

**2-Й НАУЧНЫЙ СЕМИНАР С МОЛОДЕЖНОЙ ШКОЛОЙ
«Биотехнология новых материалов
и окружающая среда»
Красноярск, 12–15 июня 2012**

**СОВРЕМЕННЫЕ ПРИНЦИПЫ
БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ В
ЛАБОРАТОРНЫХ УСЛОВИЯХ**

С.В.Нетёсов

**Новосибирский государственный университет
и
ФБУН «ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор»»**

Введение

Какова цель конструирования лабораторий по типу биоизоляции и внедрения принципов биобезопасности в практику?

- Предотвращение внутрилабораторных инфекций
- Предотвращение вторичных инфекций у населения в целом
 - Передача от сотрудника лаборатории, в ведении которого находится биоагент, к другим лицам
 - Непосредственная передача путем выброса агента («утечки») из лаборатории
- Предотвращение заражения окружающей среды
 - Вторичная передача к популяции животных

Внутрилабораторные инфекции

Случаи внутрилабораторных инфекций (ВЛИ) продолжают отмечаться до сих пор

Однако, точные данные об их реальном количестве отсутствуют по следующим причинам:

- Сотрудники лабораторий не сообщают о них
- Во многих странах отсутствуют официальные законодательные требования на такое действие

За последние 20 лет наблюдалась тенденция к снижению количества случаев ВЛИ благодаря:

- положительным сдвигам в области биобезопасности и биоохраны
- обучению современным принципам биобезопасности

Справочные материалы по ВЛИ

Статистика по ВЛИ, 1930 – 2001 гг. (Harding & Byers)

- **Всего: 5,346 LAI**
- **190 смертельных случаев**
 - **вероятное занижение показателей в отчётности**
 - **множество бессимптомных инфекций**

Fleming DO, Hunt DL. Биологическая безопасность: принципы и практика. 3-е изд. Вашингтон, округ Колумбия: ASM Press; 2000:35-54.

Одна из глав: Harding AL, Byers KB. Эпидемиология внутрилабораторных инфекций.

Перечень десяти наиболее часто встречающихся ВЛИ

Десять наиболее часто встречающихся ВЛИ, 1979 – 2004 гг.*

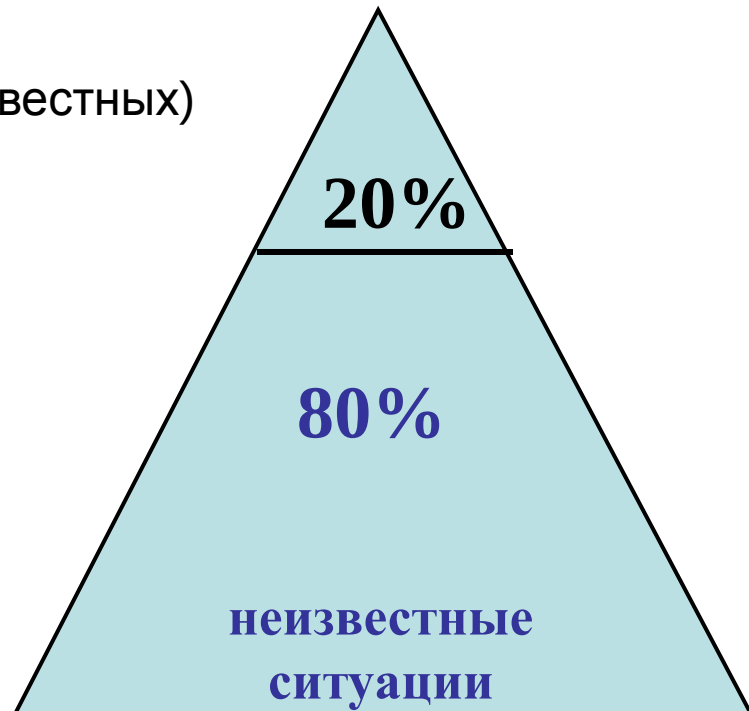
Всего 1,141 внутрилабораторных инфекций в литературном обзоре
Желтым отмечены те болезни, которые могут передаваться аэрозольным путем.

• <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (туберкулезная бактерия)	199 случаев	
• Арбовирусы	192	
• <i>Coxiella burnetii</i> (лихорадка Ку)		177
• Хантавирус	155	
• Бруцелла	143	
• Гепатит В	82	
• Шигеллы образец	66	
• Сальмонелла образец	64	
• Гепатит С	32	
• <i>Neisseria meningitidis</i>	31	

Биологическая безопасность, принципы и практика. ASM Press. 2006 г.*

Виды аварий в лаборатории

- Несчастный случай (проливания, разбрызгивания, разбрызгивание из иглы и шприца, порезы остроконечными предметами и бой посуды, укусы и царапины, аспирация пипеткой, непредвиденные ситуации)
- Разбрызгивания при обслуживании животных
- Контакт с загрязненными клиническими образцами
- Контакт с отработанной посудой
- Вскрытие лабораторных животных
- Преднамеренное инфицирование
- Выделение вредных аэрозолей (известных)
- Работа с возбудителем
- Неизвестные ситуации



Недавние случаи ВЛИ



Вспышка внутрилабораторной инфекции SARS Китай, март-апрель 2004 г.

