

А.К.Никифоров, Е.Г.Абрамова, С.А.Еремин, М.Н.Ляпин

**ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ОБЕСПЕЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ РАБОТ СО ШТАММАМИ ФИКСИРОВАННОГО ВИРУСА БЕШЕНСТВА ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ АНТИРАБИЧЕСКОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА***ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов*

Проведен анализ работы со штаммами фиксированного вируса бешенства в условиях производства антирабического иммуноглобулина. Дана оценка эффективности разработанной системы биологической безопасности, обеспечивающей безопасное производство антирабического иммуноглобулина на протяжении 12 лет.

*Ключевые слова:* биологическая безопасность, фиксированный вирус бешенства, оценка риска

А.К.Nikiforov, E.G.Abramova, S.A.Eremin, M.N.Lyapin

**Evaluation of the Effectiveness as to the Provision of Biological Safety of Works with Fixed Rabies Virus in the Process of Anti-Rabies Immunoglobulin Manufacturing***Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov*

Analyzed is the performance of works with the strains of fixed rabies virus under the conditions of anti-rabies immunoglobulin manufacturing. Evaluated is the effectiveness of the established system for the provision of biological safety, which has allowed for safe manufacturing of anti-rabies immunoglobulin within the period of 12 years.

*Key words:* biological safety, fixed rabies virus, risk assessment.

В классических работах *R.M.Pike* и *S.E.Sulkin* [9–12, 14] сообщалось о 4079 случаях лабораторного заражения при работе с возбудителями инфекционных болезней, которые привели к 168 смертельным исходам, произошедшим между 1930 и 1978 гг. Однако в 2000 г. *A.L.Harding* и *K.B.Byers* [6] отмечают, что улучшение качества лабораторного оборудования, совершенствование технических средств контроля и возросшее внимание к микробиологической технике безопасности смогли внести существенный вклад в снижение случаев лабораторного инфицирования за последние два десятилетия.

Особое место в укреплении лабораторной биологической безопасности отводится разработке регламентирующих документов, публикациям, посвященным указанной теме. Многие опубликованные работы освещают практические приемы и методы, которые позволяют предотвратить случаи внутрилабораторного заражения [4, 13]. Наше сообщение относится к указанной категории публикаций и базируется на двенадцатилетнем опыте работы со штаммами фиксированного вируса бешенства (*virus fixe*), используемыми при производстве антирабического иммуноглобулина.

Цель исследования – оценка эффективности обеспечения биологической безопасности работ со штаммами фиксированного вируса бешенства при производстве антирабического иммуноглобулина.

**Материалы и методы**

Материалом для исследования служили нормативные документы (методические указания, регламент производства, стандартные операционные процеду-

ры), регламентированные лабораторные методики, а также используемое при работе с фиксированным вирусом бешенства технологическое оборудование и квалификационные требования, предъявляемые к персоналу лаборатории. В работе использовали аналитический метод с инструментальной оценкой рисков.

**Результаты и обсуждение**

В 1999 г. согласно решению межведомственной комиссии Совета безопасности Российской Федерации по охране здоровья населения (№ 1 от 24.10.2000 г.) и поручению Главного государственного санитарного врача Российской Федерации (№ 2510/12020-99-26 от 09.11.99 г.) институт «Микроб» приступил к организации технологической линии по масштабному производству гетерологичного антирабического иммуноглобулина. В процессе производства иммуноглобулина предусмотрено использование штаммов фиксированного вируса бешенства – штамма Москва 3253 для иммунизации лошадей-продуцентов и штамма CVS для постановки регламентированных контрольных тестов.

Одной из основополагающих задач вновь созданной в 1999 г. лаборатории профилактических иммуноглобулинов являлась разработка нормативных документов, регламентирующих правила работы с производственными штаммами фиксированного вируса бешенства. Таким документом стали методические указания «Безопасность работы с производственными штаммами фиксированного вируса бешенства» (МУ 3.3.1.1099-02, 2002). Разработке подобных документов предшествует процедура оценки опасности внутрилабораторного заражения с позиций оценки рисков [4, 5, 7]. Результатом ее выпол-

нения является определение степени опасности для обоснования и выработки комплекса адекватных мероприятий по обеспечению безопасности работ с конкретным возбудителем в конкретных условиях, включая производственные.

