

Jerzy Górski

Instytut Weterynarii  
Puławy**Bezpieczeństwo w pracowniach  
wirusologicznych****1. Znaczenie problemu**

W okresie ok. 100 lat funkcjonowania laboratoriów mikrobiologicznych wielokrotnie zdarzały się przypadki zakażeń wewnątrzlaboratoryjnych personelu i materiału badawczego lub produkcyjnego oraz środowiska zewnętrznego. Opisano zachorowania pracowników laboratoriów m.in. na różycę, salmonelozę, brucelozę, gruźlicę, grzybicę i toksoplazmozę oraz zakażenia wirusami pomoru rzekomego i retowirusami drobiu, adenowirusami psów, ospy oraz, o szczególnie ciężkim przebiegu, zakażenia herpeswirusowe i rhabdowirusowe (1,2,3). Spośród 25 osób, które uległy zakażeniu wirusem choroby marburskiej 7 zmarło. Źródłem zakażenia były narządy wewnętrzne pobierane od małp do zakładania hodowli komórek. Stosunkowo często zdarzały się przypadki zakażeń ubocznych w czasie namnażania wirusów drożdżakami, bakteriami lub mykoplazmami (4,5,6). Najgłośniejszym echem odbiło się stwierdzenie obecności onkogennego wirusa SV 40 w szczepionkach przeciwko poliomyelitis (7). Pracownie wirusologiczne były także wielokrotnie źródłem rozprzestrzeniania się chorób ludzi i zwierząt. Stosunkowo dobrze udokumentowano szereg epizootii związanych z działalnością laboratoriów pryszczycowych (8). Zakażenie środowiska zewnętrznego i wrażliwych zwierząt nastąpiło zarówno w wyniku stosowania szczepionki inaktywowanej, zawierającej resztkową zjadliwość (tj. pewną liczbę żywych cząsteczek wirusa), jak i wydania na zewnątrz materiałów zakaźnych (głównie mięsa) oraz drogą aerogenną.

Jak wynika z przedstawionych danych bezpieczna praca i zabezpieczenie epidemiologiczne i epizootologiczne stanowi ważny problem społeczny i gospodarczy. Stąd też we wszystkich krajach oraz w skali międzynarodowej, przywiązuje się do tego zagadnienia należyłą uwagę.

**2. Przyczyny zakażeń wewnątrzlaboratoryjnych  
oraz drogi zakażenia środowiska**

W laboratoriach wirusologicznych stosuje się zróżnicowane metody i techniki (zestawienie 1).

**Zestawienie 1****Metody badań i techniki wirusologiczne**

1. Izolacja i badanie patogenności wirusów w hodowlach komórkowych, na zarodkach i zwierzętach.
2. Badanie właściwości fizycznych i chemicznych oraz antygenowych wirusów.
3. Rozpoznanie mikroskopowe: badanie histopatologiczne, metody immunofluorescencji i immunoperoksydazowe oraz mikroskopia elektronowa.
4. Identyfikacja serologiczna: seroneutralizacja, odczyn wiązania dopełniacza, odczyn zahamowania hemaglutynacji, odczyn immunofluorescencji, metody immunoenzymatyczne i radioimmunologiczne.

5. Badanie struktur wirusowych: sekwencjonowanie kwasów nukleinowych, trawienie enzymami restrykcyjnymi, elektroforeza, immunoblotting, badanie odwrotnej transkryptazy.

6. Inżynieria genetyczna: mapowanie genomu, klonowanie genów, hybrydyzacja, PCR (*polimerase chain reaction*), rekombinacja DNA.

7. Liofilizacja, sonifikacja, ultrafiltracja, wirowanie i różne metody zagęszczania.

Prowadzenie, zarówno prac eksperymentalnych, diagnostycznych i produkcyjnych, wymaga specjalnych zabezpieczeń. Winny one chronić zarówno prawidłowy przebieg pracy i personel oraz środowisko zewnętrzne. Jest wiele czynników zagrażających przebiegowi prac wirusologicznych i funkcjonowaniu pracowni wirusologicznych. Najważniejsze i najczęstsze zagrożenia i ich źródła przedstawiono w tab. 1.

