC

### Directional Flow in Isolation Room



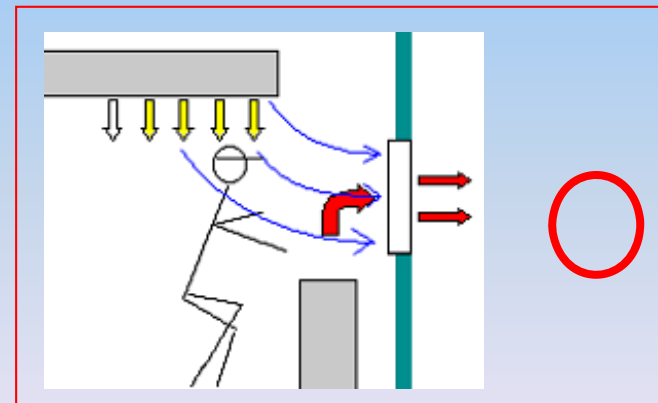
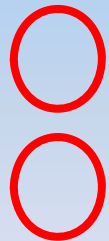
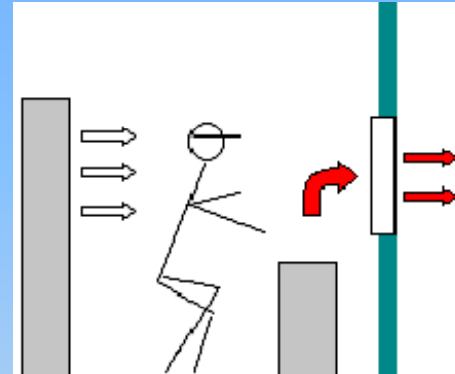
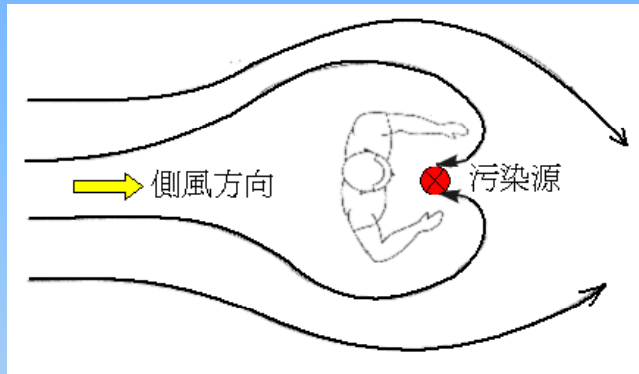
Ref:<http://www.IOSH.org.tw>