- Возникла в Пекине и провинции Анхуи, вопросом занимался Национальный институт вирусологии и Центр по контролю за заболеваниями Китая
- Причиной вспышки явилась неудавшаяся или незавершенная инаktivация SARS-CoV (холодная инаktivация)
- Затронула две подтвержденные цепочки передачи SARS-CoV (коронавирусной инфекции)
 - Три стадии распространения, что в результате привело к 9 случаям инфицирования
 - Серологический анализ по персоналу лаборатории выявил еще три случая с серологической конверсией и один из них вероятнее всего был инфицирован в начале февраля 2004 г.



Недавние случаи ВЛИ - 2

Вспышка ящура в Англии Англия, август 2007 г.

- ❖ 3 августа 2007 года в деревне на юго-западе от Лондона возникла вспышка болезни ящур у коров. Далее вирус ящура распространился на еще несколько деревень графства Суррей.
- ❖ Расследованием занимался Департамент науки Минсельхоза Англии.
- ❖ Причиной вспышки явилась течь в канализации от здания, в котором производили инактивированную вакцину против ящура (компания «Мюриел»). После этого почва с вирусом была разнесена колесами грузовиков по окрестным деревням.
- ❖ Ущерб - несколько десятков миллионов фунтов стерлингов и запрет на экспорт мясопродуктов из Великобритании на несколько месяцев

Недавние случаи ВЛИ-3

5 случаев вируса коровьей оспы в научно-исследовательских лабораториях, 2005-2007 гг., США

- разбрызгивание из шприца при осуществлении инъекции мышам

2 случая бруцеллы в клинических лабораториях, 2006 г., США

- пересев на открытом рабочем столе

21 случай сальмонеллеза в лаборатории по производству вакцин, 2006 г., США

- пролитая высококонцентрированная суспензия

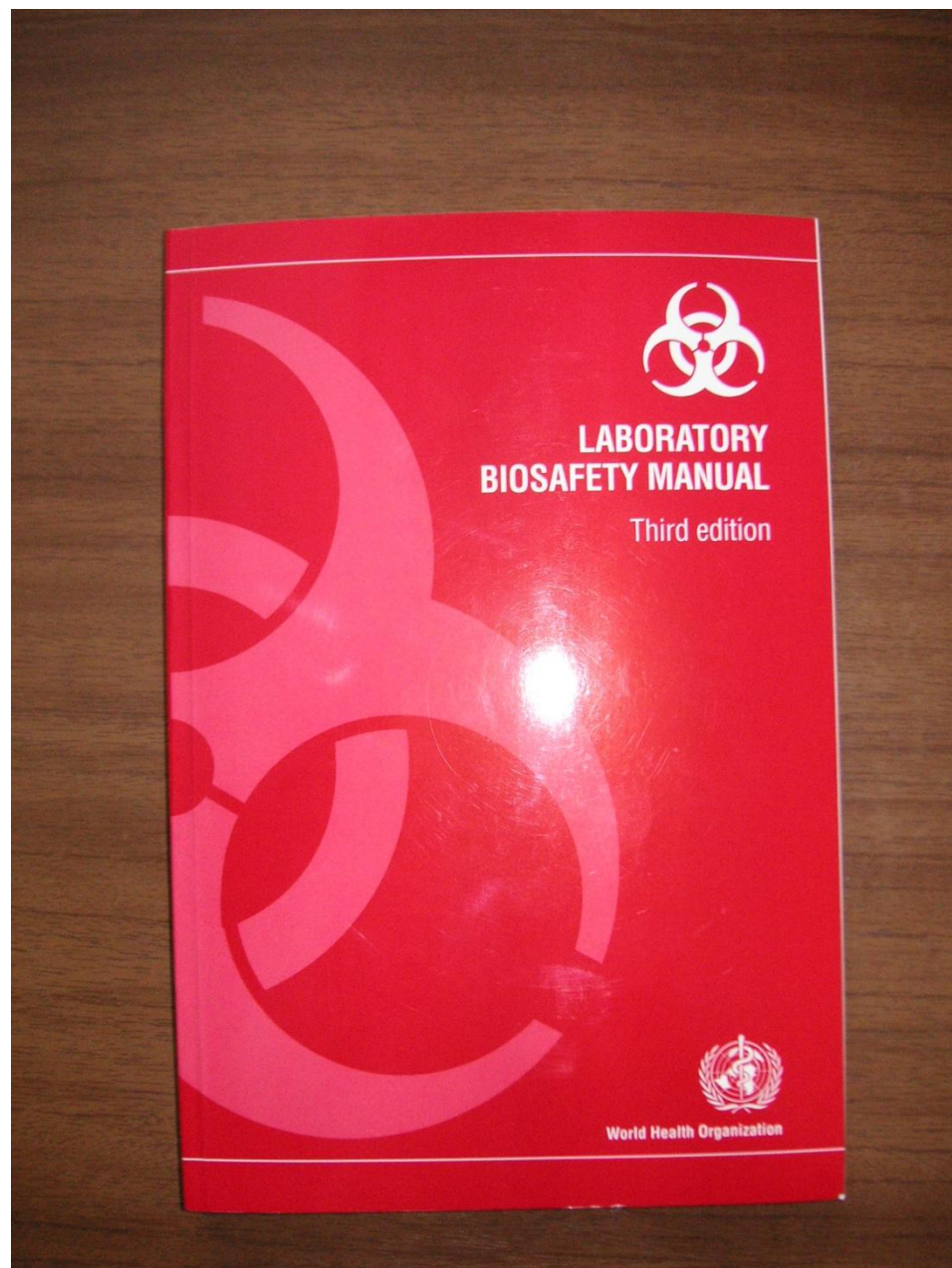
1 случай менингококкового менингита в научно-Исследовательской лаборатории, 2006 г., Швеция

