

高等级生物安全实验室人员手接触对物表污染的风险分析

彭晓放, 曾灵风, 柯碧霞, 莫艳玲, 郑仲华, 汤莉, 黎薇*

(广东省疾病预防控制中心, 广州 511430)

摘要: **目的** 评估生物安全三级实验室(BSL-3)人员操作高致病性病原微生物时手部接触对关键物表的污染风险, 识别生物安全关键控制点。**方法** 对实验室内人员高频接触的物表进行每月连续采样, 共采集406份样本, 采用荧光定量PCR法检测病原微生物污染情况, 并结合实验室操作流程分析污染原因; 通过实施终末消毒、规范生物安全柜分区使用、区分主辅操作等措施进行干预。**结果** 总阳性检出率为2.96% ($P < 0.05$), 4℃冰箱门把手、离心机按键、对讲机按键、培养箱门把手、-80℃冰箱门把手、显微镜载物旋钮共6个关键部位检出污染, 原因分析主要与人员手部交叉接触、消毒不彻底、操作分区不明等有关, 经改进措施后, 连续采样7次136份, 检测阳性样本0份, 污染率显著降低。**结论** BSL-3实验室物表污染风险集中于人员手部接触频繁区域, 需强化终末消毒程序、规范生物安全柜操作分区、明确主辅操作人员分工及手卫生管理, 本研究为高等级生物安全实验室的操作规程优化提供了数据支持和实践依据。

关键词: 高等级生物安全实验室; 生物安全管理; 实验室感染; 风险监测分析

0 引言

生物安全三级实验室(BSL-3)作为传染病预防与控制以及科学研究的基础设施和重要平台, 其生物安全风险评估和风险管理一直是实验室安全管理的重点。2021年4月15日颁布的《中华人民共和国生物安全法》, 对高等级生物安全实验室的管理提出了明确的要求, 确保不发生实验室感染事件^[1]。在实际运行中, 虽然高等级生物安全实验室管理对实验室设施设备条件及人员防护要求严格按照相关法律法规和标准执行^[2], 但仍存在实验人员由于操作不规范等原因, 直接或间接接触病原体或气溶胶污染等而引发人员感染事件^[3]。Lv J^[4]和雷亚克等^[5]通过对实验室物表环境采样并进行核酸检测, 发现所有阳性对象都是实验人员直接或间接接触部位, 指出手部接触是主要的传播方式, 是导致实验室环境污染的途径。

本研究为了解实验人员在实验活动过程中, 手接触对实验室各区域环境物表的污染情况及潜在的风险点。通过选择在开展高致病性病原体分离培养鉴定、中和抗体检测

等活动期间, 对生物安全三级实验室各个区域手接触关键设备/物品的高风险部位表面连续采样进行核酸检测, 并对检测结果进行分析研判, 识别出风险点, 提出改进措施和验证, 为后续实验室生物安全管理和风险控制提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 样本采集方法

由实验人员在当次实验活动结束后、清场消毒处理前, 对实验活动区域手操作可能接触的物表, 采用采样管拭子, 进行涂抹方式采样。采样区域包括生物安全三级实验室准备间、缓冲间、核心区。准备间主要从事消毒包装后实验物品的传递、消毒剂配制及废弃物灭菌处置等活动; 缓冲间为连接准备间和核心区的区域, 主要从事个人防护用品的穿脱操作; 核心区为从事高风险感染性材料操作的主要区域。

前期监测采样时间为2021年1月至2022年12月, 实验室2间核心区主要从事新型冠状病毒实验活动; 后期

基金项目: 广东省医学科学技术研究基金项目(B2023032、C2017003), 卫生健康平台科技创新人才项目(0620220104), 广东省科技计划项目(No.2023B1212010010)。

第一作者: 彭晓放, 硕士, 副主任技师, 研究方向为病原微生物的实验室检测和管理。

*** 通信作者:** 黎薇, 主任技师, 研究方向为高等级实验室生物安全管理、菌毒种库保藏和应用。E-mail:12472344@qq.com

验证采样时间为 2023 年 1 月至 12 月, 实验室核心区主要从事猴痘病毒、艾滋病毒(I 型)、新型冠状病毒等实验活动, 实验室活动期间每月随机采样一次。

1.2 试剂和检测方法

对从事新型冠状病毒实验活动期间采集的样本, 按照核酸提取试剂盒和新型冠状病毒荧光 PCR 靶向核酸检测试剂盒说明书开展核酸检测和鉴定^[6]。根据检测结果, ORF1ab 阳性和(或)N 基因阳性, 结果定为阳性或单基因阳性, 判断为该采样点存在物表污染; ORF1ab 和 N 基因均为阴性时, 结果定为阴性, 该采样点无污染。对从事猴痘病毒、艾滋病毒(I 型)的实验活动期间采集的样本, 按照指南采用对应的核酸检测方法开展和评价^[7-8]。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 25.0 软件进行统计分析。计数资料用数例和率描述, 样本阳性率以百分率(%)表示。率的比较采用卡方检验和 Fisher 确切概率法, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 实验室内部手操作接触物表污染监测结果情况