На начальных этапах работы необходимо было четко сформулировать и оценить риски, с которыми могут столкнуться сотрудники, выполняющие стандартные технологические операции по изготовлению органотканевого рабического антигена.

Оценка риска представляет собой аналитический процесс, результаты которого позволяют выбрать подходящие практические методики, оборудование и определить требования к помещениям, которые способны предотвратить или минимизировать риск внутрилабораторного заражения до приемлемого уровня.

Основными факторами, которые были учтены при оценке риска и выборе мер предосторожности при работе с *virus fixe*, являются группа патогенности возбудителя и степень опасности лабораторных процедур.

Одним из эффективных инструментов для проведения оценки микробиологического риска является перечень критериев, лежащих в основе формирования групп риска при работе с патогенными биологическими агентами.

По классификации Всемирной организации здравоохранения, возбудители инфекционных заболеваний дифференцируются на четыре группы риска [6]. Однако простая ссылка на группу риска для фиксированных штаммов вируса бешенства была недостаточна для проведения оценки опасности.

Помимо критериев, отражающих степень опасности возбудителя инфекции, были приняты во внимание следующие дополнительные факторы: степень аттенуации штамма и его периферическая активность; потенциальные последствия возможного инфицирования; естественные пути передачи возбудителя; возможные пути инфицирования, вызванные манипуляциями в лабораторных условиях (парентеральный, воздушно-капельный); устойчивость вируса к факторам внешней среды; концентрация агента и объем материалов, которые предполагается использовать в работе; наличие на рабочем месте эффективных препаратов для местной обработки и постэкспозиционной профилактики.

Ранее были даны определения «фиксированный вирус бешенства» и «фиксация» [1]. Фиксированный вирус бешенства – это аттенуированный вирус уличного бешенства. Аттенуация была достигнута многократным пассированием на лабораторных животных, в результате чего вирус утратил способность поражать периферические нервы. Однако мы не осветили в полном объеме указанные выше вопросы, а именно: фиксированный вирус бешенства *Rabies virus* относится к роду *Lyssavirus* семейства *Rhabdoviridae*; способен вызывать заболевание только при интрацеребральном способе введения; полностью утратил способность накапливаться в слюне инфицирован-

ного животного. В связи с этим у штаммов фиксированного вируса бешенства отсутствует возможность естественного пути передачи. Помимо этого, он устойчив во внешней среде [3].

Понятие «аттенуированный» в отношении штаммов фиксированного вируса бешенства позволяет отнести их к III группе патогенности в соответствии с Санитарно-эпидемиологическими правилами СП 1.3.1285-03 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)» и СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней». Однако степень аттенуации требует уточнения, в частности, в вопросах использования названных штаммов при производстве антирабического иммуноглобулина.

Проведя углубленный литературный поиск, мы смогли документально доказать, что штамм фиксированного вируса бешенства Москва 3253 в течение многих лет применялся для приготовления антирабических вакцин с целью профилактики бешенства у людей [2]. Вакцину изготавливали из мозговой суспензии овец, инфицированных штаммом Москва 3253, и инактивировали добавлением фенола с экспозицией в течение 24 ч. Более того, в ответ на разлитую послевоенную эпизоотию бешенства было принято решение интенсифицировать антирабическое лечение и вводить пациентам данный тип вакцины неинактивированным. На протяжении четырех лет (с 1946 по 1949 год) препарат вакцины, представлявший собой 5 % вирусосодержащую неинактивированную мозговую суспензию, вводили пациентам подкожно в клетчатку живота ежедневно на протяжении 40 дней в суммарном объеме, достигавшем 240 мл [3]. Учитывая данные аргументы, совместно со специалистами Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» (Кольцово, Новосибирская обл.) и лаборатории бешенства и оспы ГИСК им. Л.А.Тарасевича (НЦ ЭСМП, Москва) было принято коллегиальное решение об отнесении производственных штаммов фиксированного вируса бешенства к III группе патогенности, а фиксацию – к способам аттенуации.

Вторым по значимости критерием при оценке степени риска являются лабораторные манипуляции. В начале работы была определена степень опасности при экспериментах, связанных с заражением и вскрытием лабораторных животных, которые осуществляли на принципах моделирования и оценки принципиальной опасности и риска с позиций технического регулирования. Нами было установлено, что методики заражения и вскрытия лабораторных животных при работе с фиксированным вирусом бешенства весьма специфичны и требуют подробного рассмотрения с позиций биологической безопасности.

Критические этапы при проведении производственных процедур по приготовлению рабического антигена, выявленные при оценке рисков, связаны с интрацеребральным заражением лабораторных

животных, трепанацией черепа и получением вирусодержащей мозговой суспензии [8]. Основная опасность при манипуляциях, связанных с внутримозговым введением маточной культуры фиксированного вируса бешенства, обусловлена возможностью аэрозольного загрязнения воздушной среды лабораторного помещения. Кроме того, данный этап работы опасен тем, что во время проведения манипуляций животное может травмировать кожные покровы экспериментатора (укус, царапина). При изготовлении органотканевого рабического антигена для иммунизации продуцентов предусмотрены работы, связанные с использованием больших объемов инфицированного материала, что, согласно правилам СП 1.3.1285-03, оценивается как повышенная степень опасности и регламентирует использование дополнительных средств защиты персонала от возможного аэрозольного заражения.

На стадии трепанации черепной коробки кролика также присутствует опасность получения сотрудником травмы острым режущим инструментом или осколком кости, а на стадии приготовления мозговой суспензии высок риск создания аэрозоля.

В процессе разработки стандартных операционных процедур особое внимание было уделено указанным выше методикам с целью минимизации риска возникновения аварийной ситуации. Во-первых, во время работ по заражению лабораторных животных было регламентировано использование I типа противочумного костюма. Во-вторых, строго регламентировано количество персонала, выполняющего те или иные манипуляции с животными и их органами. В-третьих, при интрацеребральном заражении кроликов предусмотрена обязательная фиксация животного на станке, ограничивающая его подвижность, и использование специально разработанного пробойника для облегчения прохождения иглы шприца через черепную коробку. Фиксация животного в станке позволяет снизить риск получения травмы экспериментатором, а использование пробойника предупреждает забивание иглы костной тканью и снижает риск разбрызгивания инфицированного материала из шприца.

Для выполнения операции трепанации черепной коробки кролика был разработан специальный станок, обеспечивающий надежную фиксацию черепной коробки, что в значительной мере снижает риск получения травмы экспериментатором.

Вопрос в отношении возможности инфицирования персонала фиксированным вирусом бешенства воздушно-капельным путем при проведении манипуляций в лабораторных и производственных условиях в доступной литературе не изучался, что с методологических позиций безопасности требует рассмотрения сценария по наиболее неблагоприятному варианту. Для защиты сотрудников от аэрозоля, содержащего вирус бешенства, который может возникнуть при приготовлении мозговой суспензии, данный технологический этап был локализован в контролируемые условия бокса биологической безопасности

1БП2-ОС, подключенного к системе вентиляции, оснащенной фильтрами тонкой очистки воздуха и используемого в качестве прототипа бокса биологической безопасности III класса.

Не менее важным условием обеспечения безопасной работы при производстве антирабического иммуноглобулина, несомненно, являются требования к уровню квалификации персонала. К работе с фиксированными штаммами вируса бешенства допускаются специалисты, прошедшие профессиональную переподготовку с основами безопасной работы с патогенными биологическими агентами, регулярно повышающие квалификацию и имеющие соответствующий сертификат. Персонал допускается к работе с ПБА приказом директора учреждения после проведенной комиссионно проверки знаний действующей нормативно-методической, инструктивной документации и практических навыков. Кроме того, у всех сотрудников подразделения регулярно проверяют знания санитарных правил по безопасности работ с микроорганизмами I–IV групп патогенности, методических указаний и стандартных операционных процедур.

Производство антирабического иммуноглобулина в РосНИПЧИ «Микроб», организованное в 1999 г., начиналось с отработки технологических этапов получения препарата и выпуска экспериментальных серий. Серийный выпуск производственных серий препарата был налажен в 2004 г. С каждым годом происходило наращивание темпов и объемов производства, что, естественно, сопровождалось увеличением объемов изготовления органотканевого рабического антигена с использованием инфицированного материала и возрастанием количества инфицированных интрацеребрально животных (таблица).

