

·学术论坛·

新型冠状病毒动物实验存在暴露风险时的实验室生物安全要求

陆 兵¹,王 荣²,吴东来³,赵四清⁴,胡云章⁵,翟培军²,周永运²,王中一¹,靳晓军⁴,
李京京¹,程洪亮¹,祁建城⁶,吕 京^{2*}

(1.军事科学院军事医学研究院生物工程研究所,北京 100071;2.中国合格评定国家认可中心,北京 100062;3.中国农业科学院哈尔滨兽医研究所,哈尔滨 150001;4.军事科学院军事医学研究院生物安全处,北京 100850;5.中国医学科学院(北京协和医学院)医学生物学研究所,昆明 650118;6.军事科学院系统工程研究院卫勤保障技术研究所,国家生物防护装备工程技术研究中心,天津 300161)

[摘要] 解读了 GB 19489—2008《实验室 生物安全通用要求》标准中关于生物安全实验室的分级和分类,阐明了缓冲间和气锁的定义,重点分析了 4.4.3 类型实验室关于准入和退出,气压、压差和气密性及送排风高效空气过滤器等技术性条款。指出了 4.4.3 类型实验室开展不传染人的非洲猪瘟病毒实验活动和可传染人的新型冠状病毒实验活动时关于个体防护用品选择及其处置中存在的问题,以及风险评估应重点考虑的要素,建议组织国家病原微生物实验室生物安全专家委员会对新型冠状病毒进行论证,明确新型冠状病毒动物实验存在暴露风险时的实验室生物安全要求。

[关键词] 实验室生物安全;新型冠状病毒;动物实验;风险评估;新型冠状病毒肺炎

[中国图书资料分类号] R318;Q-338 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-8868(2020)05-0070-05

DOI: 10.19745/j.1003-8868.2020114

Laboratory biosafety requirements for exposure risk in animal experiments related to SARS-CoV-2

LU Bing¹, WANG Rong², WU Dong-lai³, ZHAO Si-qing⁴, HU Yun-zhang⁵, ZHAI Pei-jun², ZHOU Yong-yun², WANG Zhong-yi¹, JIN Xiao-jun⁴, LI Jing-jing¹, CHENG Hong-liang¹, QI Jian-cheng⁶, LYU Jing^{2*}

(1. Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Academy of Military Science of Chinese PLA, Beijing 100071, China; 2. China National Accreditation Service for Conformity Assessment, Beijing 100062, China; 3. Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China; 4. Division of Biological Safety Service, Academy of Military Medical Sciences, Academy of Military Science of Chinese PLA, Beijing 100850, China; 5. Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Kunming 650118, China; 6. Institute of Medical Support Technology, Academy of System Engineering, Academy of Military Science of Chinese PLA, National Bio-Protection Engineering Center, Tianjin 300161, China)

Abstract The grading and classification of the biosafety laboratory were described according to GB 19489—2008 Laboratories—General requirements for biosafety. The concepts of the buffer room and air lock were expounded, and the technical terms of type 4.4.3 laboratory were analyzed mainly on admission, withdrawal, air pressure, differential pressure, air tightness, HEPA filters in the air supply and exhaust systems and etc. Some issues during the experiments over African swine fever virus non-infectious to human beings and infectious SARS-CoV-2 were proposed, including selection and disposal of individual protective products as well as risk assessment considerations. It's suggested National Experts Committee on Biosafety in Laboratories Dealing with Highly Infected Pathogenic Microorganisms execute demonstration over SARS-CoV-2 so as to clarify the laboratory biosafety requirements for SARS-CoV-2 animal experiment in case of exposure risk. [Chinese Medical Equipment Journal, 2020, 41(5): 70-74]

Key words laboratory biosafety; SARS-CoV-2; animal experiment; risk assessment; COVID-19

0 引言

接到当地一家医院报告聚集性不明原因肺炎病例^[1];
2019年12月29日,湖北省和武汉市卫生部门 2020年1月20日,国务院同意将新型冠状病毒肺炎

(以下简称“新冠肺炎”)纳入传染病法和卫生检疫法管理,并启动全国范围应急防控工作^[1]。2020年1月31日,全国累计报告新冠肺炎确诊病例超过10 000例;3月1日,全国累计报告确诊病例超过80 000例,累计死亡病例2 915例^[2],全球累计确诊病例超过89 000例,累计死亡病例超过3 000例,呈现新一轮的增长趋势^[3]。