Tabela 1

**Zagrożenia dla funkcjonowania pracowni wirusologicznej**

Czynniki	Najczęstsze źródła
grzyby, drożdżaki, bakterie	owoce, odzież, przedmioty, a zwłaszcza opakowania, tkanki zwierząt, krew i surowica, zarodki i jaja, powietrze, nosiciele wśród personelu
mykoplazmy	surowica i krew, tkanki pobierane do zakładania hodowli komórek, jaja i zarodki, nosiciele wśród personelu
wirusy	tkanki używane do zakładania hodowli komórek, krew i surowica (np. cielęca <i>Mucosal disease</i> , herpeswirusy), jaja i zarodki (np. NDV, AE itp.), trypsyna (parwowirusy i wirus pomoru świń), personel (np. parainfluenza i herpeswirusy).

Pominięto natomiast inny rodzaj utrudnień w funkcjonowaniu pracowni, a związany z jakością wody i odczynników, ponieważ stanowi to odrębne zagadnienie.

Rozwijając aspekt zagrożeń stwarzanych przez laboratorium dla środowiska, analizie poddano potencjalne drogi i możliwości wydostania się drobnoustrojów poza laboratorium (zestawienie 2).

Zestawienie 2

**Potencjalne drogi zakażenia środowiska zewnętrznego wirusami z laboratorium produkcyjnego, kontrolnego, rozpoznawczego i badawczego**

1. Wprowadzenie do obrotu szczepionek inaktywowanych o resztkowej zjadliwości.
2. Niezainaktywowane odpady poprodukcyjne, tkanki zwierząt doświadczalnych, zestawy reagentów diagnostycznych.
3. Owady i gryzonie.
4. Aerozole sztucznie wytwarzane w czasie liofilizacji, sonifikacji, homogenizacji, wirowania, sączenia w nadciśnieniu i podciśnieniu, pękanie ampułek wyjętych z głębokiego zamrożenia oraz aerozole naturalne wytwarzane przez zwierzęta doświadczalne i nosiciele wśród personelu (kichanie, kaszel).
5. Nosicielstwo i stany podkliniczne wśród personelu i zwierząt doświadczalnych.
6. Odzież i przedmioty wydawane na zewnątrz bez odkażenia.
7. Ścieki.

Znaczenie poszczególnych dróg potencjalnego zakażenia środowiska jest zróżnicowane i uzależnione od rodzaju materiału zakaźnego, organizacji pracy, wyposażenia, kwalifikacji personelu i jego zdyscyplinowania.

Przez szereg lat bezpieczną pracą starano się zapewnić poprzez odpowiednią lokalizację pracowni wirusologicznych. Sytuowano je w warunkach naturalnej izolacji (np. w Niemczech na wyspie Riems, w Danii na wyspie Lindholm, a w USA na Plum Island). Jednak pomimo wprowadzenia ostrych reżimów sanitarnych (dla ludzi obowiązek całkowitej zmiany odzieży i kąpiel, a dla zwierząt bezwzględny zakaz wyprowadzania poza laboratorium i kremacja zwłok) zdarzały się przypadki wydostania się na zewnątrz wirusów i spowodowanie epizootii lub epidemii. Istotny postęp przyniosły prace z zakresu inżynierii materiałowej i skonstruowanie filtrów absolutnych o sprawności powyżej 99,99% i nad nowymi materiałami ściernymi, podłogowymi itp. oraz nowe prace projektowe umożliwiające zorganizowanie ciągów technologicznych, wydzielenie stref: jałowej i zakaźnej oraz postęp w organizacji pracy. W niniejszym opracowaniu zostaną przedstawione własne przemyślenia zebrane w związku z projektowaniem laboratoriów badawczych i produkcyjnych oraz uzyskane podczas zwiedzania ośrodków zagranicznych.