### Circulation Flow in Operation Room





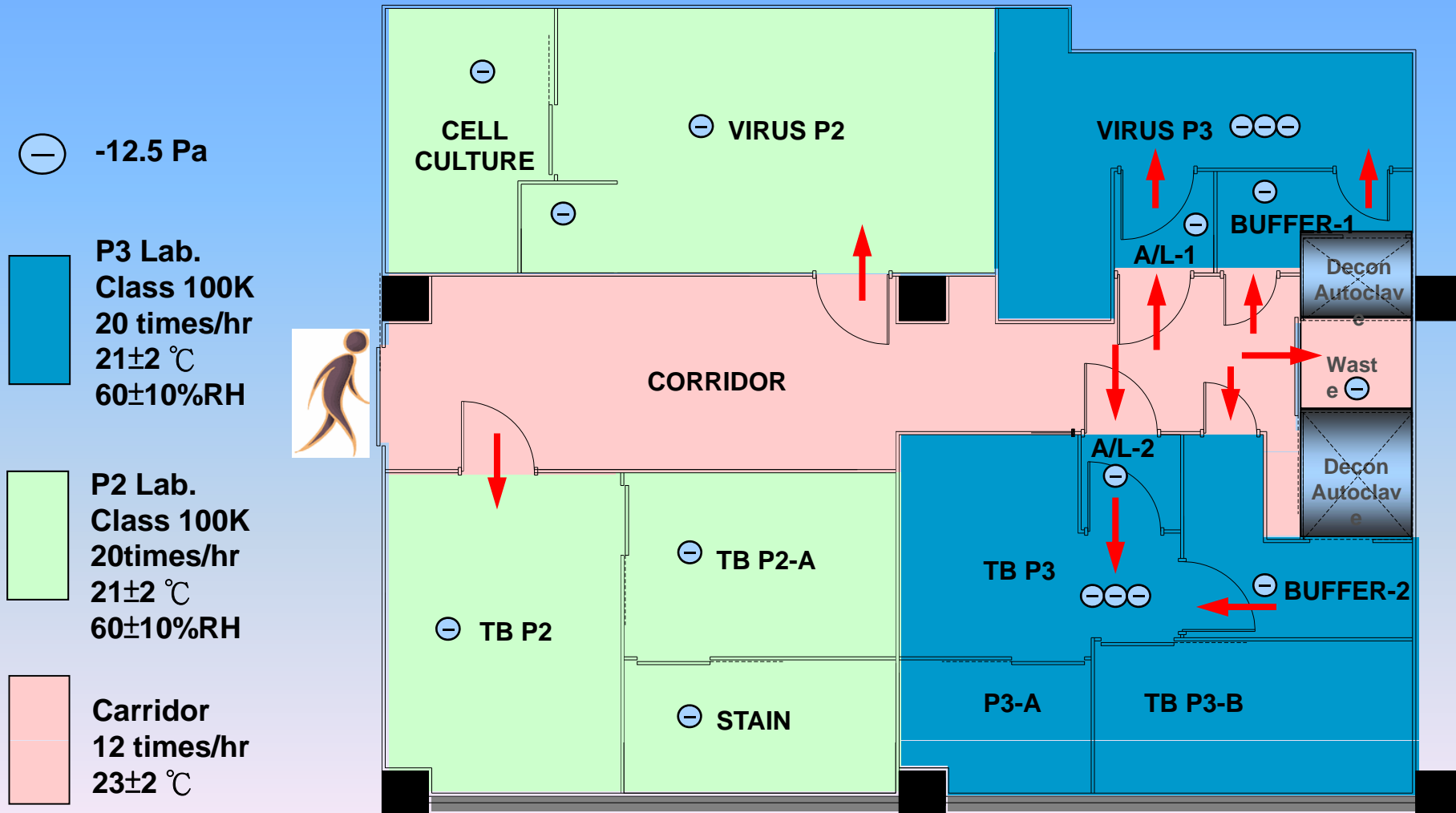
# 補氣風向與有害物累積



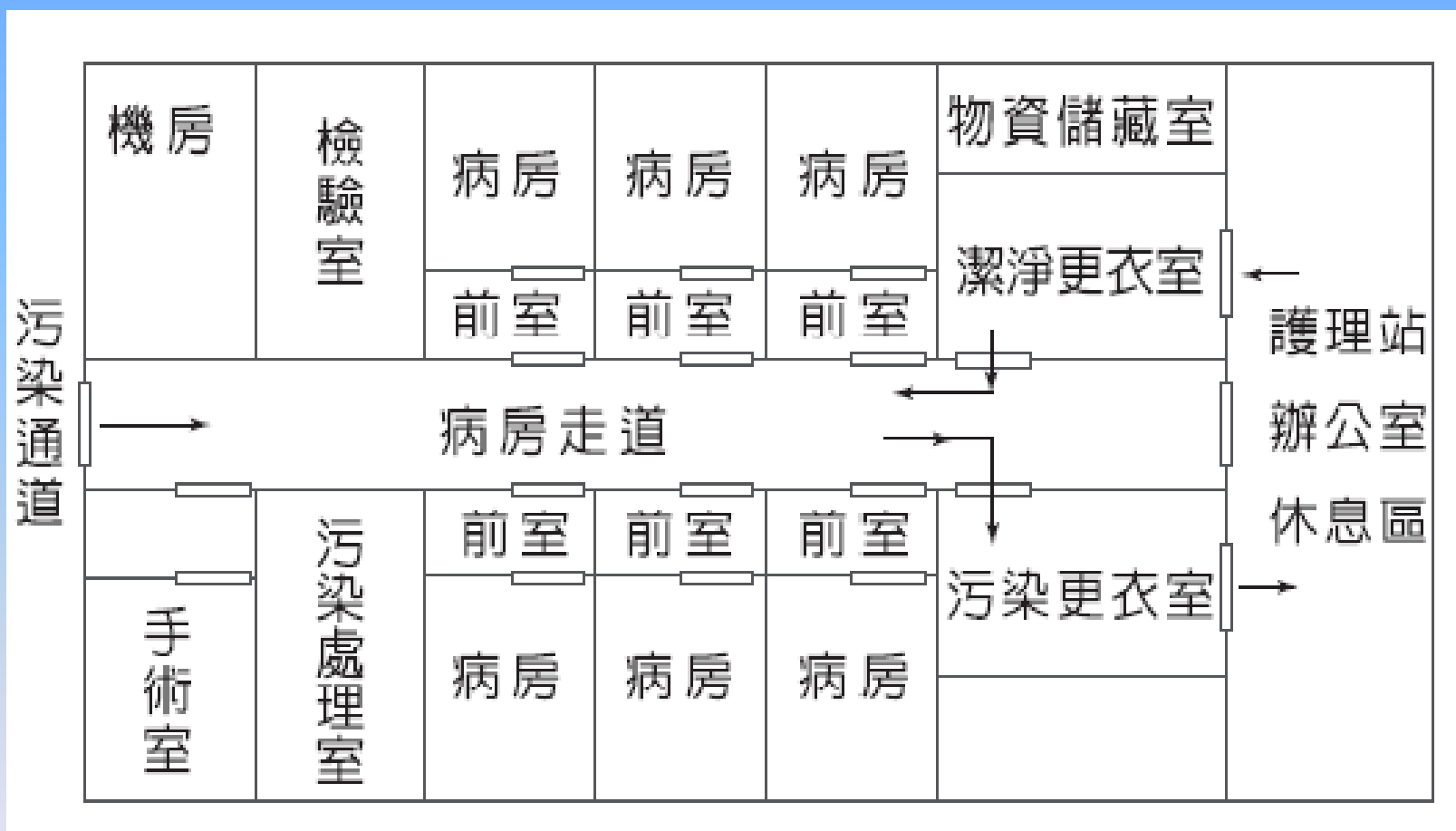
Ref:IOSH.org