国务院联防联控机制统筹全国新冠肺炎的疫情防控,于2020年2月15日新闻发布会^[4]介绍了新冠肺炎疫情防控期间国家在药物研发和科研攻关方面的最新进展,通过启动科技攻关应急专项,部署了共20个应急科研攻关项目。在新冠肺炎防治研究中,药物评价、疫苗研制等研究工作在涉及非人灵长类等动物感染实验时可能需要使用GB 19489—2008《实验室 生物安全通用要求》^[5]标准定义的4.4.3类型实验室。为深入理解这一类型实验室的特点,本文参考《GB 19489—2008<实验室 生物安全通用要求>理解与实施》^[6]对GB 19489—2008标准中适用于4.4.3类型实验室的相关条款进行了系统解读,以供同类实验室参考。

1 相关定义

1.1 实验室的分级和分类

GB 19489—2008标准中条款4.1根据在操作病原微生物时所采取防护措施的不同,将实验室生物安全防护水平由低至高分分为1~4级,即最高为4级防护水平。条款4.4^[5]根据所从事实验活动以及采用的个体防护装备和物理隔离措施的不同,将实验室分成4种不同类型,其中操作非经空气传播的病原微生物的实验室属于4.4.1类型实验室;利用生物安全柜等安全隔离装置来操作常规量的、经空气传播的病原微生物的实验室属于4.4.2类型实验室;操作常规量的、经空气传播的病原微生物时,存在微生物暴露的实验室属于4.4.3类型实验室;操作常规量的、经空气传播的病原微生物时,工作人员穿着具有供气系统的正压防护服的实验室属于4.4.4类型实验室。

对于4.4.3类型的实验室,需要把握3个关键点:不能有效利用安全隔离装置、操作常规量生物因

子和经空气传播。不能有效利用安全隔离装置^[5]是指无法采用生物安全柜等安全隔离装置形成物理密闭屏障或空气屏障对生物因子进行有效隔离,存在微生物暴露风险,导致实验室环境污染。结合GB 19489—2008标准中风险评估部分条款3.1.7考虑时,操作常规量生物因子应包括2层含义:一是其规模应限定在实验研究目的的传代或制备,而非生产目的的制备;二是其活动类型应不涉及气溶胶发生、暴露等特殊活动。经空气传播^[5]是指生物因子能够通过空气途径导致人员感染。

4.4.3类型的实验室典型示例^[6]包括采用开放式饲养动物(即动物完全暴露在实验室空气中)的生物安全实验室[如图1(a)所示],采用半开放式饲养动物(即动物饲养期间处于安全隔离装置内,但在进行动物操作、清洁和转移时需打开隔离装置造成暴露)的生物安全实验室[如图1(b)所示]或者其他(如从事气溶胶攻毒或开放式动物解剖等实验活动)的生物安全实验室等。由于4.4.3类型的实验室内空气受到所操作病原微生物的污染,对这一类型实验室的设施和工作人员的防护要求很高^[6]。而这一类实验室的风险大小直接取决于所操作病原微生物的特性以及实验室内空气的污染程度,其对应的风险控制措施也应不同。



(a)开放式饲养实验动物

(b)半开放式饲养实验动物

图1 4.4.3类型的实验室

与GB 19489—2008标准相呼应,GB 50346—2011《生物安全实验室建筑技术规范》^[7]根据所操作病原微生物的传播途径对生物安全实验室进行了分类。GB 50346—2011标准中的a类实验室相当于GB 19489—2008标准中的4.4.1类型实验室,GB 50346—2011标准中的b1类实验室相当于GB 19489—2008标准中的4.4.2类型实验室,GB 50346—2011标准中的b2类实验室相当于GB 19489—2008标准中的4.4.3类型实验室。