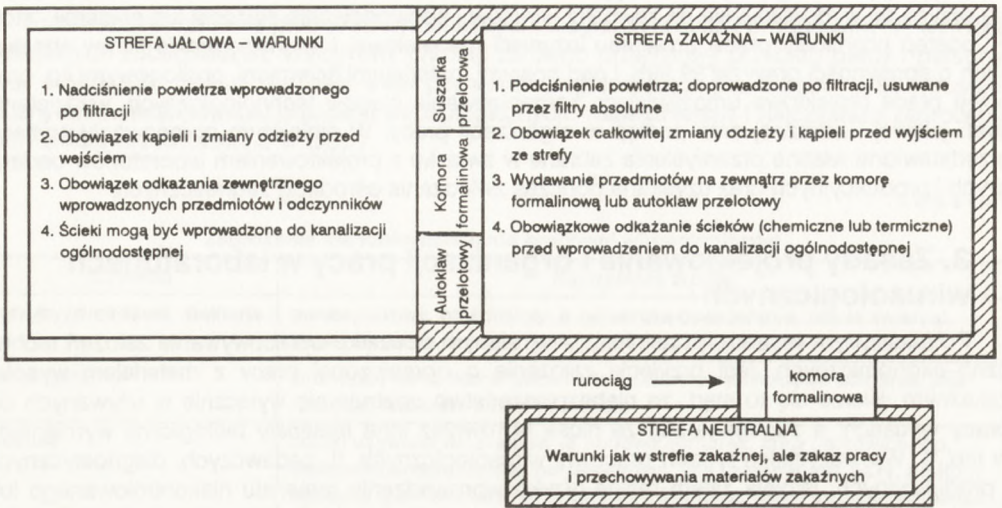
### 3. Zasady projektowania i organizacji pracy w laboratoriach wirusologicznych

Podstawowym błędem, popełnianym na samym początku opracowywania założeń techniczno-ekonomicznych, jest przyjęcie założenia o ograniczonej pracy z materiałem wysoko zakaźnym. Bierze się to stąd, że niebezpieczeństwo upatruje się wyłącznie w używanych do pracy wirusach, a zapomina się, że niosą je również inne materiały biologiczne wymienione w tab. 1. We wszystkich typach pracowni wirusologicznych, tj. badawczych, diagnostycznych i produkcyjnych, istnieje zatem realne ryzyko wprowadzenia materiału niekontrolowanego lub niedostatecznie kontrolowanego. Założenie, że personel może się uchronić przed zakażeniem przez prawidłowe korzystanie ze sprzętu ochrony osobistej i zastosowanie ostrych reżimów sanitarnych jest zawodne. Ponieważ tradycyjne sposoby okazały się zawodne, wprowadzono do pracy boksy laminarne typu biohazard. Ryzyko, choć zmniejszone, pozostało nadal ze względu na charakter metod i technik wirusologicznych (zestawienie 1). Jeszcze bardziej skomplikowanym zagadnieniem pozostaje uniknięcie kontaminacji materiału badawczego oraz stosowanie należytej izolacji dla zwierząt doświadczalnych. O ile zakażenia bakteryjne i grzybicze można skutecznie eliminować, to znacznie trudniej to osiągnąć w stosunku do mykoplazm, wirusów, riketsji i niektórych innych pasożytów wewnątrzkomórkowych. Biorąc pod uwagę możliwość powstawania rekombinantów, każde laboratorium wirusologiczne, prowadzące prace na zarodkach, zwierzętach i hodowlach komórek, może stanowić źródło zagrożenia, nawet jeżeli w pracach używa się wyłącznie wirusy o nieznacznej patogenności. Stosunkowo łatwą do realizacji, w większości pracowni wirusologicznych, jest zasada zorganizowania ciągu technologicznego, którego ostatnim elementem winien być autoklaw oraz rozdział na pomieszczenia strefy jałowej i zakaźnej (zob. schemat 1).