2021 年 1 月至 2022 年 12 月实验室从事新型冠状病毒核酸检测期间, 连续每月采样, 除实验室维修检定暂停期间 3 次未采样, 共采样 21 次, 合计 406 份。其中, 检测出阳性样本 12 份, 总阳性检出率为 2.96%。核心区 1 室内采样阳性率最高, 为 5.24%, 核心区 2 室阳性

率为 1.26%, 准备间、缓冲间均未检出病毒核酸阳性。通过 Fisher 确切概率法对不同区域结果进行配对比较, 不同区域的阳性检出率存在显著性差异($P < 0.05$); 将核心区 1 室和 2 室进行配对比较, 两者存在显著性差异($P < 0.05$)。具体详见表 1。

表 1 实验室手接触关键部位的污染监测结果

实验室名称	分区	采样次数	阳性个数	阳性率 /%
生物安全三级 实验室	准备间	21	0	0
	核心区 1 室缓冲间	20	0	0
	核心区 2 室缓冲间	15	0	0
	核心区 1 室	191	10	5.24
	核心区 2 室	159	2	1.26
	总计	406	12	2.96

注: 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2.2 阳性结果采样分布部位及阳性率

对核心区内 15 个手部接触关键物表的高风险部位连续采样和核酸检测, 发现 6 个采样部位检出阳性, 总阳性检测率为 3.12%。阳性检测频次由高到低依次为 4 °C 冰箱门把手、离心机按键、对讲机按键、培养箱门把手、-80 °C 冰箱门把手、显微镜载物旋钮。通过对各部位采样阳性情况进行卡方检验, 提示各部位阳性检出率总体上存在统计学差异($P < 0.05$)。具体详见表 2。

表 2 核心区采样部位分布及核酸检测结果

区域	采样部位	采样份数	核酸检测阳数	阳性率 /%
实验室核心区	4 °C 冰箱门把手	35	3	8.57
	离心机按键	36	3	8.33
	对讲机按键	16	1	6.25
	培养箱门把手	50	3	6.00
	-80 °C 冰箱门把手	34	1	2.94
	显微镜载物旋钮	35	1	2.86
	核心区出口门把手	40	0	0.00
	缓冲间出入口门把手	37	0	0.00
	安全柜门把手和按键	37	0	0.00
	传真机按键	31	0	0.00
	培养箱内托盘	19	0	0.00
	人员实验操作后外层手套	7	0	0.00
	实验室储物柜门把手	4	0	0.00
	核心区生物安全垃圾桶	2	0	0.00
	水浴锅按键	2	0	0.00
	总计	385	12	3.12

注: 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2.3 阳性结果采样部位的采样信息和核酸 CT 值结果

分析 6 个阳性采样部位, 均属于关键防护设备, 共 12 份阳性样本, 其中 10 份分布在实验室核心区 1 室, 2 份分布在核心区 2 室。对 CT 值比较分析, 11 份样本 ORF1ab

值或 N 基因检测在 $35 \leq CT \leq 40$ 范围内, 包括单基因阳性样本占 7 份; 1 份在 $CT < 35$ 范围内, 采样部位为离心机按键。根据采样时间分布, 2021 年和 2022 年各检出 6 份阳性环境样本。具体详见表 3。