1.2 缓冲间和气锁

GB 19489—2008标准中条款2.6关于缓冲间的定义包含四重含义:(1)密闭室;(2)置于污染概率不

共同第一作者:陆兵,王荣

作者简介:陆兵(1966—),男,博士,研究员,主要从事实验室生物安全方面的研究工作,E-mail:13693506666@163.com;王荣(1972—),女,硕士,研究员,主要从事实验室生物安全防护技术方面的研究工作,E-mail:wangrong@cnas.org.cn。

通信作者:吕京,E-mail:lvj@cnas.org.cn

同的2个实验室区域之间;(3)门互锁,保证其不能同时开启;(4)需要时(如三级和四级实验室的防护区),设置机械通风系统。条款2.3^[6]关于气锁的定义也包含四重含义:(1)气密室;(2)门互锁,保证其不能同时开启;(3)机械通风且压力可监控;(4)可整体消毒灭菌,适用时可化学喷淋。

由GB 19489—2008标准对缓冲间和气锁的定义可见,相对于缓冲间而言,气锁应具备另外2个基本条件:一是通过气密使污染不会泄漏;二是通过整体消毒灭菌使工作人员退出或物品传出时能够彻底去污染。

2 技术性条款

2.1 准入和退出

4.4.3类型的实验室关于工作人员准入和退出、物品传出实验室的要求见GB 19489—2008标准的条款6.5.3.6和条款6.5.3.7。

在工作人员准入方面,4.4.3类型的三级实验室动物饲养间、四级实验室及其动物饲养间,均在4.4.1和4.4.2类型的三级实验室出入控制要求的基础上强调了严格的门禁措施。通过严格管理及物理性门禁措施(如个人密码或指纹、虹膜等生物学识别技术)来确保只有授权人员才能进入相应区域。

4.4.3类型的实验室在工作人员退出、物品传出时应通过气锁,对工作人员或物品表面彻底清除污染。4.4.3类型的动物饲养间如果开放式饲养感染动物,即感染动物及其污染产物完全暴露于空气中,将造成动物饲养间内工作人员或物品的表面污染。如果使用半开放式负压隔离器饲养感染动物,在喂饲、接种、采血、更换垫料时需要打开隔离器门,此时隔离器内负压基本丧失,动物、垫料等有可能不处于有效防护状态,因此源自感染动物及其操作的气溶胶会污染动物饲养间,此时其污染程度直接和实验活动的类型、工作人员的行为规范等有关。由于动物饲养间处于污染状态,其缓冲间应为气锁,一方面能保证动物饲养间整体的气密性,另一方面能够完全清除工作人员防护服表面(实际上应该是所有暴露表面)或传出的物品表面的污染。

目前,国内运行的4.4.3类型实验室在从事非洲猪瘟病毒等不感染人的病原微生物的实验活动时,工作人员如果没有穿着正压防护服,在其退出实验室时通常通过对个

体防护装备表面喷雾消毒后淋浴来清除污染。但在工作人员离开气锁时能否彻底清除污染一般都没有进行验证或难以验证,强调的往往是淋浴后不将病毒带离实验室,客观上仍然存在一定的风险。

在从事新型冠状病毒(SARS-CoV-2)动物实验时,一般要求工作人员佩戴正压头罩,在气锁内进行表面喷雾消毒,但人工喷雾消毒往往很难覆盖实验过程中暴露的全部表面。为了保证消毒效果,工作人员还需要在气锁内停留较长的时间,这在实际操作中存在一定的困难。综上,若不带化学喷淋消毒的气锁(即适用于正压防护服的类型)要彻底清除从4.4.3类型实验室退出的工作人员和传出物品的表面污染,必须在实施过程中加强消毒程序的完善及验证工作。

2.2 气压、压差和气密性

4.4.3类型实验室中,其核心工作间(如动物饲养间)的气压(负压)与室外大气压相差应不小于80 Pa,与相邻区域(如气锁)的气压相差应不小于25 Pa^[6]。GB 19489—2008标准中条款6.5.3.18规定了4.4.3类型实验室的核心工作间及其缓冲间在采用恒压法测定(即房间温度维持在设计上限,关闭测试房间的所有气体通路,使测试房间内空气压力恒定为250 Pa)气密性时,其每小时泄漏的空气量应小于等于所测试房间净容积的10%。