Winien on obowiązywać we wszystkich pracowniach produkcyjnych i prowadzonych pracach badawczych oraz diagnostycznych z wirusami stanowiącymi duże zagrożenie epidemiologiczne lub epizootologiczne. Powyższa zasada winna być bezwzględnie uwzględniona przy projektowaniu nowych pracowni wirusologicznych, a w miarę możliwości również przy wszelkich pracach remontowych i adaptacyjnych. Podany schematyczny układ jednopoziomowy może być zastąpiony układem dwupoziomowym. Korzystniejsze wówczas wydaje się zlokalizowanie strefy pracy jałowej na wyższej kondygnacji, a na niższej strefy zakaźnej. Przesyłanie mediów ze strefy jałowej do zakaźnej może odbywać się na zasadzie grawitacji. Natomiast, należy bezwzględnie unikać lokalizowania windy między strefami. Powstaje wówczas ciąg powietrza niosący często w formie aerozoli cząsteczki wirusów, bakterie lub zarodniki grzybów oraz umożliwiający wędrówkę gryzoniom i owadom. Podobnie negatywne skutki mogą być wywoływane źle zaprojektowaną wentylacją grawitacyjną lub mechaniczną prowadzoną w układzie pionowym. Także częstym źródłem zakażeń zewnętrznych może być nieszczęlna stolarka

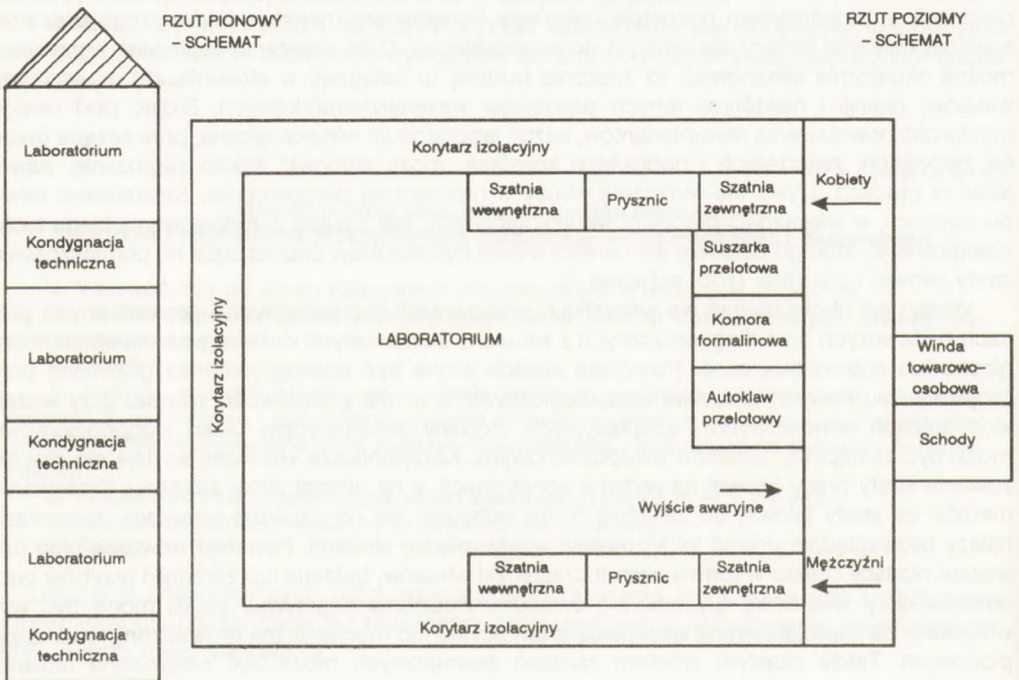
Schemat 1

### Klasyczny podział powierzchni w pracowni wirusologicznej



Schemat 2

### Najnowsze koncepcje projektowe dla laboratoriów wirusologicznych



okienna. Stąd też m.in. powstała w latach siedemdziesiątych idea projektowania laboratoriów wirusologicznych jako tzw. „pudełka w pudełku” (schemat 2).