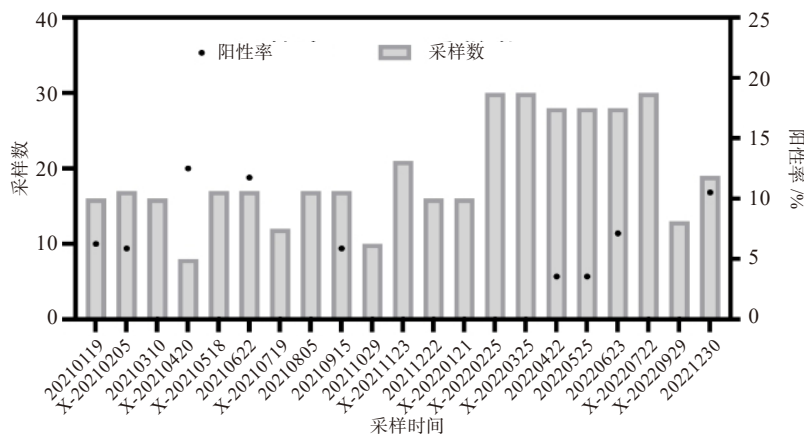
表 3 阳性结果的采样信息和核酸检测 CT 值结果

序号	采样阳性部位	采样地点(核心区)	采样时间	CT 值	
				ORF1ab 值	N 基因值
1	4 °C 冰箱门把手	1 室	2021-01-19	38.00	38.00
2	4 °C 冰箱门把手	1 室	2022-05-25	—	37.00
3	4 °C 冰箱门把手	2 室	2022-12-30	38.69	39.88
4	离心机按键	1 室	2021-04-20	—	37.00
5	离心机按键	1 室	2021-06-22	35.60	36.80
6	离心机按键	1 室	2022-04-22	36.00	33.00
7	培养箱门把手	1 室	2021-06-22	37.40	—
8	培养箱门把手	1 室	2022-06-23	—	39.00
9	培养箱门把手	2 室	2022-12-30	38.08	—
10	对讲机按键	1 室	2022-06-23	—	39.00
11	-80 °C 冰箱门把手	1 室	2021-09-15	37.50	—
12	显微镜载物旋钮	1 室	2021-02-05	40.00	39.00

2.4 实验室终末消毒对关键部位的高风险部位监测结果的影响

生物安全三级实验室采样期间, 共开展实验室终末消毒^[9]10 次。发现 10 次采取终末消毒措施的月份监测, 阳

性 2 次, 阴性 8 次; 11 次未采取终末消毒措施的月份监测, 阳性 7 次, 阴性 4 次, 采取终末消毒措施后, 环境监测阳性检出次数减少(具体结果见图 1)。



注: “X” 表示该监测月份期间(该采样日期和前一个采样日期之间的间隔)有开展终末消毒。

图 1 终末消毒处理和采样阳性率的关系

2.5 前期监测结果原因分析和应对措施制定

结果分析, 12 份阳性采样结果的核酸检测 ORF1ab 基因和 N 基因的 CT 值显示, 7 份单基因阳性, CT 值均大于 37; 4 份阳性 CT 值介于 35 至 40 之间; 1 份阳性 CT 值 ORF1ab 基因和 N 基因分别为 36 和 33。根据郑焕英等^[10]报道, 分离的新型冠状病毒的病例样本荧光定量 PCR 检测的 ORF1ab 基因和 N 基因的最高 CT 值分别为 33.74 和

34.47, 预判阳性监测部位存在活病毒的可能性极少, 通过对重点区域进行清洁消毒处理可有效地降低实验室感染风险。同时, 结合实验活动分析, 实验操作一般由 2 名人员共同进行, 操作人员手部在进生物安全柜时都会消毒或更换外层手套, 且对柜内转移物品进行表面消毒处理, 提示转移出生物安全柜外的实验物品表面, 可能携带消毒后的核酸片段, 实验人员通过拿取或存放物品等操作污染

物表。形成良好的实验室操作技术避免产生气溶胶, 以及实验完成后对需要留存的实验室材料进行彻底消毒是控制生物安全风险关键。结合本实验室当前管理规范及要求及人员操作情况进行风险分析, 提出 5 个改进措施, 分别为:

①加强实操培训考核和监督检查; ②主、辅操作实验人员进一步明确分工和职责; ③严格控制操作人员手部进出生物安全柜频次, 严格更换外层手套; ④明确实验物品(清洁区)和废弃物(潜在污染区)出入生物安全柜路径; ⑤监督落实实验清场的清洁消毒步骤。

2.6 实验室管理实施改进措施后环境物表污染监测结果

通过全面培训宣贯, 落实改进措施, 在 2023 年 1 月至 12 月实验室从事高致病性病原微生物实验活动期间, 选择手操作可能接触的高风险物表进行采样, 分别为 4 °C 冰箱门把手、离心机按键、传真机和对讲机按键、培养箱门把手、-80 °C 冰箱门把手、显微镜载物旋钮、生物安全柜把手和按键、消毒剂喷壶外表共 8 项。每个病原体单独使用一个核心区, 每月采样 1 次, 每次每个核心区采样 8 份, 其中, 新型冠状病毒连续 7 个月开展实验活动, 包括期间连续 2 个月使用 2 个核心区, 小计采样 72 份; 猴痘病毒(连续 5 个月)及艾滋病毒(I 型)(连续 3 个月)分别采样 40 份和 24 份, 合计 136 份, 检测出阳性样本 0 份。