- работа на открытом рабочем столе, невакцинированный сотрудник

1 случай менингококкового менингита типа В в научно-Исследовательской лаборатории в США, Калифорния, 2012 г., смерть в течение 2 суток после появления симптомов

- источник пока не выявлен

**Рекомендации
ВОЗ по
лабораторной
биобезопасности,
3-е издание, 2004**

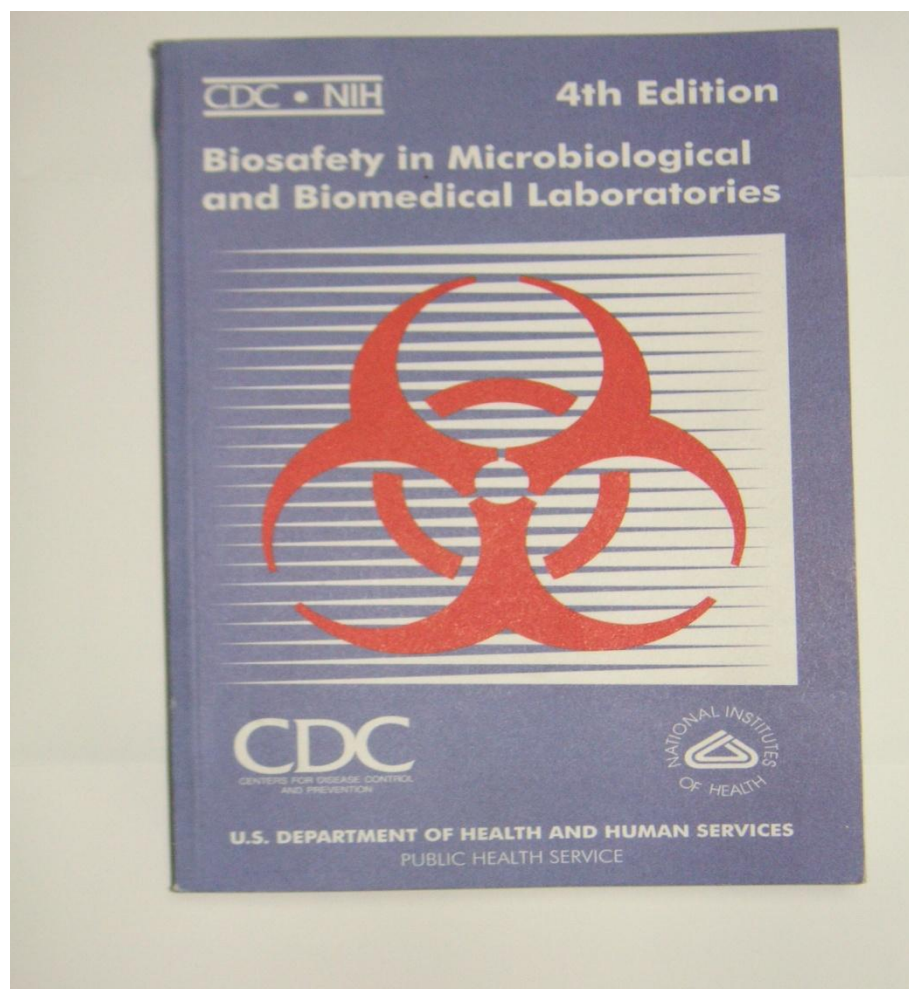
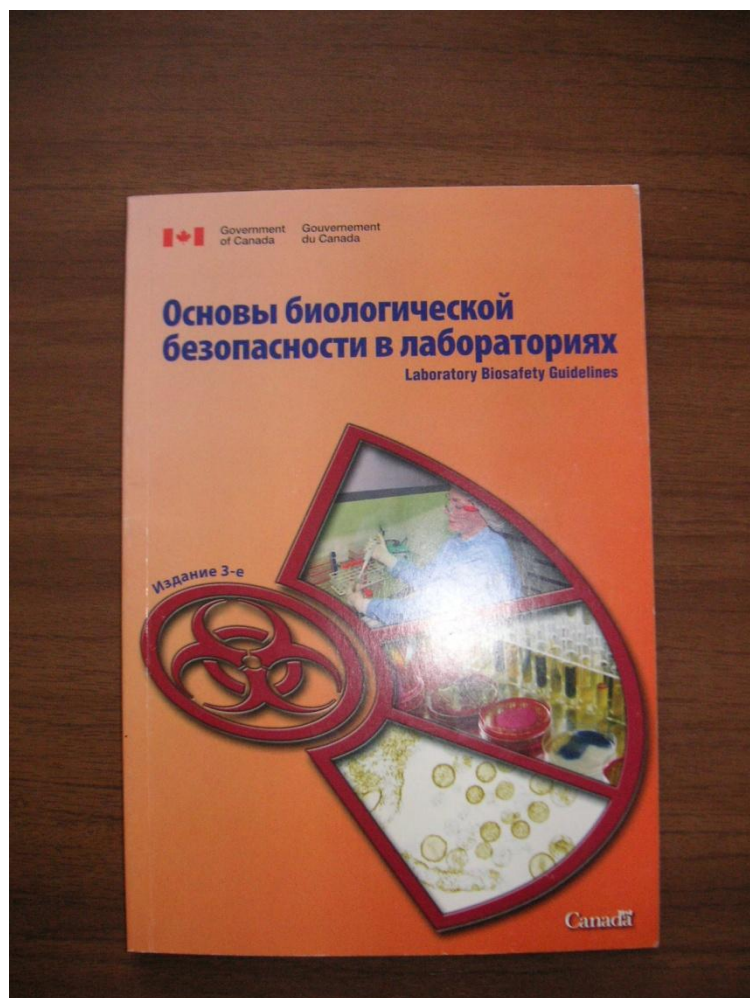