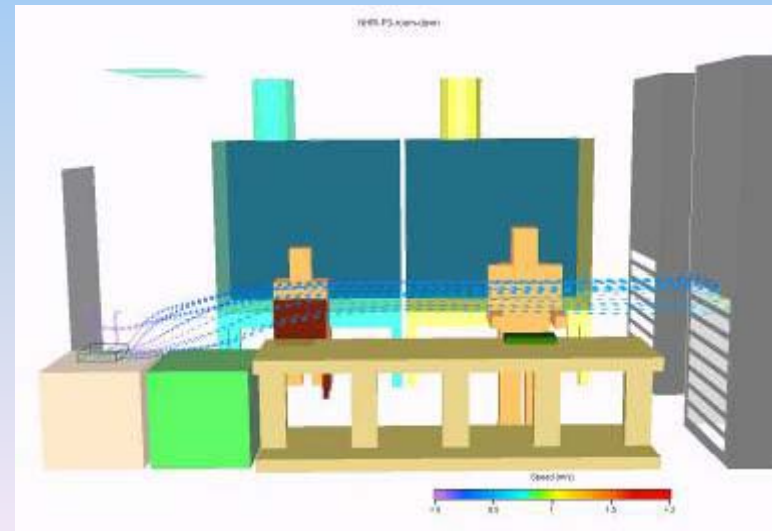
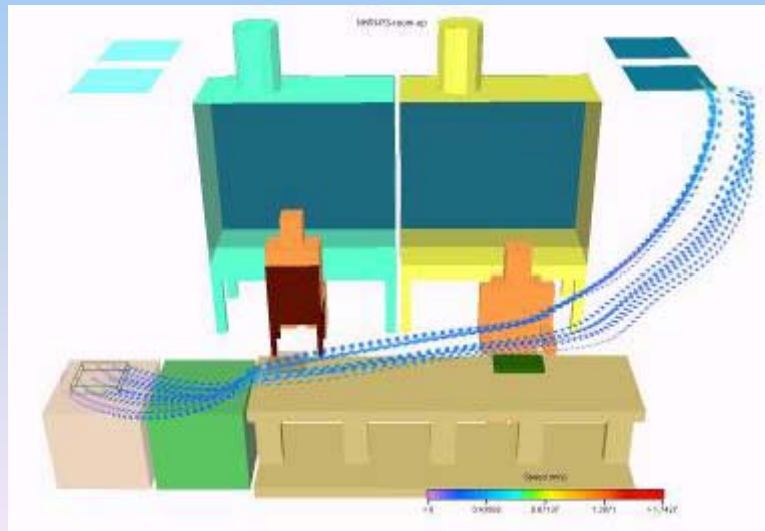
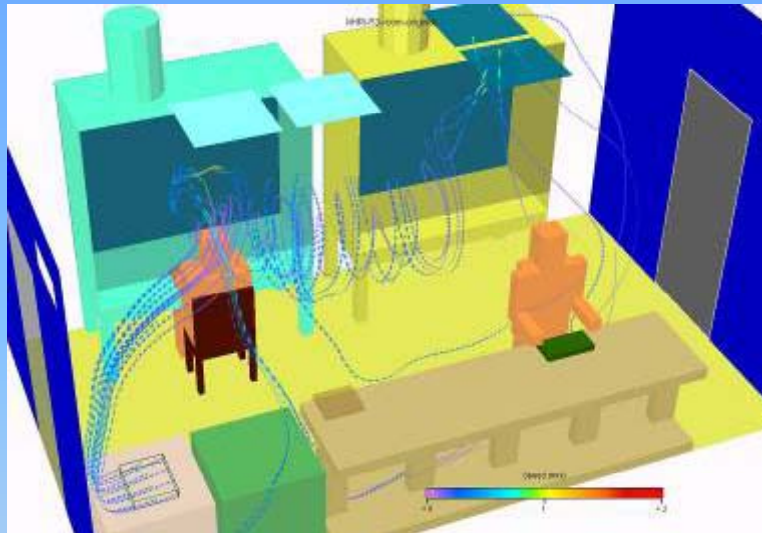
# Flow of Air Suggestion



