



Fudan BSL-3

上海复旦大学三级生物安全防护实验室  
Shanghai Fudan University Biosafety Level 3 Laboratory

---

# 见习实习方案

[2010.9]

课程名称：医学与生物安全

课程编号：MED130197

学分：2

学时：36

# 实习的目的与内容

## 目的：

实验室生物安全是指在从事病原微生物实验活动的实验室中避免病原微生物对工作人员和相关人员的危害，对环境的污染和对公众的伤害，为了保证试验研究的科学性还要保护被试验因子免受污染。其措施包括强化工作和管理人员生物安全意识，建立规范化、法制化和日常化的管理体系，加强人才的建设、培训，配备必要的物理、生物防护设施、设备，掌握规范的微生物操作技术和方法等。

## 内容：

- （一）设施系统.....1-2
- （二）个人防护.....3-4
- （三）生物安全柜.....5-6
- （四）清场.....7-8
- （五）灭菌器.....9-10
- （六）洗手测试.....11

# 实验室生物安全基础见习实习指导（一）

## 设施系统

### 目的：

阐述生物安全实验室的防护原则，以及对实验室设施、设备的要求。初步了解生物安全实验室在建筑上的结构特征，如实验室布局、送排风系统等。

### 材料与物品：

复旦大学三级生物安全防护实验室

### 实习步骤：

生物安全实验室为“盒中盒”结构，主要采用物理隔离分区与负压通风过滤技术。因此见习的重点为这两个方面。

#### A [物理隔离分区]

物理隔离（墙体）和密封门把实验室与公共环境分开，这里重点介绍 BSL-3 实验室由外到内可以划分为清洁区（更衣、淋浴）、缓冲区 I、半污染区（准备间）、缓冲区 II、核心区（实验操作区）五个区域，其中缓冲区两扇门互锁，加上负压通风，保证实验室内气流为定向流，方向为：非污染区→半污染区→核心区。

见习要点：控制室内 PLC 控制系统上实验室平面分区图告知分区设置、进出路线。

#### B [负压通风过滤技术]

负压通风过滤主要应用于 BSL-3/4、ABSL-3/4。在 BSL-3 实验室通风设计中，要求各区室之间气压保持一定的压力梯度，且走向恒定（此处不是指实验室任何时刻气流都是在房间与房间之间窜动，而是指各区之间门打开时，不出现倒灌现象）。因此要求风机开启时先排后送，关闭时，先送后排。

核心区与半污染区的空气一律要经 HEPA 过滤后排放。因此其安装位置应尽量减少污染范围，即 HEPA 尽可能靠近污染源。按照 GB19489-2004 要求，BSL-3 实验室应顶部送风，下面排风，且送风口与排风口呈对角分布。另 HEPA 安装在排风口的最前端。