Оглавление Рекомендаций ВОЗ

Введение и Общие принципы

- 1. Правила биобезопасности
- 2. Физическая биобезопасность в лаборатории
- 3. Лабораторное оборудование и безопасность
- 4. GMT – Правильная микробиологическая техника
- 5. Введение в биотехнологию
- 6. Химическая, пожарная и электробезопасность
- 7. Организация безопасности и тренинг
- 8. Контрольные проверки безопасности
- 9. Ссылки, литература, приложения и алфавитный указатель

Руководства по биобезопасности Канады (2004) и США (2007, здесь - обложка издания 1999 г.)



Определения биобезопасности как инженерной дисциплины, науки и политического термина

- **Биологическая безопасность как инженерная дисциплина** – это система медико-биологических, организационных и инженерно-технических мероприятий и средств, направленных на защиту работающего персонала, населения и окружающей среды от воздействия патогенных биологических агентов
- **Биологическая безопасность как наука** объединяет теорию и практику защиты человека от опасных биотических факторов.
- **Национальная биологическая безопасность** – это система организационных и технических мер, направленных на предотвращение ущерба и достижение защищенности личности, общества и государства от потенциальных и реальных биологических угроз.

Три задачи биобезопасности

- **Защита окружения при работе с патогенами : окружающей среды и людей, живущих вблизи лаборатории\завода.**
- **Защита персонала лаборатории\завода.**
- **Защита продукта**

Обновленный перевод некоторых терминов

- ***biosecurity*** - «биоохрана», комплекс мер по обеспечению сохранности инфекционных патогенов в лаборатории и недопущения их несанкционированного выноса,
- ***biocontainment*** - «биоизоляция», комплекс мер по минимизации высвобождения инфекционных патогенов в окружающую среду или в другие помещения лаборатории, для этого исходно не предназначенные.
- ***biosafety cabinet*** - бокс/кабинет биобезопасности (БББ). Они бывают 1-3 классов
- **HEPA filter** – высокоэффективный фильтр очистки воздуха от микрочастиц
- **HVAC system** – система обогрева, вентиляции и кондиционирования воздуха (система ОВКВ)
- **Near-miss** - промах при проведении экспериментальной работы без аварийных последствий
- **GLP** – надлежащая лабораторная практика.
- **NSF** – национальная санитарная организация (стандарт NSF 49 для БББ)
- **CCTV** – замкнутая система видеонаблюдения ограниченного доступа
- **CMMS** – компьютерная система управления инженерным оборудованием.