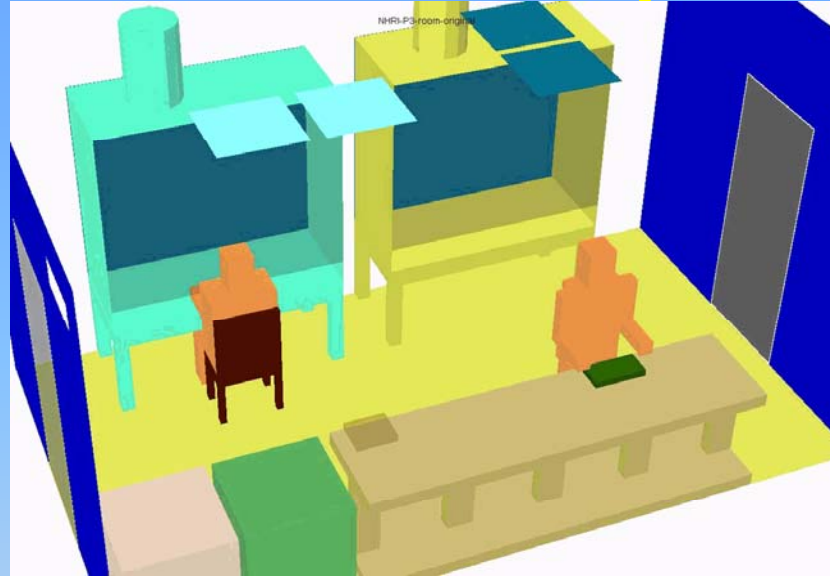
# 負壓隔離病房空間對策



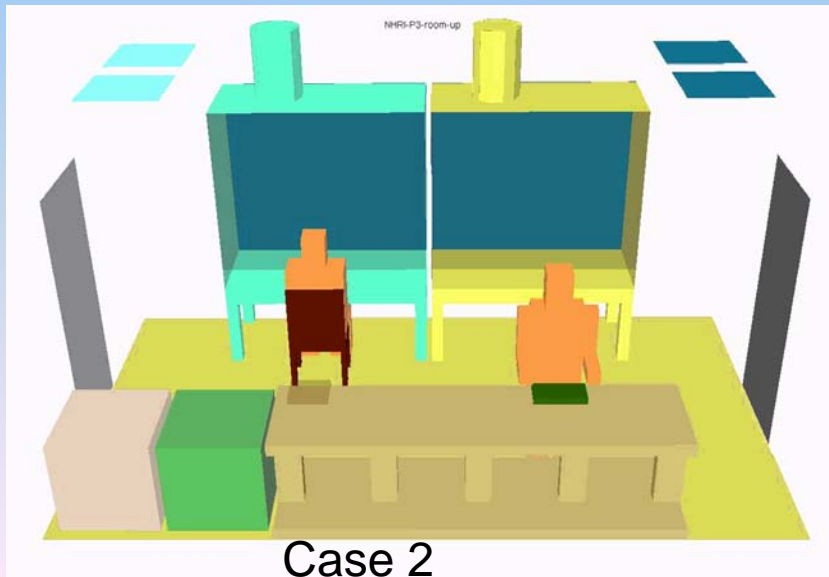
# Particle diffusion in Laboratory



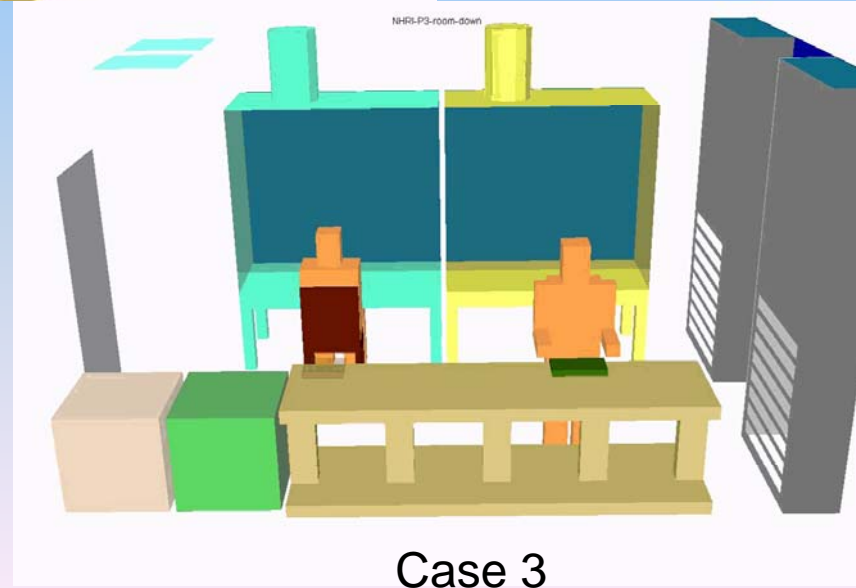
