

浅谈 ABSL-2 实验室运行管理要点

杨 华¹, 赵 勇², 宋志刚¹, 李 顺¹, 周晓辉¹

(1. 上海市公共卫生临床中心, 上海 201508; 2. 上海实验动物研究中心, 上海 201203)

[摘要] 实验动物是医学研究广泛应用的重要工具, 实验动物和动物实验的生物安全保障是支撑人类生物医学研究与相关科技进步的关键基础条件之一。目前, 动物生物安全二级(ABSL-2)实验室已被广泛应用于生命科学和医学研究的多个领域。本文通过介绍 ABSL-2 实验室管理要点, 围绕实验室建筑设计、资质审批及实验项目审批管理、设施运行、人员管理、操作规程、应急处置等方面, 如何加强管理, 建立一个有效的生物安全管理体系, 以防止危害生物因子泄露, 提高动物生物安全二级实验室生物安全保障支撑水平, 为同行提供信息参考。

[关键词] 生物安全; 动物生物安全二级; 动物实验; 管理体系

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2020)02-0149-05

动物生物安全二级(animal biosafety level 2, ABSL-2)实验室适用于操作《人间传染的病原微生物名录》中第三类动物病原微生物和《动物病原微生物分类名录》中三类动物病原微生物^[1-2]。在生命科学研究中, 该类病原微生物是广大科研工作者关注焦点。ABSL-2 实验室也成为目前开展感染性科研项目使用率最高的实验室。对 ABSL-2 实验室必须进行严格有效的管理, 以提高实验室生物安全保障支撑水平。

上海市公共卫生临床中心(以下简称“本中心”)的 ABSL-2 实验室, 长期为肠道病毒 71 型、寨卡病毒、疱疹病毒及金葡菌、沙门氏菌等细菌引起的新发及再现传染病的致病性研究, 以及疫苗研究及抗体制备等动物实验提供科研平台, 至今运行已十余年, 建立了一个有效的生物安全管

理模式。笔者根据多年来从事 ABSL-2 管理工作实际经验, 分析、归纳、总结了对 ABSL-2 实验室开展项目管理方面的关键要素, 以期供 ABSL-2 管理初学者或相关同行参考。

1 ABSL-2 实验室设计和设施建设

ABSL-2 实验室设施的设计和建设和保障生物安全的第一道防线^[3], 必须遵循和依据国家的系列标准^[3-6]。ABSL-2 实验室的建筑技术要考虑布局科学合理, 保证气流正常流向。按照国家标准 GB19489-2008 要求, 动物饲养间出入口设置缓冲间。本中心 ABSL-2 实验室, 考虑人流、物流、动物物流合理流向, 严格按照防护区和辅助区的要求划分, 在两区间设缓冲间。为了进一步降低 ABSL-2 实验室人员感染及周边环境受到污染的风险, 同时要保持室内空气清洁, 动物饲养间室内气压控制为负压洁净状态, 并保持稳定的压力梯度以防止污染物扩散^[7]。

ABSL-2 实验室入口处应张贴醒目的生物危害标志, 以提醒使用者了解危害程度及个人防护级别。ABSL-2 实验室小动物饲养笼具目前选用动物独立送回风净化笼具(IVC), 采用三级过滤, 并且笼盒内设闭气装置的进排气阀, 可有效防止

[收稿日期] 2019-09-04

[作者简介] 杨 华(1973-), 女, 高级兽医师, 主要从事 ABSL-2 实验室管理工作。

E-mail: yanghua8368@163.com

共同第一作者: 赵 勇(1974-), 男, 高级工程师, 研究方向: 实验动物。E-mail: 150021558@qq.com

[通信作者] 周晓辉(1973-), 男, 研究员, 研究方向: 新发传染病动物模型构建与免疫机制研究。

E-mail: zhouxiaohui@shphc.org.cn

环境、动物与人员间交叉感染,保障实验结果的准确性^[8]。另外,ABSL-2实验室应配备有操作防护和消毒灭菌的设施设备,例如生物安全柜、高压灭菌器以及过氧化氢发生器等。