Несмотря на десятикратное увеличение масштаба производственных работ по выпуску антирабического иммуноглобулина, за двенадцать лет наблюдений не было ни одного случая аварии при работе с

**Объемы производственных работ по изготовлению органотканевого рабического антигена и препарата иммуноглобулина антирабического**

Год	Кол-во инфицированных интрацеребрально фиксированным вирусом бешенства и вскрытых кроликов	Объем изготовленного органотканевого рабического антигена, л	Объем произведенного препарата иммуноглобулина антирабического, л
2000	505	30,3	30,0 *
2001	1246	74,76	45,0 *
2002	1014	60,84	50,0 *
2003	1260	75,6	55,0 *
2004	1051	63,06	71,9
2005	1450	87,0	115,5
2006	964	53,2	102,9
2007	1160	55,7	165,6
2008	1248	73,31	227,4
2009	1656	93,66	250,0
2010	1317	131,7	250,0
2011	1758	143,9	315,0
<b>Итого:</b>	<b>14629</b>	<b>943,03</b>	<b>1698,3</b>

\* Экспериментальные серии препарата.

фиксированным вирусом бешенства, в т.ч. получение травм сотрудниками подразделения.

Таким образом, можно заключить, что определенные в 1999 г. риски, разработанные нормативные документы (методические указания, регламент производства, стандартные операционные процедуры), регламентированные лабораторные методики, установленное технологическое оборудование и высокие квалификационные требования к персоналу лаборатории позволили создать эффективную систему биологической безопасности при производстве антирабического иммуноглобулина.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Никифоров А.К., Дятлов И.А., Еремин С.А., Волох О.А., Ляпин М.Н. Оценка риска как основа обеспечения биобезопасности работ с производственными штаммами фиксированного вируса бешенства. Пробл. особо опасных инф. 2006; 2(92):38–40.
2. Селимов М.А., Морогова В.М. Феноловые лиофилизированные вакцины из мозговой ткани овец. В кн.: Методы лабораторных исследований по бешенству. Женева: ВОЗ; 1975. С. 201–3.
3. Селимов М.А. Бешенство. М.: Медицина; 1978. 336 с.
4. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL). 5<sup>th</sup> edition. U.S. Department of Health and Human Services; Public Health Service; Centers for Disease Control and Prevention; National Institutes of Health; 2007. 360 p.
5. Fundamentals of biosafety in laboratories. 3rd edition. Department of Foreign Affairs and International Trade (Canada); 2004. 108 p.
6. Harding A.L., Byers K.B. Epidemiology of Laboratory-Associated Infection. In: Fleming D.O., Hunt D.L. Biological Safety: principles and practices. 3rd ed. Washington DC: ASM Press; 2000. P. 35–54.
7. Laboratory biosafety manual. 3<sup>rd</sup> edition. Geneva: WHO;

2004. 190 p.
8. Meslin F.-X., Kaplan V.V., Koprowsky H., editors. Laboratory techniques in rabies. Geneva: WHO; 1996. 469 p.
9. Pike R.M., Sulkin S.E., Schulze M.L. Continuing importance of laboratory-acquired infections. Am. J. Pub. Hlth. 1965; 55:190–9.
10. Pike R.M. Laboratory-associated infections: summary and analysis of 3921 cases. Health. Lab. Sci. 1976; 13:105–14.
11. Pike R.M. Past and present hazards of working with infectious agents. Arch. Pathol. Lab. Med. 1978; 102:333–6.
12. Pike R.M. Laboratory-associated infections: incidence, fatalities, causes, and prevention. Annu. Rev. Microbiol. 1979; 33: 41–66.
13. Richardson J.H., Barkley W.E., editors. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. 1st ed. Washington, DC; 1984.
14. Sulkin S.E., Pike R.M. Survey of laboratory-acquired infections. Am. J. Pub. Hlth. 1951; 41:769–81.

#### References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Nikiforov A.K., Dyatlov I.A., Yeremin S.A., Volokh O.A., Lyapin M.N. [Qualification of the risks as the basis for assuring biologically safe handling of the rabies virus production strains]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2006; (92):38–40.
2. Selimov M.A., Morogova V.M. [Phenol lyophilized vaccines obtained from the brain tissue of sheep]. In: [Methods of laboratory investigations on rabies virus]. Geneva: WHO; 1975. P. 201–3.
3. Selimov M.A. [Rabies]. M.: Meditsina; 1978. 336 p.

#### Authors:

Nikiforov A.K., Abramova E.G., Eremin S.A., Lyapin M.N. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russia. E-mail: rusrap@microbe.ru

#### Об авторах:

Никифоров А.К., Абрамова Е.Г., Еремин С.А., Ляпин М.Н. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru

Поступила 09.04.12.