# Contaminant Diffusion in Laboratory



Case 1

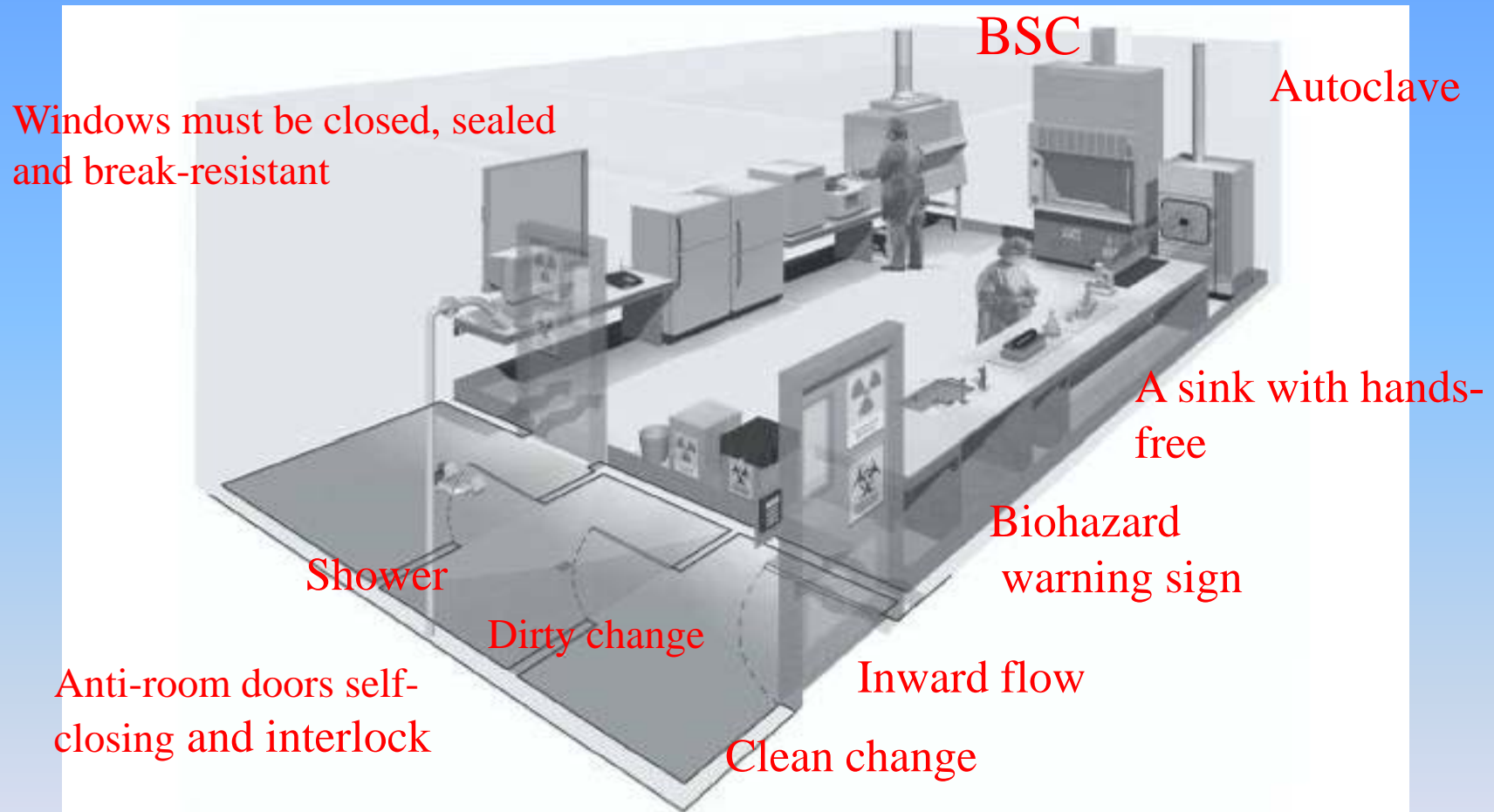


Case 2



Case 3

# A Typical BSL-3 Laboratory