Классификация инфекционных микроорганизмов по группе риска (ВОЗ)

- **Группа риска 1** - не вызывают видимых, угрожающих для жизни болезней человека и животных. Низкая или отсутствует индивидуальная и общественная опасность.
- **Группа риска 2** - патогены, вызывающие болезни человека и животных, но не являющиеся серьезной угрозой для лабораторных работников, населения, животноводства или окружающей среды. Лабораторный контакт может вызвать серьезную инфекцию, но эффективное лечение и превентивные меры, в том числе почти всегда вакцины, доступны, и поэтому риск распространения инфекции предельно ограничен. Умеренная индивидуальная и низкая общественная опасность
- **Группа риска 3** - патогены, вызывающие серьезные заболевания человека, но не передающиеся легко от одной особи к другой. Эффективное лечение и превентивные меры, включая вакцины – доступны. Высокая индивидуальная и низкая общественная опасность
- **Группа риска 4** - опасные патогены, обычно вызывающие серьезное заболевание людей или животных, с большой смертностью и/или большим эпидемическим потенциалом (легко передаются от одной особи к другой), как правило, не защищаемые вакцинами и без средств эффективной терапии, Высокие индивидуальная и общественная опасность.

Отнесение патогенов к группам опасности согласно ВОЗ

ВОЗ в настоящее время не дает распределения патогенов по группам опасности, но дает принципы и рекомендации по этой проблеме. На их основе страны и регионы должны разработать национальные\региональные классификации микроорганизмов по группам риска, принимая во внимание:

1. Патогенность микроорганизма
2. Способ его передачи и спектр хозяев в данной стране\регионе; существующий уровень иммунизации населения против этого патогена, плотность и интенсивность передвижения локального населения, наличие в природе специфических переносчиков и носителей, наличие и уровень в стране стандартов гигиены окружающей среды.
3. Локальная доступность эффективных протективных мер (иммунизация, вакцинация, пассивная иммунизация, санитарные меры, контроль животных-резервуаров и переносчиков-членистоногих).
4. Локальная доступность эффективного лечения, включающего пассивную иммунизацию, вакцинацию сразу после заражения, и использования средств терапии, а также принимая во внимание вероятность появления MDR-штаммов.

Сравнение списков биоагентов некоторых групп опасности

Биоагент	Список России	Список США	Список ВОЗ
Вирус натуральной оспы	1	4	4
Филовирусы	1	4	-
Аренавирусы	1	4	-
Вирус ККГЛ	2	4	-
Бактерия чумы (Y.pestis)	1	2,3	-
Холерный вибрион	2	2	-
Сибирская язва (B.anthraxis)	2	2,3	-
Возбудитель туляремии	2	2	-
Высокопатогенные вирусы гриппа HPAI	3	3	-
Вирусы ВИЧ-1 и 2	2	2	-
Вирус гепатита В, С и Д	2	2	-
Вирус Хантаан	2	3	-
ТОРС-коронавирус	2	2,3	-
Вирус клещевого энцефалита и ОГЛ	2	4	-

Взаимоотношения между группами риска и уровнями биобезопасности

Группа риска	Уровень ББ	Назначение лаборатории	Лабораторные ограничения	Оборудование биобезопасности
1	BSL-1	Обычная учебная и исследовательская	GMT (Good Microbiological Technique)	Нет, обычная работа на столах
2	BSL-2	Обычная для практ. здравоохранения, диагностики и исследований	GMT + стандартная защитная одежда, знак биопасности	Обычные столы + биокабинеты (BSC) для ограничения распространения аэрозолей
3	Ограниченный закрытый блок – BSL-3	Специальная диагностика и исследования	Как в BSL2 + спец-одежда, огр. доступ, направленность потока воздуха	BSC + другое защитное оборудование для всех процедур
4	Максим. ограничение, закрытый блок – BSL-4	Блоки для работы с самыми опасными патогенами	Как в BSL3 + возд.шлюз, душ, дезинфекция отходов	BSC 3 класса или скафандры + BSC 2 класса, 2-дв. Автоклав, фильтры в вентиляции

Организация и программа контроля биобезопасности

- Управление контролем биобезопасности в предприятии/учреждении
- Программа контроля биобезопасности предприятия/учреждения
- Комиссия по контролю выполнения правил биобезопасности предприятия/учреждения
- Отдел биобезопасности учреждения
- Обучение, экзамены и тренинги
- **Это КОЛЛЕКТИВНАЯ работа!**