本中心ABSL-2实验室的外界新风经过三级过滤后进入房间,饲养间内的废气经初效、中效过滤器处理后经高效过滤器过滤,再经废气处理装置处理后排出。实验结束,施行安死术后的动物尸体,经121℃ 30 min高压灭菌处理后,集中送有医疗废弃物处理资质的单位焚烧炉统一进行无害化处理。

2 ABSL-2实验室审批管理

2.1 资质备案及年度审查

目前,国家对ABSL-2实验室的资质审批,普遍采取属地管理,通常是实验室所在地的卫生健康委员会或农业农村厅主管机构负责备案管理与审批。同时,在ABSL-2实验室启用前,应取得政府管理部门颁发的“实验动物使用许可证”,按照实验动物特殊实验设施管理要求,动物生物安全实验室应同时符合GB19489-2008和GB50346-2011的规定。资质备案时将申报材料,包含管理文件体系、设备、病原微生物种类、实验室平面图、实验活动项目及生物安全责任承诺书等材料上报地方卫生监督所,由所在地的卫生健康委员会或农业农村厅主管机构审查备案。取得备案的ABSL-2实验室可开展备案相关病原体的科研活动,除了做好日常自检之外,还需接受卫生监督所年度定期现场审查及不定期抽查监督。卫生监督所工作人员根据实验活动涉及病原微生物种类,实验中管理实施各环节进行病原微生物实验活动的评估,以提高实验室生物安全意识,最大限度减少生物危害。

2.2 项目开展申请及审批

在实验开始之前,实验项目需要通过动物实验福利、伦理审查。科研人员递交申请材料,由所在机构的动物使用和管理委员会(IACUC)依据动物保护、动物福利、动物伦理和综合性科学评估的原则,进行严格监督和评估,以尽量减少实验动物数量,优化技术线路和方法,促进实验动物的合理使用。

此外,科研人员必须提前向所在机构生物安全委员会递交“ABSL-2实验室实验活动申请表”。委员会委员将参照《人间传染的病原微生物名录》或《动物病原微生物分类名录》^[1-2]要求,针对申请涉及病原微生物危害等级、实验方法、危害评估、废弃物处理、实验操作及剩余菌毒种处理方式等方面信息严格审核。通过对实验计划进行风险评估后,机构生物安全委员会批准,申请的实验内容才可以实施开展。

3 ABSL-2实验室设施运行管理

ABSL-2动物饲养间的温度、湿度、照度、空气洁净度等环境参数,均应按《实验动物环境与设施》(GB14925-2010)要求管理,并符合《生物安全实验室建筑技术规范》(GB50346-2011)和《实验室生物安全通用要求》(GB19489-2008)^[3-5]。

温度、湿度实现自动控制:动物饲养间内温度、湿度变化通过传感器显示在温度、湿度控制器面板上,并传输至中控室电脑系统。为了加强防护区管理,另建立一套功能完备的电视监控系统及温度异常报警系统,方便系统外工作人员实时监测实验室内温度、湿度变化。

动物饲养间照明灯具的定时控制:可调光照明系统用于调节灯光亮度,并设定调光系统定时开启、关闭时间,保证了实验动物对光亮度的需求。

组合式送排风系统:送排风机组采用一用一备、自动切换的工作模式运行,保证设施正常运转。本中心的ABSL-2实验室送风采用经三级空气过滤净化后进入的全新风,送风和排风机制通过启停和故障连锁控制,实验室启停时,排风应先于送风开启,而后于送风关闭,从而杜绝整个运行期间实验室出现正压现象。动物饲养间通过调节排风以维持室内压力和压差稳定,设计风量时考虑了IVC笼具、生物安全柜等设施的通风量。

严格的压力梯度控制:为了防止交叉感染,本中心的ABSL-2实验室内气流由辅助区流向防护区,最终流入核心操作间。实验室防护区房间内送风和排风采取上送下排的方式进行,防护区空气采用全新风进风,送风经过HEPA过滤器过滤。实验室实行分区管理,各区相邻房间之间设定了压力梯度。按照更衣室→风淋(-5 Pa)→前缓