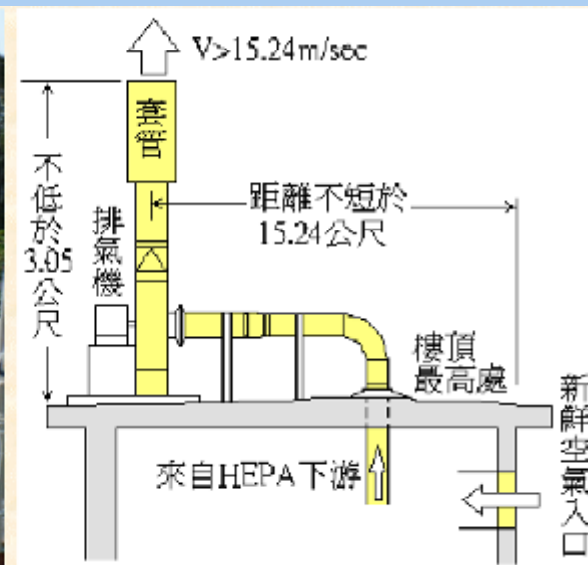
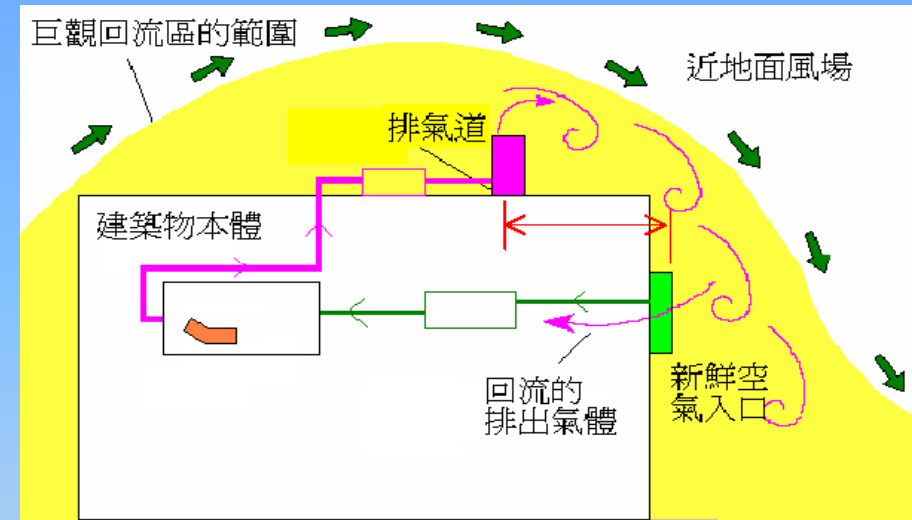
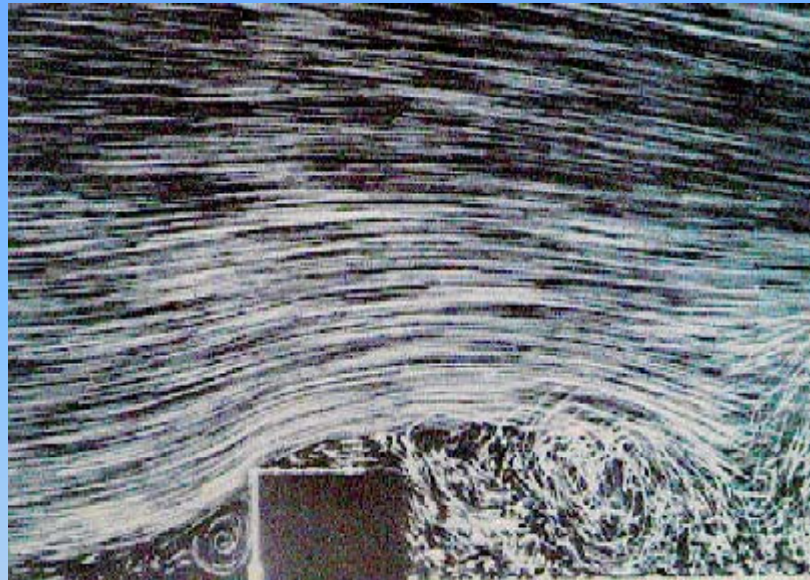
**Figure 4. A typical Biosafety Level 3 laboratory**