BSL-3 实验室空气排出方向：室内→前端 HEPA→末端 HEPA（BIBO）→环境

安全柜内空气：安全柜内→安全柜 HEPA→排放管道→末端 HEPA→外环境

见习要点：机房内告知其新风采集、过滤；排风中 BIBO 布置，风管走向、排风口设置。

### 注意事项：

1. 实习过程中禁止乱碰触摸实验室内设施设备

2. 实习过程中实验室内按钮、开关未经允许禁止随意按下

**附：见习过程中需介绍到的内容：**

1. 位置：建筑物中自成隔离区（带出入控制）或为独立建筑物
2. 平面布局：分区组成、安全门设置位置、传递窗使用、安全柜位置原理入口等
3. 维护结构：抗震防火 密封 避污染 门自动关闭、发光指示、防啮齿类节肢动物进入等
4. 通风系统：
  - A 独立的送排风系统确保气流走向与压力梯度
  - B 送风与排风对角分布，上送下排，降低气流死角与涡流形成
  - C 送排风为直排式，不得采用回风结构
  - D BSC 内气体经 HEPA 直接排出，确保 BSC 与排风系统平衡
  - E 送风经初、中、高三级过滤，保证污染区的静态洁净度为 7-8 级，10W-1w 级
  - F 排风口直排，远离送风口，设置在主导风下风向，高出建筑物 2m，防雨鼠虫
  - G HEPA 安装在送风末端，排风前端
  - H 安装牢固，部件气密，HEPA 更换前消毒，更换后焚烧消毒，年检制度
  - I 送排风安装气密阀，必要时进行房间化学熏蒸
  - J 安装风机与安全柜启动连锁装置，确保实验室不出现正压与确保生物安全柜内气流不倒流，排风机一用一备，
  - K 核心区与半污染区不应另外安装分体空调、暖风、电风扇等
5. 环境参数：
  - A 室内负压，核心区-50Pa 左右，半污染与实验室之间相对-30Pa，半污染区的相对压力以（-20+-5）Pa 为宜，
  - B 实验室温度以人体舒适范围为宜，相对湿度不超过 70%
  - C 空气洁净度 1-10w 级
  - D 照明均匀，不炫目，不反光，工作照度不大于 500lx
  - F 噪声不超过 65dB
6. 其它
  - A 台面防水耐热耐腐蚀
  - B 家具牢固易清洁，边角光滑无毛刺

- C 最好不要使用真空泵，如需要真空管线接入在线高效过滤器，且不影响室内的负压
- D 压缩钢瓶放于实验室外
- E 安全出口应有长效发光指示标识
- F 电源确保实验室工作期间有不间断的电力供应
- G 实验室入口处的显著位置安装声光报警压力显示装置
- H 通讯系统 如电话、传真、计算机等

## 实验室生物安全基础见习实习指导（二）

### 个人防护部分

- 目的：**
1. 掌握各种个人防护用品的正确使用方法，穿脱步骤。
  2. 理解不同危害等级使用不同的个人防护用品
  3. 了解个中个人防用品的工作原理

**准备物品：**

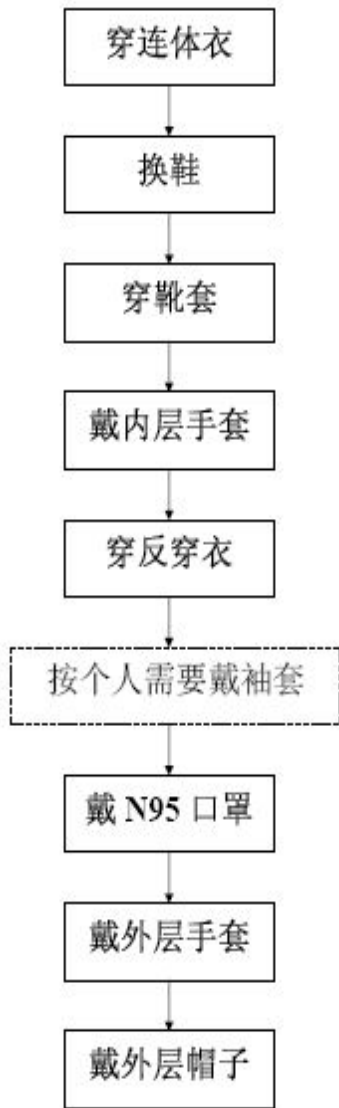
口罩（N95，普通），手套，防护服（联体，反穿），鞋套，靴套，袖套，帽子，面罩  
N95 口罩个人密合适合性检测系统；正压呼吸系统