Na przedstawionym ideowym schemacie widać korytarz zewnętrzny. Wejście i wyjście z laboratorium odbywa się przez służbę sanitarną z prysznicem, przyjmowanie i wydawanie materiałów termowrażliwych przez komorę formalinową, a pozostałych materiałów przez autoklaw przelotowy. Szczytowym osiągnięciem projektowym, jak się wydaje, jest naprzemienny układ kondygnacji. W budynkach wielopiętrowych kondygnacje laboratoryjne są oddzielone kondygnacjami technicznymi, a w budynkach, w których zlokalizowano laboratorium na 1 lub 2 poziomach urządzenia lokalizuje się w piwnicy (dezynfektor ścieków) i na poddaszu (zespół filtrów powietrza).

W uzupełnieniu podanych informacji należy zwrócić uwagę na warunki bezpieczeństwa w pomieszczeniach dla zwierząt (zestawienie 3).

### Zestawienie 3

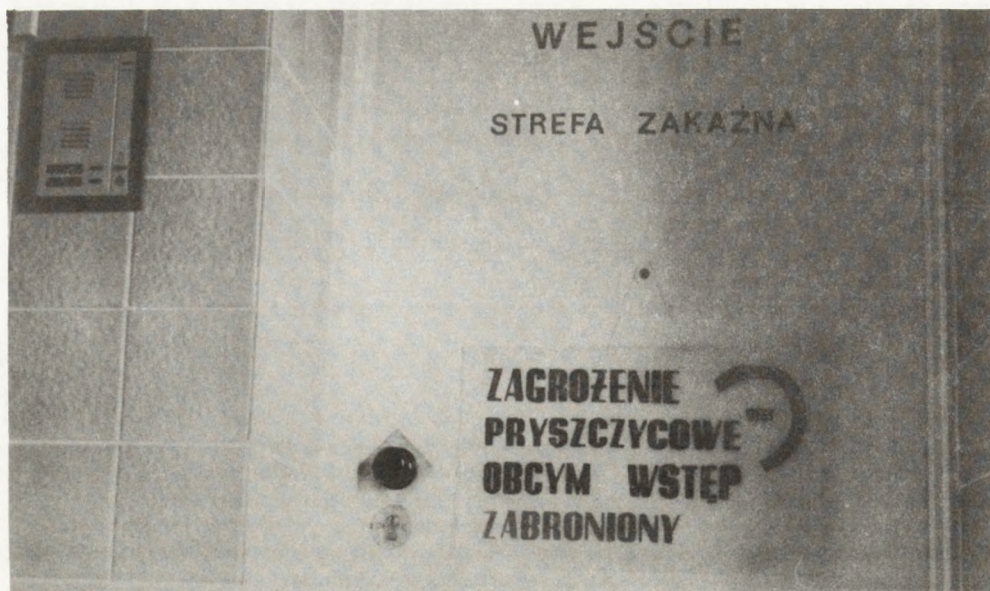
#### Przy projektowaniu pomieszczeń dla zwierząt doświadczalnych należy uwzględnić

1. Możliwość filtracji powietrza przez filtry absolutne, najkorzystniej oddzielnie dla każdego pomieszczenia i w miarę możliwości z regulowanym nadciśnieniem lub podciśnieniem.
2. Utrzymywanie odpowiedniej temperatury i wilgotności.
3. Wprowadzanie zwierząt przez służbę sanitarną.
4. Dostarczanie paszy i ściółki w sposób wykluczający jej zakażenie.
5. Bezpieczne usuwanie zwłok, ściółki i resztek paszy.
6. Możliwość prowadzenia skutecznej dezynfekcji bieżącej i ostatecznej.
7. Wykonywanie zabiegów bez ryzyka zakażeń i urazów mechanicznych.
8. Prowadzenie niektórych obserwacji klinicznych bez konieczności wejścia do pomieszczenia.
9. Możliwość dezynfekcji ścieków przed wprowadzeniem do kanalizacji ogólnej.
10. Korzystanie przez personel ze służby sanitarnej.