НАИБОЛЕЕ РАСПРОСТРАНЕННЫЕ ИСТОЧНИКИ ВОЗМОЖНОГО ЗАРАЖЕНИЯ В БИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

- Прямой контакт с культурами микробов
- Манипуляции с живыми микробами
- Контакт с зараженными животными (опасности: укусы, царапины, манипуляции, вскрытие))
- Загрязненное оборудование (обрабатываются как с «чистым»)
- Поддержание порядка/уборка (производится теми, кто там не работал с вирусом)

Предотвращение заражения в лабораторных условиях

1. Стандартные и специальные микробиологические методики
2. Первичные барьеры
3. Вторичные барьеры

Микробиологические методики и Стандартные операционные процедуры должны содержать меры предосторожности, особенно при опасных процедурах

- Работа с патогенами
- Асептические меры
- Оральная аспирация пипеткой
- Случайная инокуляция шприцем
- Опасность при препарировании
- Вероятное возникновение аэрозолей и брызг
 - Брызги из шприцев
 - Открытие контейнеров
 - Смешивание, растирание, взбалтывание, перемешивание
 - Центрифугирование
 - УЗ дезинтеграция
 - Инокуляция и перенос



ОСТОРОЖНО



ВНИМАНИЕ



ОПАСНОСТЬ



**БЕЗОПАСНОСТЬ!
ПРЕЖДЕ ВСЕГО!**

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

Первичные барьеры (защитная одежда) для уровня BSL-4



**Защитная одежда для
работы по
выделению РНК в
боксе
биобезопасности 2
класса**

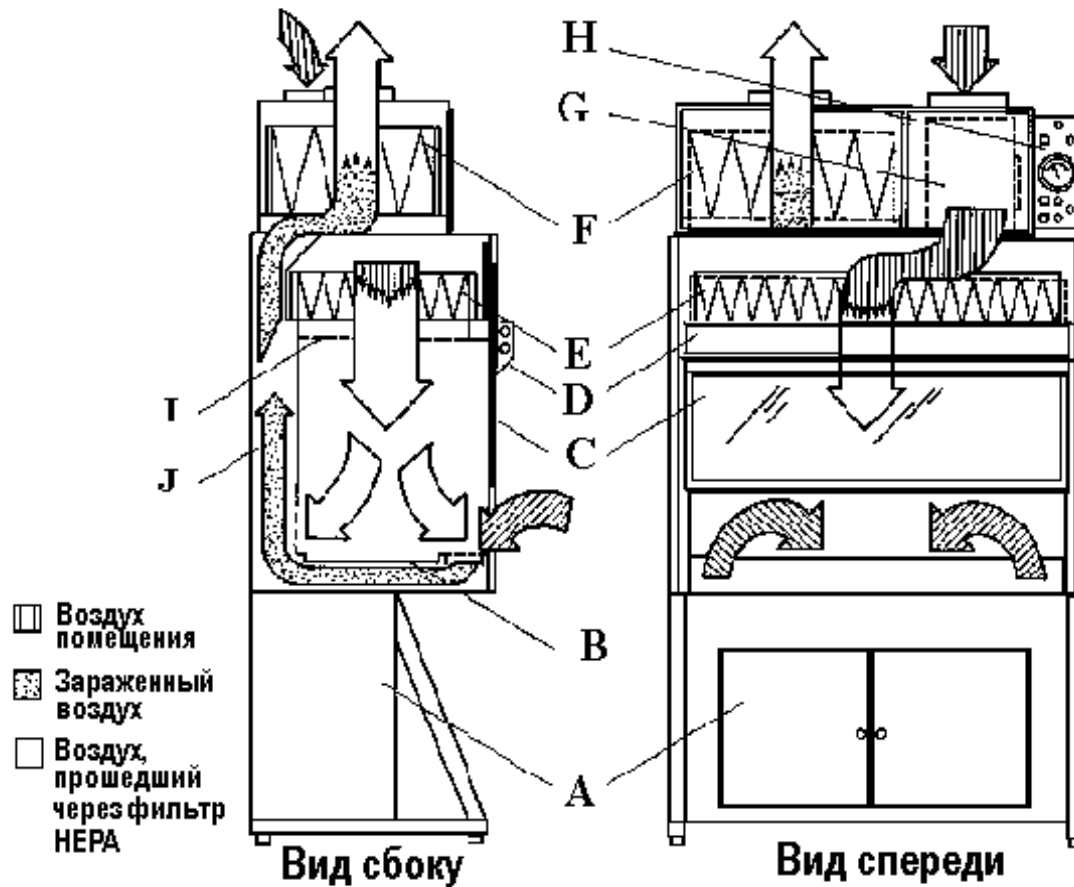


Первичные барьеры - 2

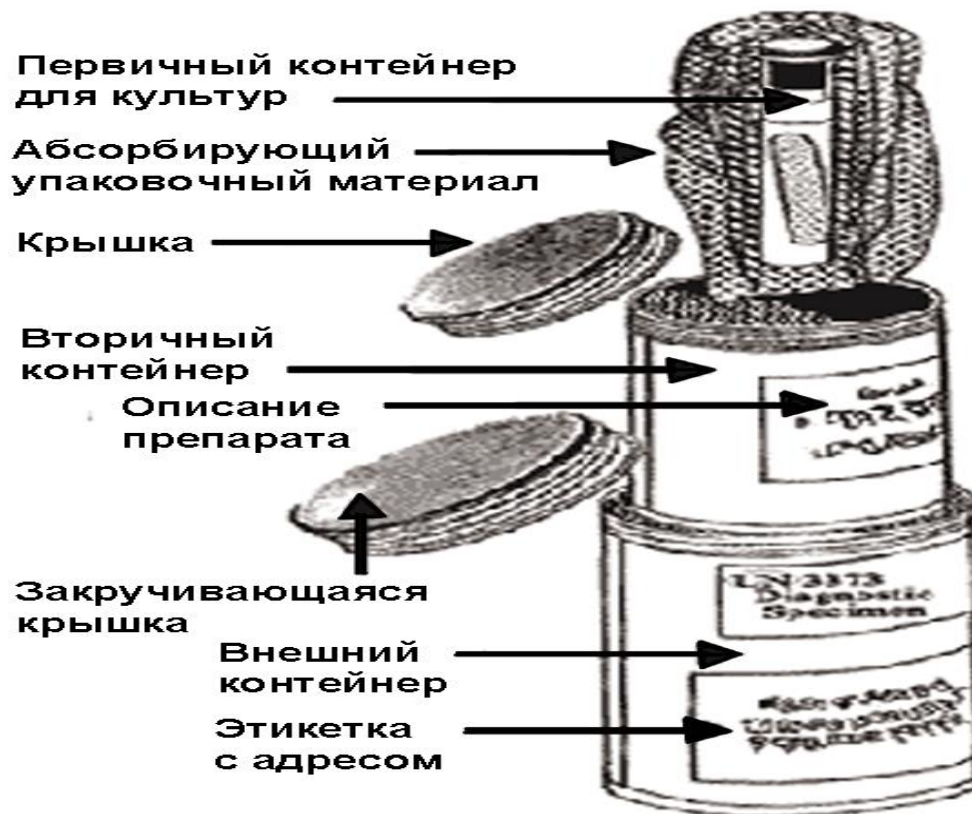
- Оборудование
 - Боксы/кабинеты биобезопасности
 - Ламинарные шкафы для работы с культурами клеток

Пример: Бокс биологической безопасности класса 2В

Иллюстрация 2с. Класс II. Тип В2. Бокс биологической безопасности



Примеры: Транспортировка образцов



Транспортировка в международные лаборатории