*(graphics kindly provided by CUH2A, Princeton, NJ, USA). The laboratory is separated from general traffic flow and accessed through an anteroom (double door entry or basic laboratory – Biosafety Level 2) or an airlock. An autoclave is available within the facility for decontamination of wastes prior to disposal. A sink with hands-free operation is available. Inward directional airflow is established and all work with infectious materials is conducted within a biological safety cabinet.*

Ref: WHO, Lab. biosafety manual



# 排氣與建物進氣交互影響(短回路)



# Biosafety Lab. Guidelines

- 實驗室的位置及物理性結構（包含牆面、天花板及地板）使用之材質可維持實驗室之氣密狀態。
  - 實驗室之位置位於邊間或所在建物之高樓層，排氣管路至過濾處理系統之總長度為一層樓（含）高度以下，並利於進排氣系統之維護。
  - 實驗室具有互鎖（interlock）控制之緩衝室，在緊急情況時可供解鎖。
  - 以煙流測試實驗室內之插座、貫穿孔或其他已密封處時，煙流之方向不受影響。
  - 實驗室阻隔區連接或鄰近更衣室。
- 實驗室為密閉空間，與公共區域明確分開，具有管制的獨立動線。
- 由公共通道進入實驗室阻隔區之路徑，以實施管制之前室（或類似設計之房間）予以區隔。
- 辦公室區域不在實驗室阻隔區以內。
- 實驗室之牆板以氣密施工，使用耐酸鹼及耐壓之材料；地板採用耐酸鹼、耐磨及止滑之材料。
- 實驗室內牆面、地板及天花板之孔（縫、間）隙及貫穿孔等予以密封，無明顯裂縫，以維持實驗室氣密狀態。

# Biosafety Lab. Guidelines

## ● 實驗室採用穩定且合格之空調處理系統

- 屋頂排氣口與新鮮外氣引入口具有15公尺（含）以上水平距離，且非位於同側。
- 實驗室之進排氣系統為獨立，排氣未與生物安全櫃共管（即排氣使用專用管路）
- 裝設於排氣端之HEPA濾網靠近污染處（非靠近排氣風機端）。
- 設置之備援排氣風機及排氣HEPA可立即自動切換，且風機定期交替使用。
- 實驗室換氣率經檢測可達到每小時12次（含）以上。
- 屋頂排氣口經檢測，排氣速度至少每秒15公尺之速度排出。
  
- 實驗室之進氣使用新鮮外氣，無使用回風或自其他感染區進氣。
- 實驗室之排氣皆經過HEPA濾網過濾。
- 進排氣口之位置不相互產生迴流，無其他物品擋住進排氣口或影響其氣流方向。
- 排氣口位置不影響生物安全櫃入口氣流之方向，不產生擾流。
- 進排氣系統異常時，具有可發出聲音之警報裝置警告現場操作人員。
- 設置備援排氣風機及排氣HEPA。
- 排氣系統已預留燻蒸消毒孔及洩漏測試孔。
- 實驗室定期檢測HEPA濾網之效能，並備有標準作業程序之文件（內容包括檢測程序、更換HEPA濾網之時程及程序，以及廢棄HEPA濾網之後續處置作為）。



# Biosafety Lab. Guidelines

- 使用合適且經檢測合格之生物安全櫃，並每年至少檢測一次。
  - 實驗室內採用B2型式安全櫃。
  - 生物安全櫃具有獨立排氣管道，不與實驗室排氣共管。
  - 生物安全櫃周邊保留空間以允許進行維護保養及清潔之工作。
  - 屬A2型式且對室內排氣者，每半年實施1次安全檢測。
- 實驗室使用第二級（含）以上之生物安全櫃（例如A2、B1、B2）。
- 除生物安全櫃外，實驗室另裝設有其他排氣管路。
- 生物安全櫃之安裝位置遠離門口，不受進排氣影響和人員經過頻繁的區域。
- 使用之生物安全櫃已通過其原廠所依循之國家檢測標準、產品認證及現場安裝檢測
- 每年至少檢測一次，且生物安全項目檢測結果合格。
- 生物安全櫃類型屬A2型式者，須符合於排氣集氣罩後方適當處加裝HEPA濾網，並於開關機瞬間、運轉中及停機時，在集氣罩之間隙處均無產生正壓。