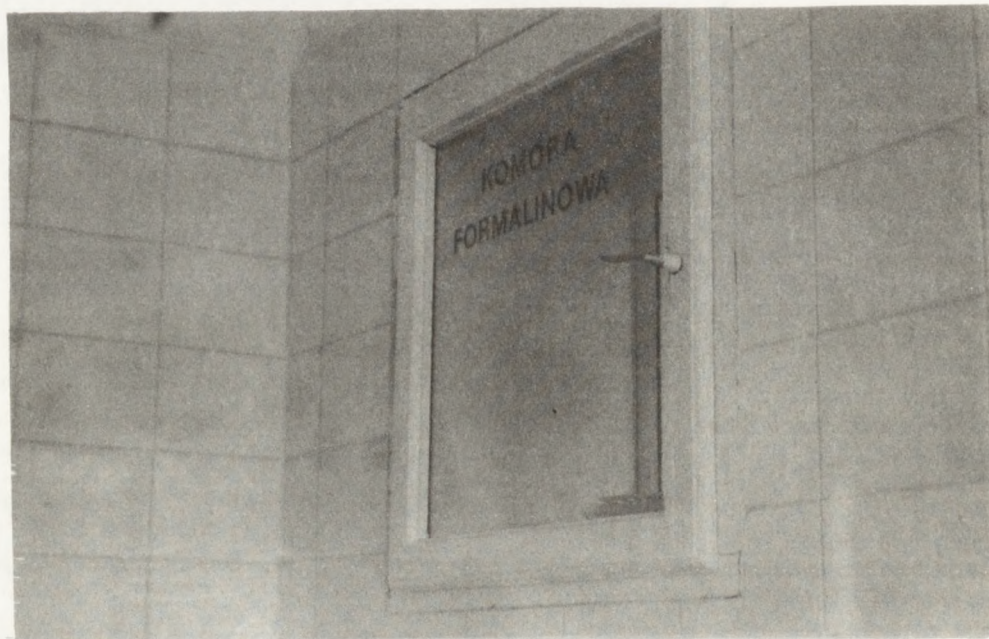
Pomijając ważne ze względów humanitarnych warunki bytowe (temperatura, wilgotność, przestrzeń) dla zwierząt doświadczalnych, należy podkreślić, że bezpieczeństwo epidemiologiczne i epizootologiczne winno być na tym samym poziomie, a nawet wyższym, jak w pomieszczeniach laboratoryjnych. Wiwarium winno być objęte takim samym systemem wentylacyjnym i zbioru ścieków. Muszą być w sposób przemyślany rozwiązane problemy wprowadzania zwierząt, dostarczanie paszy, usuwanie zwłok i odpadów oraz bezpiecznego pobierania próbek do badań. Ocena stanu zdrowotnego wykorzystywanych w badaniach zwierząt laboratoryjnych i gospodarskich wymagałaby oddzielnego artykułu. W tym miejscu zwrócono jedynie uwagę, że ryzyko wprowadzenia niekontrolowanych czynników zakaźnych, tak samo jak ich przenikanie do środowiska zewnętrznego, niekiedy nie jest należycie doceniane.

W wielu krajach, w ostatnich dwóch dziesięcioleciach, zbudowano laboratoria o podanej charakterystyce lub adaptowano do tego celu istniejące budynki. Dodatkowo, np. w zakładach pryszczycy – powietrze ze strefy zakaźnej po filtracji jest kierowane do pomieszczeń, w których przebywają zwierzęta wrażliwe na zakażenie. Przyczyniło się to do zmniejszenia zagrożenia epizootologicznego, ale całkowicie go nie wyeliminowało. Jednocześnie okazało się, że czułość kontroli biologicznej wciąż jeszcze przewyższa niezawodność aparatury kontrolnej. W wyniku rzadkiej, ale nieuniknionej awaryjności urządzeń technicznych lub błędów obsługi sporadycznie zdarzały się wypadki zakażenia środowiska zewnętrznego.