- Надо закупить соответствующую правилам IATA упаковку
- Необходимо направить пакет документов в Роспотребнадзор, если вывозится патоген
- Параллельно пакет отправляется в Росздравнадзор, согласно Закону об экспортном контроле
- Необходимо проработать вопрос доставки с лицензированной транспортной компанией (TNT, DHL, FedEx и др.)

Лабораторное оборудование

- Пипетки
- Центрифуги
- Смесители
- Гомогенизаторы
- УЗ- дезинтеграторы
- Инструменты многоразовые

Правила работы с ними должны быть написаны и утверждены в стандартных операционных процедурах (СОП)

Холодильники и морозильники

- Выбор
- Использование
- Ведение записей
- Очистка
- Обслуживание

**В целом для всех работ с холодильниками
нужно написать и утвердить стандартные
операционные процедуры (СОП) .**

Самые загрязненные части – ручки и запоры

Использование ампул

- Вопросы использования: опасно !
- Хранение
- Уничтожение
- Нужна замена на пластиковые флаконы с пробкой

Вторичные барьеры - 3

Защита окружающей среды:

- **Фильтрация воздуха (HEPA-фильтры и вентиляторы)**
- **Устройства по контролю чистоты выпускаемого воздуха**
- **Небольшой перепад давления между обычными комнатами и зоной для работы с патогенами**
- **Герметичность зоны – тест на натекание 5-7 минут**
- **Иногда – воздушная завеса для удаления мелких насекомых**

Обработка жидких отходов - проточные системы обработки паром или цистерны с периодическим пропариванием

- **Обработка твердых отходов в лаборатории - двухдверные автоклавы**

Стерилизация автоклавированием

Использование автоклава

- Наиболее надежное средство для стерилизации лабораторных материалов “сухим” или “мокрым” способом
- Лучше использовать двухдверный автоклав
- Индикаторы стерилизации - биологические или химические индикаторы