冲室(-10 Pa)→内走廊(-15 Pa)→后缓冲室(-20 Pa)→动物饲养室及实验室(-30 Pa)的压力梯度和空气流向, 密闭门开向压力较高的房间或走廊。动物饲养室及实验室为 ABSL-2 实验室的核心工作间, 压力最低, 由内向外压力依次递增。保证气流定向移动, 既防止交叉感染, 又保护设施、实验动物及工作人员的安全。

4 ABSL-2 实验室人员管理

人员指实验动物及动物实验从业者, 包括工程技术人员、研究人员、管理人员、兽医师、后勤人员、阶段性从业人员^[9-12]。

4.1 人员资质管理

所有进入实验室的工作人员, 均必须接受培训并通过考核持证上岗, 包括“动物实验上岗”和“生物安全”双重培训上岗证。新工作人员通过培训考核后, 还需在有资格的工作人员指导下工作一个月以上, 才能获得上岗证。专业能力方面, 要求进入实验室人员必须具备相关专业背景, 熟练掌握动物实验操作技能, 并熟悉实验室生物安全常识。

4.2 人员培训与考核

人员培训按照岗位分类进行, 以岗位职责为基础, 制定科学规范的人员培训内容和考核体系, 不同岗位分组进行。

首先, 通过市级的实验动物从业者上岗培训, 或参加单位的上岗培训并通过考核, 取得上岗证。其次, 实验人员需通过单位生物安全委员会组织的生物安全理论与实践培训, 并考核合格后取得证书。

在生物安全培训方面, 要制定分段式培训计划, 从生物安全基本原理学习入手, 到实验室标准操作规范的指导性实践训练, 再到带教老师亲自示范, 一对一现场指导。培训采用专题讲座、知识竞赛、示范练习、模拟演练等理论和实践结合的方式。受训者初次进入 ABSL-2 实验室, 都需要由带教老师或区域负责人带入, 并详细讲解每个区域主要工作的注意事项等。

培训结束后进行培训评估, 评估培训对象对培训内容的记忆或操作执行情况, 评估培训对象工作中的行为变化, 并建档保存。

4.3 人员准入控制

实验室人员进入管理采取严格的门禁授权方式, 仅授权人员可刷卡进入。课题组实验人员准入按批准程序执行, 课题组项目应提前完成实验活动危害性评估的申请审核, 实验人员接受 ABSL-2 实验室内部培训, 且经考核合格后, 才能被授权打开门禁。

实验人员进实验室前需填写“ABSL-2 实验预约登记表”, 并计划好每周实验时间。每次进出实验室时须认真完成登记(人员、进出时间及带入物品等基本信息), 严格按照标准操作程序(SOP)规定的路线进行个人防护装备的穿戴及更换。

4.4 人员健康监督

对从业人员进行长期健康监测, 每年组织体检并建立健康档案, 在开展实验工作前还要采集本底血清留档, 必要时应当对其进行预防接种。由专人负责人员健康监测工作, 及时了解人员的健康状况, 确保人员的职业健康和福利。

实验室工作人员若出现下列任一情况, 不宜进入 ABSL2 实验室: 患发热性疾病、上呼吸道感染、抵抗力下降、已经在核心区内连续工作 4 h 以上、其他原因造成疲劳状态等。工作人员一旦出现与实验相关的病原微生物感染类似的临床症状, 应立即汇报实验室负责人, 并向生物安全委员会及单位负责人报告, 启动相关应急处理方案, 同时派专人陪同其及时就诊。

5 ABSL-2 实验室实验操作管理

5.1 个人防护

个体防护装备(PPE)使用是控制生物安全风险的终端措施, 选择和使用合适的 PPE 是避免 ABSL-2 实验室感染的关键。实验人员在 ABSL-2 实验室中, 应根据实验特点, 按照不同传播途径疾病的预防和隔离要点, 针对重点防护部位谨慎选择合适的 PPE, 并掌握正确使用方法, 避免接触污染, 加强个人防护。ABSL-2 实验室中气溶胶传播是实验人员发生获得性感染的主要途径之一, 因此特别要加强呼吸装备防护。