3 讨论与结论

本研究通过系统分析 BSL-3 实验人员操作高致病性病原微生物时手部接触对关键物表的污染风险, 揭示了污染分布特征及主要控制环节。研究结果显示, 实验室物表污染的总体阳性率为 2.96%($P < 0.05$), 主要集中在实验室核心工作间, 在 44 °C 冰箱门把手、离心机按键、对讲机按键、培养箱门把手、-80 °C 冰箱门把手、显微镜载物旋钮共 6 个采样部位检测到阳性结果, 阳性检测率为 3.12%, 高于实验室总阳性检测率 2.96%, 但均低于雷亚克等^[5]报道的 16.28%。结合实验活动分析, 操作者戴着手套的手在转移物品和观察结果后直接或间接接触造成的污染, 与 Lv J 等^[4-5]报道的在实验室污染物监测中发现所有的阳性物体都是由操作者戴着手套的手直接或间接接触的一致。此外, 比较分析 12 份阳性采样结果的核酸检测 CT 值介于 35 至 40 之间, 郑焕英等^[10]的报道提示阳性监测部位存在活病毒的可能性极少。针对上述问题, 结合本实验室当前管理规范及要求及人员操作情况进行风险分析, 提出 5 个改进措施, 并验证其有效性。本研究通过发现问题—原因分析—改进措施—效果验证等过程, 发现采取实验室终末消毒、生物安全柜分区规范使用、人员区分主辅

操作等风险防范措施后, 分别在新型冠状病毒、猴痘病毒及艾滋病毒(I 型)实验活动期间每月进行环境关键物表采样共 136 份, 连续监测样本阳性率降至 0%, 污染风险显著降低。

本研究基于 406 份大样本数据首次量化了 BSL-3 实验室人员操作手接触对物表污染的空间分布特征, 为实验室风险管控提供科学依据, 同时, 提出加强实操培训考核和监督检查、主/辅操作实验人员进一步明确分工和职责、生物安全柜规范使用、实验人员更换手套等措施的实施, 可有效解决手接触对实验室环境物表的污染, 为高等级生物安全实验室的操作规程优化提供了数据支持和实践依据, 为实现“零污染”目标提供了重要参考依据。

参考文献

- [1] 中华人民共和国生物安全法 [EB/OL]. (2020-10-17) [2024-11-01]. https://www.mee.gov.cn/ywgz/fgbz/fl/202303/t20230314_1019536.shtml.
- [2] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-GL045: 2020 病原微生物实验室生物安全风险指南[S]. 北京: 中国合格评定国家认可委员会, 2020.
- [3] ZUO K L, WU Z Z, ZHAO C H, *et al.* Risk and countermeasure of laboratory-acquired infection based on pathogen transmission routes [J]. *Biosafety and Health*, 2023, 5(3): 133-137.
- [4] LV J, YANG J, XUE J, *et al.* Detection of SARS-CoV-2 RNA residue on object surfaces in nucleic acid testing laboratory using droplet digital PCR [J]. *The Science of the total environment*, 2020, 742: 140370.
- [5] 雷亚克, 戴莹. 生物安全实验室模拟操作性污染检测及目标病毒污染现状调查[J]. *实用预防学*, 2018, 25(11): 1397-1399.
- [6] 新型冠状病毒感染防控方案(第十版)[J]. *中国病毒病杂志*, 2023, 13(2): 108-110.
- [7] 猴痘防控技术指南(2022年版)[J]. *中国病毒病杂志*, 2022, 12(4): 245-254.
- [8] 中华医学会感染病学分会艾滋病学组, 中国疾病预防控制中心. 中国艾滋病诊疗指南(2024版)[J]. *中华临床感染病杂志*, 2024, 17(3): 161-190.
- [9] 曾志强, 杨孝祥, 蒋国斌, 等. 9%过氧化氢在生物安全三级实验室终末消毒中的应用[J]. *中国热带医学*, 2020, 20(7): 649-352.
- [10] 郑焕英, 张官婷, 柯碧霞, 等. 新型冠状病毒荧光定量PCR的Ct值与病毒分离的结果分析[J]. *病毒学报*, 2023, 39(1): 199-205.