**步骤：**

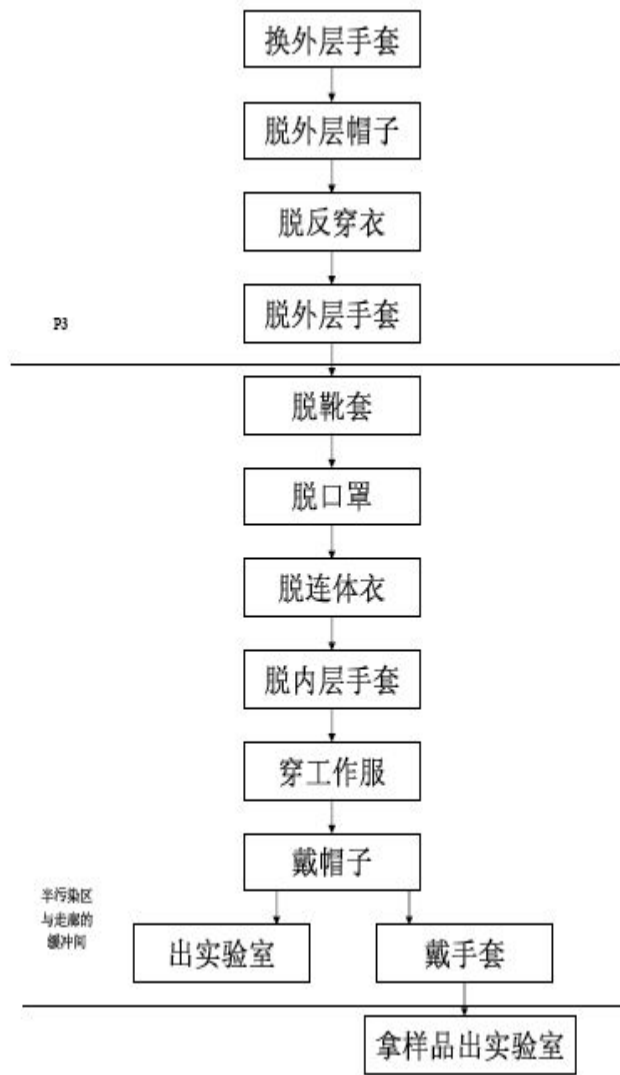
1. 以进入的实验生物安全等级为基础，考虑个人防护级别及防护要求的重点。
2. 清查所需个人防护用品是否齐全。
3. 任何个人防护用品使用前务必检查其质量，确保安全。
4. 穿戴过程：
5. 脱防护用品过程：

**注意事项：**

1. 同一层次防护，手套腕部需盖过防护服腕部；
2. 须选择自己适合的尺寸；
3. N95 口罩需要先进行个人密合适合性试验。
4. 应急情况下，视具体情况使用正压呼吸系统。1) 使用前准备：设备应完好、无损、安装正确，使用前应更换任何损坏或有缺陷部件；根据使用的使用说明对面罩做使用前检查；使用前，检查 i. s. 电机罩，将腰带安装在电动送风装置上。2) 电池提前充电，3) 校准，4) 检查滤罐，5) 检测流量，6) 连接装置，7) 调整面罩，8) 注意事项：注意防止呼吸管卷绕在突出的物体上；使用中若进入面罩的气流停止，或流量降低且有警报，或感觉到有异味，应立即撤出污染区，检查故障原因。9) 摘卸：应先撤出污染区域，再将面罩从头上取下后，关闭电源，解开腰带。



穿戴防护用品过程



脱去防护用品过程

## 实验室生物安全基础见习实习指导（三）

### 生物安全柜

- 目的：**
1. 掌握生物安全柜内感染性物质操作的一般准则和技术要点；
  2. 熟悉生物安全柜运行的一般规则；
  3. 了解生物安全柜故障时的一般处理原则。

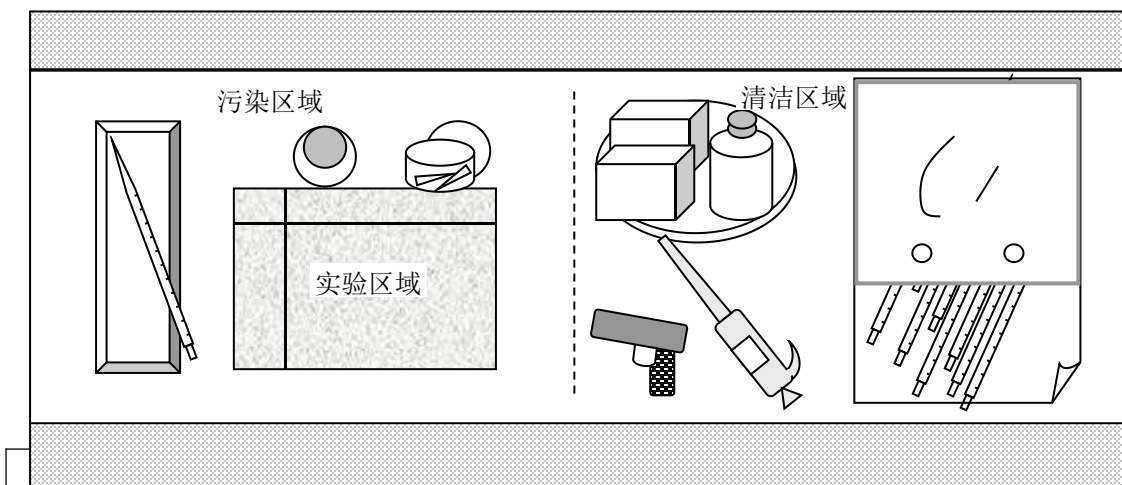
**准备物品：**

1. 培养液、TRIZOL
2. 细胞培养瓶、病毒收集瓶、15ml 离心管
3. 废物缸、废液缸、废物盒

**实验步骤：**

1. 个人防护装备：口罩，手术帽，手套（内白外兰），防水衣，鞋套
2. BSC 的准备：启动程序，清洁，UV 消毒
3. 物品清单，物品运入及摆放（见附图）
4. 实验重点一：样品离心，3000rpm 5'。防气溶胶操作方法
5. 实验重点二：感染上清收集，防意外接种及气溶胶操作方法。
6. 物品退出 BSC：实验样品，干净物品，废物
7. BSC 清洁：酒精擦拭
8. 废弃物处理：高压灭菌程序
9. 结束实验：防护服脱卸，洗手

附：BSC 内物品摆放示意图（for the right-hand）





物品准备:

1. 培养液、TRIZOL
2. 细胞培养瓶、病毒收集瓶、15ml 离心管
3. 废物缸、废液缸、废物盒

实验步骤:

1. 将带入的 H9 细胞，废物缸、废液瓶、废物盒、离心管、Trizol 试剂等实验必需品按相对污染与清洁区依次放置。
2. 分别将已接种 HIV 的 H9 细胞从培养箱内取出，编号\_\_\_\_\_，置显微镜下观察，记录见下。
3. 在安全柜正中靠操作者处铺上吸水垫，喷上 75%酒精。
4. 吸出已接种 HIV 的 H9 细胞悬液，编号\_\_\_\_\_，移入 15ml 离心管。
5. 将离心管在安全柜内放入离心杯中，喷消毒液，更换手套，带出离心。
6. \_\_\_\_\_转/分钟，离心\_\_\_\_\_分钟。
7. 将离心杯带入安全柜内，取出离心管。离心杯喷洒消毒剂后取出。
8. 分别将上清以每个 ependorf 管 0.5ml 分装，标记保种，共\_\_\_\_\_管，标记\_\_\_\_\_。放入密封盒，记录见附表。
9. 分别吸取\_\_\_\_\_ml 病毒上清至带入的未接种 H9 细胞培养瓶内，轻摇培养瓶混合，使病毒上清充分接触细胞。细胞培养瓶外表面喷洒消毒剂后，拿出安全柜后放入培养箱。标记\_\_\_\_\_。
10. 将剩余上清\_\_\_\_\_，注意不要将沉淀细胞悬起。
11. 吸取\_\_\_\_\_微升 Trizol 加入细胞沉淀，混匀后吸出，移入 1.5ml 离心管，标记\_\_\_\_\_，放入密封盒，外表面喷洒消毒剂后，拿出安全柜。
12. 将吸水垫收起放入废物盒，双手喷上消毒剂，脱去外层手套，重戴干净手套。
13. 将安全柜内物品喷洒消毒剂后取出，取出顺序为干净的物品先取出，废弃物收集盒最后取出。最后将安全柜台面喷洒消毒剂后，从干净区域到污染区域的顺序擦拭清洁。脱去外层手套带出。
14. 换上干净外层手套，关上安全柜窗口，打开紫外，定时 15 分钟。

实验结果:

实验意外情况及处理:

## 实验室生物安全基础见习实习指导（四）

### 清场、消毒与废弃物处理

- 目的：**
1. 掌握实验后清场的基本操作程序；
  2. 了解消毒的原理及原则；
  3. 了解污染废弃物处理的基本程序。

**准备物品：**

4. 培养液、TRIZOL
5. 细胞培养瓶、病毒收集瓶、15ml 离心管
6. 废物缸、废液缸、废物盒
7. 灭菌整理箱，生物安全废物袋、灭菌指示带、消毒剂（乙醇、新洁尔灭、氯）。

**步骤：**

1. 良好的实验行为规范是生物安全防护的重要保证，正确的清场程序是良好的实验行为规范的一部分。
2. 清场可分为日常实验后清场和实验对象变更后清场。
3. 消毒剂的分类、消毒原理，配置方法以及消毒剂的选择。
4. 清场消毒的操作规程：
  - （1）日常实验过程按照不同的实验安全操作规程进行。
  - （2）实验结束后，由实验人员进行清场，首先更换新的外层手套。
  - （3）处理实验样品如：取出实验样品放回冰箱，取出细胞培养瓶放回 37℃ 培养箱中培养。
  - （4）取出所有未使用的物品如：未拆包装的移液管等。
  - （5）在使用过的移液器表面上喷洒 75%乙醇，然后取出移液器放入抽屉中。
  - （6）将实验区域的吸水纸巾折叠好放入废物盒中。
  - （7）将废物盒中废物整理好，拉起废物袋，用胶带将袋口扎好但不可过紧，贴好灭菌指示胶带或放入灭菌指示剂，并在指示胶带上写明消毒日期。将废液瓶放入废物盒中。盖上废物盒的盖子，然后在盒子表面喷洒 75%乙醇。
  - （8）更换一副新的外层手套。
  - （9）取出废物盒放入灭菌整理箱中。

- (10) 用 75%乙醇清洁安全柜内清洁区域、污染区域及实验区域所有表面，并用纸巾擦干。
  - (11) 更换一副新的外层手套。
  - (12) 关闭生物安全柜，设置 UV 照射。
  - (13) 退出实验室，带出实验后的废弃物，进行高压灭菌。
  - (14) 60min 后关闭通风系统。
  - (15) 每周对地面和墙面消毒清洁一次。
5. 所有灭菌消毒处理后的废物作为危险废弃物收集于洗涤室的医疗废弃物回收桶内，废弃物应放置整齐，然后盖好回收桶的桶盖。
6. 所有灭菌消毒处理后的废弃物送往指定的单位进行焚烧处理，定点单位定期到实验室收取需要做焚烧处理的废弃物。实验室废弃物处理人员和焚烧单位工作人员共同完成废弃物回收记录。

## 实验室生物安全基础见习实习指导（五）

### 高压蒸汽灭菌器的使用

- 目的：**
1. 掌握灭菌的原理和条件；
  2. 了解高压蒸汽灭菌器的使用。

**准备物品：**

高压蒸汽灭菌器，灭菌整理箱，生物安全废物袋、灭菌指示带/剂、化学指示卡。

**步骤：**

1. 灭菌的方法和原理。
2. 灭菌器的种类、构造和工作原理。
3. 双扉高压灭菌器的操作规程：

**3.1 准备工作：**

- （1） 开启中控室总电源。
- （2） 确认水箱水位及水质。
- （3） 确认内室及夹套压力。
- （4） 确认真空泵，压缩泵。
- （5） 确认清洁侧门。

**3.2 使用程序：**

- （1） 将灭菌室墙上所有电源开关置于向上接通电源，压缩泵启动，。
- （2） 打开控制系统电源，启动灭菌器。
- （3） 按住污染侧门（后门）开门按钮，将灭菌物品均匀地放入到灭菌器内室中，同时放入生物灭菌指示剂。按住后门关闭按钮，关闭电动门直到门垫圈充气封紧为止。
- （4） 点击控制面板触摸屏上的 run 模块，进入灭菌器控制系统。
- （5） 面板左上方显示当前所处的行程，右上方显示当前使用的程序，下方显示“程序”“检测”“启动”和“校温”四个可点击的模块。面板中间显示灭菌器当前的条件状态包括：空气源，蒸汽源，水源以及前后门的状态和夹套温度和压力。
- （6） 点击面板画面中“程序”模块，画面即进入程序选择界面，显示以下六种程序：辅料类，器械类，净化，液体类，下排汽和动物类。点击需要选择的程序模块。设定完毕后点击确定模块即完成程序的设定。

- (7) 选择程序完毕后，灭菌器进入准备行程，蒸汽发生器产生蒸汽，夹套压力不断上升。可点击“检测”模块，显示输入输出通断状态，点击“返回”模块，则返回目前行程。当面板显示“空气源开关闭合 蒸汽源开关闭合 水源开关闭合 前门关闭 后门关闭”，压力表显示超过 0.2MPa，以上条件均满足的时候，可点击触摸屏上“启动”模块，启动灭菌程序。
- (8) 当灭菌程序所有行程进行完毕以后，面板显示“行程完毕，可开门”，压力表显示压力为 0MPa，开门灯亮起，此时可按住前门开门按钮，打开前门，取出灭菌物品，观察生物指示剂变色情况以检测灭菌效果。如果灭菌效果不佳，则需重新进行灭菌程序以达到有效的灭菌目标，方可对废弃物进行下一步处理。
- (9) 将灭菌内室清理干净，然后按住前门关闭按钮，将前门关闭直至门框封条封紧。点击触摸屏上“复位”模块使灭菌器回复准备行程。
- (10) 如还需进行灭菌，则按以上相同的步骤从后门送入灭菌物品进行灭菌。如不需使用，关闭控制系统，关闭电源。最后在控制室电源箱中，关闭灭菌器总电源。
- (11) 完整登记灭菌器使用记录。

### 3.3 灭菌效果的监测：

- (1) 物理监测：温度、压力、时间
- (2) 化学监测：灭菌指示带、化学指示卡
- (3) 生物监测：生物指示剂（嗜热芽孢杆菌）
- (4) B-D 试验
- (5) 其他

## 实验室生物安全基础见习实习指导（六）

### 洗手测试

#### 目的：

规范洗手的步骤和要求。明确手部污染的特点。

#### 材料与物品：

肥皂、擦手纸、手部污染模拟套装、紫外手电。

#### 准备工作：

在实习当天准备手部污染模拟凝胶，按实习学生数准备，将荧光粉与护肤凝胶混合均匀，避光放置。

检查紫外手电电池。

#### 实习步骤：

1. 指导教师将混有荧光粉的凝胶分给每位实习学生，每位学生黄豆大小的量。
2. 要求学生手掌对手掌、十指交叉、手掌交叠在手背上搓揉双手，并检查是否覆盖到整个手心和手背；同时注意要求学员用指甲刮手掌心。
3. 按日常洗手方法或洗手六步法进行洗手，擦干。
4. 在暗室内，打开紫外手电，检查学生指甲、手指末端、手掌和手腕。注意荧光显示的发光点，评估洗手方法的情节效果。
5. 效果评价。