5.2 规范操作

实验操作前, 生物安全柜的台面须预先铺上铺巾, 以防止台面污染。实验中所有涉及动物操

作的过程,如换料、添水、换笼、感染、注射、解剖取材等,都必须在生物安全柜内进行,并熟悉动物实验相关操作技能和规程。实验操作中,为了降低生物安全风险,应注意以下几方面:1)样品处理和移液过程中动作轻柔,枪头在液面下轻轻吹打混匀,避免溅洒和产生气溶胶;2)样品正确盖好后应无遗漏,在容器外部不能有残留物,有溢洒的污染物,要及时使用适当消毒灭菌剂对工作表面和被污染物进行处理;3)若手部接触到感染性物质,消毒后脱去外层手套,及时更换新手套;4)当必须使用尖锐物时,如移液枪头、注射器等,应小心操作避免伤害,收置于利器盒内保管。所有的污染物品及污水经无害化处理后方可移出实验室^[13-14]。

5.3 清场消毒

实验结束后认真做好清场工作,所有实验物品移出生物安全柜前都应打包入高压灭菌袋,并用适当的消毒剂对灭菌袋表面消毒。换下的IVC笼具在生物安全柜内放入高压灭菌袋内,经表面消毒后入高压锅灭菌,然后彻底清洗。未使用完的感染性生物材料、防护区的污染材料等要经过高压灭菌销毁,如实填写操作和处理记录。最后,生物安全柜完成内壁的消毒擦拭后继续运行10 min,再进行紫外灯消毒15 min,方可关闭。

实验室出风口的高效过滤器每半年更换一次,高效过滤器由有资质的专业人员在实验室工作人员陪同下,进行卸载和更换,更换高效过滤器前必须彻底消毒,通常采用过氧化氢干雾熏蒸的方法,对回风口没有腐蚀性;消毒后的旧高效过滤器放入生物安全袋后,由专职人员送到有资质的焚烧点处理。

一个实验周期后,ABSL-2实验室可用过氧化氢对空间进行熏蒸灭菌消毒。过氧化氢消毒是使用过氧化氢熏蒸器完成的干雾熏蒸消毒操作,最后将过氧化氢蒸汽催化为水蒸气和氧气这些无害的分解产物,使灭菌空间达到无菌。这种熏蒸消毒方法目前是最安全的一种干雾熏蒸,灭菌有效、环保,无有害物质残留,且能完全杀灭嗜热脂肪芽孢杆菌^[15-16]。熏蒸48 h后开启实验室送排风系统,空置1~2周,做空气沉降菌检测,打开培养皿盖平板收集30 min后,置37℃恒温

培养箱中培养,48 h后观察菌落生长情况,沉降菌小于2菌落(cfu)/皿为检测合格,后续重新投入使用^[17]。

6 ABSL-2 实验室应急事件处置及防范

预案制定、组织应急演练、紧急事件处置,是应急事件处置缺一不可的三个核心环节。

应按照实验活动种类、设施设备状况、人员能力现状和管理体系文件的执行情况,制定生物安全事故应急防控预案^[18]。预案要适合实验室的特点,具有可操作性。每年定期安排相关人员参加应急演练培训,熟悉意外发生后的正确有效处置方法。一旦发生紧急事件,立即启动应急处置程序:首先处理好菌毒种及感染性样品,并做好现场消毒、灭菌处理,严防病原微生物扩散,同时做好消防处置、人员救治及撤离等,并按照程序及时进行事故上报和处置。事后应分析原因,列入纠正措施,总结经验,进一步加强预防。所有人员必须严格按照应急预案以及相关操作规程进行处理,以保护人身安全为第一原则。

7 ABSL-2 实验室生物安全的发展展望

7.1 需进一步强调生物安全风险评估

生物安全风险评估是ABSL-2实验室管理核心内容。病原微生物、仪器设备及实验室活动、废弃物的生安风险评估、动物实验操作处理、个人防护方式的不同,会导致生物安全危害的差异很大。因此,实验室要根据风险评估的结果,采用不同的生物安全管理要求和措施。针对各环节的风险差异,细化安全防范制度和标准操作规程,进一步采取相应的防范措施,提高生物安全防护水平。

7.2 需进一步完善生物安全管理体系

应不断完善科学、有效的生物安全管理体系,加强生物安全管理体系运行。定期维护设施设备、检查更新个人防护装备;强化人员培训考核与健康监护;强化生物安全意识;加强安全

检查,及时消除隐患;进一步强化风险控制措施,保护环境不受污染。同时需建立学习机制,强化动物实验生物安全相关前沿科技的交流学习,进一步提高 ABSL-2 实验室的保障水平;提供 ABSL2 共享平台,确保相关科研活动的规范开展,为相关科研攻关任务保驾护航。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国卫生部. 卫生部关于印发《人间传染的病原微生物名录》的通知: 卫科教发[2006]15 号 [S]. 2006.
- [2] 2005 年农业部令第 53 号. 动物病原微生物分类名录[S].
- [3] GB 50346-2011. 生物安全实验室建筑技术规范 [S].
- [4] GB19489-2008. 实验室生物安全通用要求[S].
- [5] GB14925-2010. 实验动物环境及设施[S].
- [6] GB50447-2008. 实验动物设施建筑技术规范 [S].
- [7] 徐守振, 李超. 动物生物安全二级实验室建设探讨[J]. 中国动物检疫, 2019, 36(6):44-48.
- [8] 向志光, 佟巍, 谷有刚, 等. 负压屏障设施动物饲养笼具的选择及其感染风险的识别 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(9):76-79.
- [9] 周淑佩, 田枫, 贾光. 实验动物从业人员的职业安全及个人防护[J]. 实验动物科学, 2013, (1):50-54.
- [10] 佚名. 实验动物从业人员要求[J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(4):86-90.
- [11] GB/T 35823-2018. 实验动物 动物实验通用要求[S].
- [12] 宋志刚, 刘芳, 任晓楠, 等. 实验动物从业人员环境健康安全管理体系中生物安全培训的重要性[J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(8):7-10,5.
- [13] 李春雨, 李晓燕, 姜孟楠, 等. 感染性动物解剖室的风险因素分析及其控制策略的研究[J]. 中国医学装备, 2012, 9(2):1-3.
- [14] 卢选成, 李晓燕, 姜孟楠, 等. 感染性动物实验设施的设计与建设 [J]. 中国公共卫生管理, 2009, 25(2):153-154.
- [15] 付丽娟, 刘万忠. 过氧化氢消毒灭菌技术及设备的研究新进展[J]. 中国药师, 2017, 20 (2):340-343.
- [16] 张文福. 汽化过氧化氢消毒技术及其在生物安全领域的应用[J]. 中国消毒学杂志, 2017, 34(10):959-962.
- [17] 马学斌, 马聪, 邱伟, 等. 细胞制备实验室沉降菌检测分析[J]. 医疗卫生装备, 2014, 35(7):21-23,30.
- [18] 王君玮. 论基础兽医实验室的安全运行与管理[J]. 中国动物检疫, 2016 (11):48-51.

A Brief Introduction About Key Points of Management in ABSL-2 Laboratory

YANG Hua¹, ZHAO Yong², SONG Zhigang¹, LI Shun¹, ZHOU Xiaohui¹

(1. Shanghai Public Health Clinical Center, Shanghai 201508, China;

2. Shanghai Laboratory Animal Research Center, Shanghai 201203, China)

[Abstract] Laboratory animals represent the important tools which were widely used for medical researches. The biosafety of laboratory animals and animal experiments have provided key base of the development of biomedical science and technology for human society. Currently, the animal biosafety level 2 (ABSL-2) laboratory are widely used in the fields of life sciences and medical researches. This review introduces the key points of management of ABSL-2 laboratory, including the structure designing, the administrative approving, the facility running, the management of human resources, the experimental operation, the emergency handling, and how to setup effective biosafety management system to avoid the leakage of bio-hazardous factors, to improve the animal laboratory biosafety level.

[Key words] Biosafety; Animal biosafety laboratory level 2; Laboratory animal; Management system