Kolejnym progiem było wprowadzenie potrójnego systemu bezpieczeństwa, przez wydzielenie w strefie zakaźnej specjalnych boksów z żaroodporną podłogą i ścianami oraz zastosowanie, zamiast filtracji, spalania powietrza w płomieniu palnika gazowego. Alternatywnym rozwiązaniem jest wybudowanie specjalnych budynków posiadających ściany, podłogi i sufity z materiałów żaroodpornych umożliwiającymi spalanie materiałów doświadczalnych i odzieży

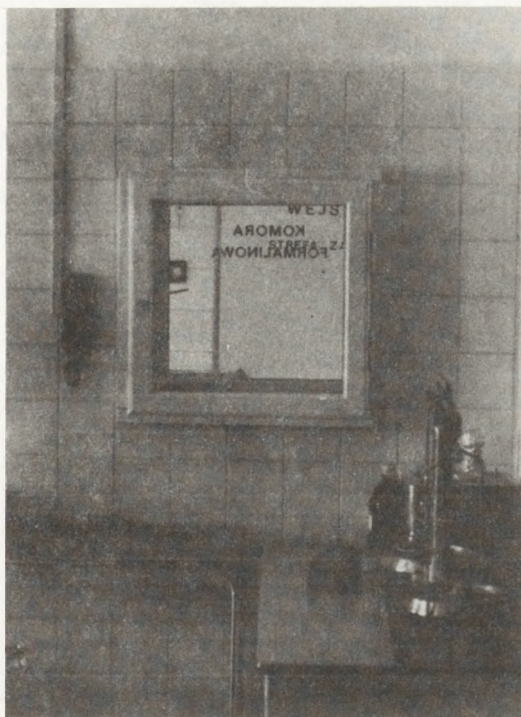


Fot. 1. Wejście wewnętrzne do strefy zakaznej; dla uproszczenia kontaktów telefony z głośnikami.



Fot. 2. Okienko podawcze do strefy zakaznej; widok z korytarza zewnętrznego.

Fot. 3. Okienko podawcze  
– komora formalinowa;  
widok od wewnątrz.



personelu. Praca personelu odbywa się z zastosowaniem manipulatorów pod kontrolą kamer telewizyjnych. Takie systemy zabezpieczeń znajdowały się m.in. w niektórych laboratoriach USA, byłym ZSSR i na Kubie. Natomiast, w większości krajów (m.in. Anglia, Bułgaria, Czechosłowacja, Dania, Francja, Niemcy, Rumunia i Włochy) funkcjonuje co najmniej jedno laboratorium przygotowane do prac z wysoko zakaźnymi wirusami ludzi i zwierząt (filtry absolutne, podciśnienie w strefie zakaźnej, dezynfekcja ścieków, śluzu sanitarne). Podobne reżimy są stosowane w wytwórniach preparatów biologicznych i antybiotyków. W Polsce jedynym laboratorium tej klasy bezpieczeństwa jest Zakład Pruszczycy Instytutu Weterynarii w Zduńskiej Woli (fot. 1,2,3).

Natomiast, należy z troską podkreślić, że wiele pracowni wirusologicznych pionu medycznego, roślinnego i weterynaryjnego – nawet w części – nie spełnia kryteriów bezpieczeństwa. Odnosi się to zarówno do laboratoriów naukowych, jak diagnostycznych i produkcyjnych. W związku z koniecznością rozwijania badań nad nowymi zakażeniami czynnikami chorobowymi ludzi, roślin i zwierząt funkcjonowanie tych laboratoriów stwarza określone ryzyko.