GB 50346—2011标准中关于不同类型三级、四级实验室的气压、压差和气密性要求与GB 19489—2008标准一致,部分技术指标比较详见表1,可以看出不同类型三级、四级实验室关于气压、压差和气密性要求的差异。

表1 生物安全主实验室二级屏障的部分技术指标^[7]

实验室级别	相对于大气负压的下限/Pa	相对于室外方向相邻房间负压的下限/Pa	围护结构严密性(包括核心工作间及其缓冲间)
BSL-3中的a类(即GB 19489—2008标准中4.4.1类型)	-30	-10	所有缝隙应无可见泄漏
BSL-3中的b1类(即GB 19489—2008标准中4.4.2类型)	-40	-15	所有缝隙应无可见泄漏
ABSL-3中的a和b1类	-60	-15	所有缝隙应无可见泄漏
ABSL-3中的b2类(即GB 19489—2008标准中4.4.3类型)	-80	-25	测试房间的相对负压恒定在-250 Pa时,其每小时泄漏的空气量应小于等于所测试房间净容积的10%
BSL-4	-60	-25	测试房间的相对负压达到-500 Pa时,经20 min自然衰减的压力不应超过-250 Pa
ABSL-4	-100	-25	测试房间的相对负压达到-500 Pa时,经20 min自然衰减的压力不应超过-250 Pa

注:BSL-3是生物安全三级实验室,BSL-4是生物安全四级实验室,ABSL-3是动物生物安全三级实验室,ABSL-4是动物生物安全四级实验室

适用于 4.4.3 类型动物饲养间的空气在饲养感染动物过程中处于污染状态,为了保证动物生物安全三级实验室的定向气流,加拿大的相关指南和标准^[9]以及美国农业部的设施设计标准^[9]均规定动物生物安全三级实验室的压差应不小于 25 Pa。GB 19489—2008 标准编写者的经验和研究结果也证实,气体进出实验室的流量控制对于确保实验室的生物安全防护是一种较好的方法。而对于气密性房间,如果选择压差作为其控制参数,则需要控制压差在 25 Pa 以上才较为合适。因此,4.4.3 类型的三级实验室和气密性四级实验室关于气压和压差的要求相当。

通过压力衰减测试实验室防护区围护结构的气密性,其目的主要是确定实验室的墙壁、地板、天棚和其他防护屏障以及所有穿过屏障的管线是否可以避免空气从防护空间泄漏出去^[7]。有文献曾报道采用管线穿墙密封装置^[10]和生物安全型密封地漏^[11]可以解决具有气密性要求的实验室在需要管线穿墙时的密封问题。三级、四级实验室防护区围护结构气密性的作用主要有 2 点^[7]:一是防止实验室失压时室内的污染空气外泄;二是防止对房间进行气体熏蒸消毒时消毒气体外泄。生物安全三级实验室通常不是独立建筑,而是和其他实验室,有时还包括办公室等连通的共用建筑,因此,保证其围护结构的气密性非常重要。

美国最先对生物安全防护设施采取压力衰减法测试其气密性^[9],加拿大^[9]、澳大利亚^[12]等也均采用同样的方法测试动物生物安全三级实验室和生物安全四级实验室的气密性。而我国根据实际情况,对 4.4.3 类型实验室采用恒压法测试其气密性^[9]。由于恒温条件下房间的相对负压达到 -500 Pa 时,漏入房间净容积约 0.25% 的空气,房间的相对负压值就会变化 -250 Pa 左右,可见表 1 中关于 4.4.3 类型的三级实验室的气密性要求要明显低于四级实验室的气密性要求。

2.3 送排风高效空气(high efficiency particle air, HEPA)过滤器

关于送排风 HEPA 过滤器的要求,4.4.3 类型的三级实验室显著区别于 4.4.1 和 4.4.2 类型的三级实验室。GB 19489—2008 标准中条款 6.5.3.15 规定其送风 HEPA 过滤器应可以原位进行消毒灭菌和检漏;条款 6.5.3.14 规定其排出的气体应根据风险评估的结果确定是否需要采用两级 HEPA 过滤器过滤。