# Biosafety Lab. Guidelines

- 實驗室內備有高溫高壓蒸氣滅菌器，並定期執行相關檢測作業
  - 定期自行或委由相關機構執行高溫高壓蒸氣滅菌器保養。
  - 於高溫高壓蒸氣滅菌器周邊備有（張貼）標準操作程序、檢測紀錄及操作紀錄等文件。
  - 針對高溫高壓蒸氣滅菌器發生異常時之處理措施，訂有應變計畫，且確實執行。
- 實驗室操作區域內設置高溫高壓蒸氣滅菌器，以利進行感染性廢棄物之滅菌消毒作業。如該設備係設置於實驗室以外區域，已制定相關標準作業程序規範其廢棄物運送動線及注意事項等。
- 抽氣式高溫高壓蒸氣滅菌器之排水與排氣有適當之過濾。
- 實驗室已於相關標準作業程序規範中，敘明執行生物性確效檢測之方法、流程、判讀方式及檢測時機等項目，並確實執行，且確效檢測結果為合格
- 使用雙門穿牆式類型者，高溫高壓蒸氣滅菌器之貫穿處已填塞密封，使用煙流測試之結果無洩漏情形。
- 保存完整之高溫高壓蒸氣滅菌器維修保養及檢測紀錄。

# Biosafety Lab. Guidelines

- 實驗室內使用具安全設計之設備，提供安全且舒適的操作環境。
  - 實驗室操作區域之門，以及操作區域與前室之門採免手動開啟設計。
  - 實驗室經檢測，於室內相關設施（備）運轉時之噪音值低於67 dBA。
  - 實驗室經檢測，桌面照明設備至少500 Lux的光源。
  - 實驗室操作區域內設置之通訊設備為免手持型式。實驗室內之出水設施為免手動。
  - 實驗室使用之壓縮氣體鋼瓶係放置於實驗室阻隔區域外。
  - 實驗室操作區域內（含前室）設有緊急沖眼裝置，實驗室設有淋浴設施，且其水流力道強弱已調整適當並檢測合格。
  - 實驗室內外均設有溫溼度顯示儀器，以供實驗室操作人員於進入實驗室前得以紀錄每日實驗室溫溼度之數值變化。
  - 實驗室內之相關設施（備）運轉時，其噪音值控制在適宜範圍內，使操作人員進行相關操作時不至於感到吵雜
- 檢體由實驗室進入實驗室操作區域之傳遞作業使用傳遞箱進行，且其傳遞箱設有紫外線燈及互鎖設計。若設置單位非使用傳遞箱傳遞檢體時，已於相關標準作業文件記載採用何種方式進行傳遞，及後續SOP
- 實驗室內使用具安全設計之設備，包括使用不附輪之座椅，符合儀器規格之插座，且實驗室內無使用延長線。
- 水槽之排水具存水彎設計。
- 實驗室內之照明設備提供足夠的光源。



# Biosafety Lab. Guidelines

- **實驗室為具適度負壓之環境，並保持定向氣流。**
  - 實驗室壓力計定期檢測及校正，且檢測結果為合格。
  - 實驗室相鄰區域至少相差12.5 pascal。
  - 壓力計明確標示其壓差所顯示之區域所在，以及壓力（差）值之正常範圍，以利操作人員判讀。
- **實驗室維持24小時負壓運轉，並保持定向氣流，其氣流方向由乾淨區流向污染區，無死角，無有害物於特定位置滯留堆積。**
- **前室之氣壓低於公共通道氣壓。**
- **於實驗室出入口安裝壓力計（指針式或數位式）顯示實驗室之壓力或壓差。**
- **實驗室操作區域相對於公共走道之負壓至少在25 pascal（含）以上。**
- **實驗室產生負壓不足或正壓之情形時，設有可發出聲音之警報裝置警告現場操作人員。**
- **於實驗室排氣設備（例如生物安全櫃）啟動或關閉的瞬間，不會產生負壓不足或正壓之情形。**

# Biosafety Guidelines

- “Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 4th edition” , Centers for Disease Control/National Institutes of Health, 1999.
- “Laboratory biosafety Guidelines 2nd edition” , Health protection Branch- Laboratory Center for Disease Control, Canada, 1996.
- “Primary Containment For Biohazards: Selection, Installation And Use Of Biological Safety Cabinets” , CDC/NIH,2000.
- National Sanitation Foundation (NSF). 1992. Standard 49, “Class II Biohazard Cabinetry” .
- WHO, Laboratory Biosafety Manual, 2004.



# Thanks

## Q & A

鄭詠仁

(03) 5912296

[eric\\_cheng@itri.org.tw](mailto:eric_cheng@itri.org.tw)

<http://www.taiwanbiosafety.org>