#### 4. Uwagi końcowe

W obecnej sytuacji ekonomicznej kraju, a zwłaszcza wobec malejącego budżetu państwa i nakładów na naukę, ochronę zdrowia i rolnictwo, uzyskanie funduszy na prace projektowe i budowę nowych laboratoriów nie wchodzi w rachubę. Bardziej realną wydaje się możliwość adaptacji i przystosowania do współczesnych wymagań istniejących obiektów. Zakres tych prac może być różny, w zależności od posiadanych środków. Prace adaptacyjne mogą objąć całe budynki laboratoryjne lub tylko ich części. Winny jednak zawsze uwzględnić rozdzielenie

strefy pracy jałowej i z materiałem zakaźnym, stworzenie warunków dewastacji zarazka przy stanowisku pracy lub w końcowej części ciągu technologicznego, wyposażenie pracowni w stanowiska typu biohazard, lub korzystniej, w indywidualną instalację wyciągową z filtrem absolutnym, zapewnić skuteczny sposób dekontaminacji ścieków oraz system śluz sanitarnych dla personelu i materiałów. Na specjalne podkreślenie zasługuje wysoka dyscyplina i zachowanie reżimów sanitarnych przez personel. W wielu przypadkach jest to czynnik niedoceniany, a jak wykazuje praktyka, równoważny dla poziomu wyposażenia technicznego.

Reasumując przedstawione informacje, zebrane na podstawie ponad 30 lat pracy w laboratoriach wirusologicznych oraz uzyskane przy pracach projektowych 6 obiektów, z których 3 zostały zrealizowane i funkcjonują, należy przedstawić następujące wnioski:

1. Podjęcie bezpieczeństwa funkcjonowania laboratoriów mikrobiologicznych obejmuje: ograniczenie ryzyka zakażeń wewnątrzlaboratoryjnych personelu, materiałów biologicznych i środowiska zewnętrznego.

2. Zagrożenie występujące przy pracach badawczych, rozpoznawczych i produkcyjnych jest doceniane w kategoriach ogólnych. Natomiast, na poziomie technologii szczegółowych i konkretnych zagrożeń, często nie jest należycie rozwiązane.

3. Stan bezpieczeństwa i standard wyposażenia w urządzenia zabezpieczające, dostęp do urządzeń sanitarnych oraz warunki lokalowo-organizacyjne funkcjonujących w Polsce laboratoriów są znacznie zróżnicowane.

4. W większości funkcjonujących laboratoriów wirusologicznych należy podnosić poziom bezpieczeństwa i środki przeznaczone na ten cel są w pełni uzasadnione względami społecznymi i ekonomicznymi.

5. Przy projektowaniu nowych laboratoriów lub remontach kapitalnych budynków, w których funkcjonują laboratoria wirusologiczne, należy uwzględnić obecne osiągnięcia inżynierii w zakresie materiałów filtracyjnych, materiałów ściennych i podłogowych, hermetyzacji procesów technologicznych oraz prawidłowego układu ciągów technologicznych.

## Literatura

1. Spencer D.J., (1971), A. Rev. Microbiol., 25, 465.
2. Plummer G., (1967), Progr. Med. Virol., 9, 302.
3. Larski Z., (1982), Wirusologia weterynaryjna, PWRiL, Warszawa.
4. Górski C., Piłaszek J., Górski J., (1979), Mat. XIX Zjazdu PTM, Szczecin, 35.
5. Górski J., (1972), Biul. Inf. Biowet., 1, 28, 16-26.
6. Górski J., (1978), Nowości Wet., 8,1, 5-15.
7. Georgiades J., (1965), Post. Hig. Med. Dośw., 19, 833.
8. Strochmajer K., (1990), DTW, 97, 210.

## Biosafety in Virological Laboratories

### Summary

The author presents the importance of preventing infections of the laboratory personnel and the contamination of the environment. The most common reasons for the within-laboratory infections and the analysis of potential routes of contamination of the environment are demonstrated. The rules for planning virological laboratories and organizing work in them are presented on the basis of the author's experience, conclusions after visits in laboratories in other countries and published data.

### Adres dla korespondencji:

Jerzy Górski, Instytut Weterynarii, ul. Partyzantów 57, 24-100 Puławy.