4.4.3 类型实验室关于送风 HEPA 过滤器的消毒、检漏要求和四级实验室相同,与气密性要求相呼

应,其目的都是为了防止实验室失压时污染空气的泄漏。而排风是否需要采用两级 HEPA 过滤器过滤,其风险评估的依据主要取决于实验室所操作病原微生物的危害性、微生物在环境中的稳定性、实验室内微生物的暴露浓度以及周围环境等因素。

3 不同实验活动及其防护

关于病原体类型,GB 19489—2008 标准中条款 6.5.3.19 规定了 4.4.3 类型实验室在从事不同类型病原微生物实验活动的要求,当所操作的病原微生物可传染人时,应进一步进行风险评估,以确定生物安全防护要求。而在从事新发烈性传染病病原的相关工作时,根据国家有关要求^[13]还应经过国家病原微生物实验室生物安全专家委员会的论证。国家卫生健康委员会发布的《新型冠状病毒感染的肺炎防控方案(第二版)》^[14]中规定其动物感染实验应当在动物生物安全三级实验室操作,并应具有开展相应活动的资质。

关于实验活动类型,GB 19489—2008 标准中条款 3.1.7 规定了在常规实验活动的基础上,当操作超常规量(如生产目的的制备)或从事特殊活动(如生产目的的活动或气溶胶发生等专业操作)时,实验室应进行专门的风险评估,以确定合适的生物安全防护要求,必要时还应得到国家主管部门的批准。关于风险控制,GB 19489—2008 标准中条款 3.1.10 规定了风险控制措施次序:首先考虑消除危险源(如果可行),其次考虑降低风险(包括降低危害发生的可能性或后果的严重性),再次考虑采用适当的个体防护装备。

上述条款表明,GB 19489—2008 标准关于 4.4.3 类型实验室的生物安全要求仅仅是这一类型实验室的最低要求,由于其不能有效利用安全隔离装置操作,故在实验室内存在病原微生物的暴露,所以对实验室的围护结构有气密性要求,工作人员退出或物品移出实验室时要确保清除污染。在 4.4.3 类型实验室从事可传染人的病原微生物活动以及在操作超常规量或从事特殊活动(如生产目的的制备以及气溶胶发生等操作)时,均应进一步进行风险评估并采取相应的风险控制措施,包括在不能消除危险源(致病性生物因子暴露)的情况下,先考虑降低风险(如降低暴露程度,包括避免开放饲养、开放操作,有条件时尽量隔离或远离等),再考虑采用个体防护装备(如穿戴正压头罩,必要时采用正压防护服+化学喷淋)。

为了评估风险控制措施的有效性,对其效果进行评价是必要的。如不同控制措施条件下,实验室内致病性生物因子暴露程度的评价、送排风系统对实

验室内暴露的致病性生物因子清除能力的评价等;实验室内对污染空气和污染表面采用不同方法处理(如熏蒸、喷淋、喷雾、擦拭等)后,其消毒灭菌效果的评价等。只有基于对操作规程的验证评价以及实验过程中的污染监测,才能获得客观、科学的数据,从而为实验室风险管理提供依据和支撑。

4 结语

适用于 4.4.3 类型的动物生物安全三级实验室,由于其不能有效利用安全隔离装置操作病原微生物,实验室内的空气和工作人员及物体表面均可能存在污染,因此在围护结构的气密性、气压和压差以及工作人员、物品离开实验室时的表面消毒要求均高于 4.4.1 和 4.4.2 类型的生物安全三级/动物生物安全三级实验室要求,接近生物安全四级/动物生物安全四级实验室的要求。此外,适用于 4.4.3 类型的实验室,当所操作的病原微生物可传染人时,应进一步进行风险评估,以确定生物安全防护要求。因此在利用 4.4.3 类型的动物生物安全三级实验室从事 SARS-CoV-2 相关动物实验时,其风险评估应重点考虑所操作病原微生物的传播特点和致病性、实验活动过程中产生和暴露的气溶胶浓度、工作人员的个人防护要求及去污染效果评价、排出的气体是否需要经过两级 HEPA 过滤器过滤后排出等。可能时,应通过监测病原微生物的暴露程度及其清除效果,从而为风险管理提供依据和支撑。

我国对高致病性病原微生物的实验活动已经纳入法制化管理轨道,《病原微生物实验室生物安全管理条例》^[15]第二十九条规定,在实验室从事高致病性病原微生物相关实验活动中使用新技术或新方法时,应保证实验室的生物安全要求和操作者的人身安全要求,需经过国家病原微生物实验室生物安全专家委员会论证可行。对于 SARS-CoV-2 这种新发烈性传染性病原,国家对其进行各种科学研究时,建议有关部门应尽早组织国家病原微生物实验室生物安全专家委员会进行论证,明确相关的管理程序和要求,从而避免出现 SARS 研究时发生的实验室源性感染事件^[16]。

【参考文献】

[1] 中国疾病预防控制中心. 2019 新型冠状病毒疫情进展和风险评估[R/OL]. (2020-01-27) [2020-03-03]. http://www.chinacdc.cn/jkzt/crb/zl/szkb_11803/jzsl_11811/202001/P020200127544648420736.pdf.

[2] 国家卫生健康委卫生应急办公室. 截至 3 月 1 日 24 时新型冠状病毒肺炎疫情最新情况[EB/OL]. (2020-03-02)

[2020-03-03]. <http://www.nhc.gov.cn/xcs/yqtb/202003/5819f3e13ff6413ba05fdb45b55b666ba.shtml>.

[3] World Health Organization. Novel Coronavirus (COVID-19) situation[EB/OL]. (2020-03-01) [2020-03-03]. <https://experience.arcgis.com/experience/685d0ace521648f8a5beeee1b9125cd>.

[4] 国家卫生健康委员会. 国务院联防联控机制 2020 年 2 月 15 日新闻发布会介绍药物研发和科研攻关最新进展情况[EB/OL]. (2020-02-15) [2020-03-03]. <http://www.nhc.gov.cn/xwzb/webcontroller.do?titleSeq=11233&gcstype=1>.

[5] 实验室 生物安全通用要求:GB 19489—2008[S]. 北京:中国标准出版社,2009:1-11.

[6] 全国认证认可标准化技术委员会. GB 19489—2008《实验室 生物安全通用要求》理解与实施[M]. 北京:中国标准出版社,2010.

[7] 生物安全实验室建筑技术规范:GB 50346—2011[S]. 北京:中国建筑工业出版社,2011:5-6.

[8] Public Health Agency of Canada. Canadian biosafety standard, second edition[EB/OL]. (2015-03-11) [2020-03-03]. <https://www.canada.ca/en/public-health/services/canadian-biosafety-standards-guidelines/second-edition.html>.

[9] United States Department of Agriculture Research Service. ARS facility design standards[S]. Washington D.C.: Agriculture Research Service, 2012.

[10] 周康力,张雷,孙蓓,等. 管线穿墙密封装置的研制[J]. 医疗卫生装备,2018,39(11):26-28,48.

[11] 周康力,张雷,郎红梅,等. 一种生物安全型密封地漏的研制与应用[J]. 医疗卫生装备,2018,39(9):16-19.

[12] The Joint Standards Australia/Standards New Zealand Committee CH-026. Safety in laboratories. Part 3: microbiological safety and containment: AS/NZS 2243.3:2010[S]. Sydney: SAI Global Limited, 2010.

[13] 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)[EB/OL]. (2006-01-27) [2020-03-03]. <http://www.nhc.gov.cn/wjw/gfxbwj/201304/64601962954745c1929e814462d0746c.shtml>.

[14] 国家卫生健康委员会办公厅. 国家卫生健康委办公厅关于印发新型冠状病毒肺炎防控方案(第二版)的通知[EB/OL]. (2020-01-22) [2020-03-03]. <http://www.nhc.gov.cn/xcs/zhengcwj/202001/c67cfe29ecf1470e8c7fc47d3b751e88.shtml>.

[15] 中华人民共和国国务院. 病原微生物实验室生物安全管理条例(中华人民共和国国务院令 第 424 号)[EB/OL]. (2008-03-28) [2020-03-03]. http://www.gov.cn/zhengce/content/2008-03/28/content_6264.htm.

[16] 张朝武,姚玉红,王国庆. 从 SARS-CoV 实验室感染看生物安全的重要性[J]. 现代预防医学,2004,31(5):656-657,660.

(收稿:2020-03-05 修回:2020-04-13)