Борьба с насекомыми и грызунами

- План по комплексной борьбе с паразитами (IPM)
 - План объекта
 - Мониторинг
 - Санитарная обработка и обслуживание объекта
 - Коммуникации
 - Ведение записей
 - Борьба с паразитами без пестицидов
 - Борьба с паразитами с использованием пестицидов
 - Оценка и обеспечение качества программы
 - Техническая экспертиза
 - Безопасность

Основные проблемы в мире

- **Биоохрана - физическая биобезопасность - максимально обеспечить охрану хранения патогенов и их транспортировку**
- **Максимально повысить чувствительность методов выявления патогенов**
- **Интенсифицировать обмен штаммами – для разработки вакцин и лечебных препаратов и для взаимопроверки (пример: клетки HeLa)**
- **Работа с животными: автоматизация опасных процедур**
- **Ликвидация сибиреязвенных могильников**
- **Нозокомиальные инфекции**

Основные задачи в России

- Классификация уровней биобезопасности в России не соответствует международной – она обратная. Мы – **ЕДИНСТВЕННАЯ** страна в мире с такой классификацией!
- Устарели правила учета, хранения и транспортировки патогенов (они не меняются с 1995 года!). Нет сертифицированных контейнеров для транспортировки
- Правила биобезопасности по работе с патогенами и по диагностике патогенов надо привести в соответствие с новой версией рекомендаций ВОЗ
- Необходима унификация медицинских правил с ветеринарными правилами
- Биоохрана - физическая биобезопасность – существенно отстает от международных стандартов
- Инженерный уровень лабораторий и его нормативная база (СНиПы) устарели
- Необходимо усилить международное взаимодействие: обмен штаммами, участие в международных обществах по биобезопасности и конференциях по этой тематике
- Должна быть проведена модернизация образовательных программ в области биобезопасности и биоэтики в соответствии с последними рекомендациями ВОЗ и ООН

Литература по биобезопасности

- **Антология биобезопасности в 10 томах (есть в библиотеке НГУ)**
- **Рекомендации ВОЗ, 2004 года издания**
- **Стандарты ЕС (по оценке рисков)**
- **Специализированные журналы обществ ABSA, EBSA и других**
- **Интернет-сайты обществ биобезопасности**

Русскоязычная литература по биобезопасности

1. М.Н.Ляпин, Е.М.Головко, Т.А.Малюкова, И.Н.Ежов, Т.А.Костюкова, В.В.Кутырев, С.Д.Кривуля, Ю.М.Федоров, И.Г.Дроздов, С.В.Нетесов, А.Н.Сергеев, Е.А.Ставский. Биологическая безопасность. Термины и определения.- Саратов: ОАО «Приволжское книжное издательство», 2006.- 112 стр.
2. М.А.Пальцев, А.Л.Гинцбург, Н.Н.Белушкина. Биологическая безопасность. Глоссарий. – Москва: Издательский дом «Русский врач», 2006.- 448 стр.
3. Г.Г.Онищенко, М.А.Пальцев, В.В.Зверев с соавт. Биологическая безопасность. – Москва.- ОАО «Издательство «Медицина».-2006.-304 стр.
4. Перевод Стандарта управления биорисками в лаборатории (CWA 15793) – на сайте НП ТЭМП.
5. Руководство по биобезопасности Канады.- 2004.
6. Англо-русский гармонизированный словарь терминов по биобезопасности и биоохране. -2010.-

Интернет-сайты с текстами руководств по биобезопасности

ВОЗ : <http://whqilibdoc.who.int/publications/2004/9241546506.htm>

Россия :

- Безопасность работы в лаборатории, 3-4 группа:
<http://www.plib.ru/library/book/14084.html>
- Безопасность работы в лаборатории, 1-2 группа:
- <http://www.tehdoc.ru/files.1735.html>

США : www.cdc.gov/OD/ohs/biosfty/bmbl5/bmbl_5th_edition.pdf

Канада : www.phac-aspc.gc.ca/publicat/lbg-lbmbl-04/index.html

Интернет-сайты обществ по биобезопасности:

Северная Америка: www.absa.org

Европа: www.ebsaweb.eu

Международная биобезопасность: www.internationalbiosafety.org

- 2012: The Year of International Biosafety Advocacy

Как понизить уровень биологической опасности при работе с патогенами?

Через обучение

- Первичного звена (врачи, лаборанты)
- Перевозчиков проб
- Получателей проб
- “Так называемых экспертов”

Финансирование

- Оборудование лабораторий средствами биобезопасности
- Упаковка проб перед транспортировкой

Гибкость в совершенствовании инструкций

IFBA's 2nd International Conference will take place June 28-29, 2012 in Johannesburg, South Africa, immediately following the annual conference of the African Biological Safety Association (AfBSA). The IFBA conference provides a unique forum for policy makers, stakeholders, donors, international agencies and governments to interact with the African biosafety community and advance global biosafety and biosecurity.

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ !