



无菌隔离技术在悉生生物学中的应用与发展

吕 阳

(中国疾病预防控制中心设备处,北京 102206)

【摘要】 本文介绍了悉生生物学领域的无菌隔离技术,并将传统的洁净室技术与限制进出屏障系统技术和无菌隔离器技术进行了比较,同时对无菌隔离器的发展方向进行了展望,阐述了无菌隔离器在悉生生物学领域中广阔的应用前景。

【关键词】 悉生生物学;无菌隔离技术;限制进出屏障系统;无菌隔离器

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 05-0076-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.005.016

Isolating technologies development and used in gnotobiology

LU Yang

(Division of Equipment, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206)

【Abstract】 To introduce germfree isolating technologies used in gnotobiology, and to compare the differences with in Cleaning Rooms, Restrictive Access Barrier Systems (RABS) and Isolators. To expect the development of isolators, and to describe the uses of isolators in gnotobiology.

【Key words】 Gnotobiology; Germfree isolating technology; Restrictive access barrier system; Isolator

1 悉生生物学与无菌隔离的概念

人和动物的体内通常会栖息着一些微生物。这些微生物群和寄主的关系以及它们彼此之间的关系十分复杂。无菌动物的出现,使人们研究动物体与单一细菌的关系成为可能。科学家也可以研究某两个细菌之间的协同或者拮抗作用。如果某一生物体中没有任何可检出的其他生物,或者除少数栖息其中的已知生物外,不能再检出其他生物,则这一生物体和栖息其中的已知生物之间的关系,无论是互利的或有害的,均形成一种悉生态。此时这一悉生态中的生物即为悉生生物。研究悉生生物以及由悉生生物构成的悉生态的生物学分支学科称为悉生生物学。

利用悉生动物开展微生物学研究,可排除动物

体内不明微生物对实验结果的干扰,实验数据的准确性得到明显的提高。实践证明,要获取无菌动物或悉生动物,就必须解决无菌隔离技术。建立在无菌隔离技术基础上产生的无菌动物、单菌动物、双菌动物、多菌动物和特殊病原体动物总称为悉生动物,广泛应用于临床医学、预防医学、药学、食品工业微生物研究等不同领域,并取得了普通动物实验所无法实现的丰硕成果。

2 无菌隔离技术的发展

2.1 传统洁净室技术

传统的洁净室将操作人员、操作环境和操作对象混在一个空间,很容易导致细菌污染,甚至导致活性物质的特性丧失。同时,传统的洁净室无法保证人员在操作高毒性物质过程中的安全,也无法保

证环境不被污染。另外,传统的洁净室还存在长期运行维护成本高、风险大、验证困难等问题。

2.2 限制进出屏障系统 (RABS)

是继传统的洁净室技术后较早兴起的一种无菌隔离技术。美国 FDA 对 RABS 的定义为“ A physical partition that affords aseptic processing area (ISO5) protection by partially separating it from the surrounding area”,即通过一个物理的隔断将无菌操作区域(A 级)与周围环境(B 级)隔离开,以给无菌操作区域提供保护^[1]。RABS 将操作过程中要求的 A 级环境与周围 B 级环境采用物理屏障隔开,减少了不同洁净级别之间、操作人员与 A 级环境之间的交叉污染(图 1)。

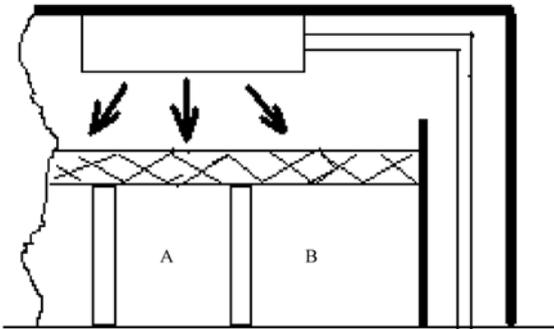


图 1 RABS 示意图
Fig.1 RABS model

根据配备高效过滤器的方法不同,RABS 可以分为被动式 RABS 和主动式 RABS。其主要区别在于,被动式 RABS 的 A 级环境与周围 B 级环境的洁净室共用高效过滤器(图 2);而主动式 RABS,其 A 级环境配备有独立的高效过滤器(图 3)。

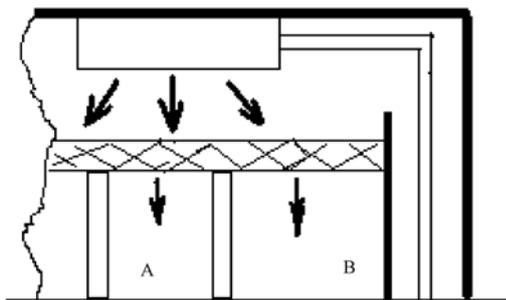


图 2 被动式 RABS 模式图
Fig.2 Passive RABS model

根据气流的运行方式不同,RABS 又可以分为开放式 RABS 和封闭式 RABS。其主要区别在于,开放式 RABS,是将 A 级环境的气流直接排入周围 B 级环境的洁净室中(图 4);而封闭式 RABS,其配备

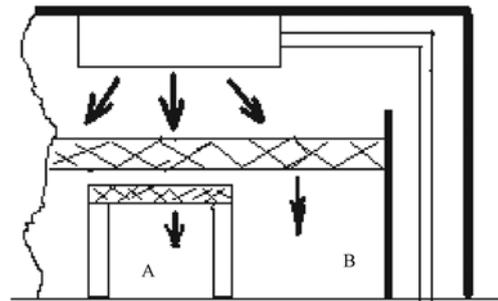


图 3 主动式 RABS 模式图
Fig.3 Active RABS model

有自循环气流通路,气流在封闭的 A 级环境中内循环,不会排放到周围 B 级环境的洁净室内(图 5)。

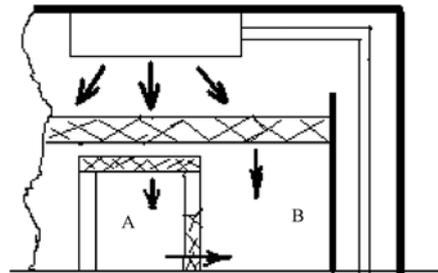


图 4 开放式 RABS
Fig.4 Open RABS model

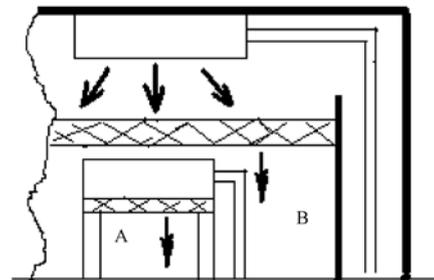


图 5 封闭式 RABS
Fig.5 Sealed RABS model

2.3 无菌隔离器技术

是在限制进出屏障系统 RABS 出现之后又发展起来的一种更为先进的无菌隔离技术。FDA 对无菌隔离器的定义为“ A decontaminated unit, supplied with class 100 (ISO5) or higher air quality, that provides uncompromised, continuous isolation of its interior from the external environment (e. g. surrounding cleaning room air and personnel)”,即一种使用百级以上的清洁空气气流,绝对、连续地将内部环境(操作环境)和外部环境(如周围的洁净室空气和人员)隔开以隔绝污染的装置。就是说无菌隔离器技术是采用完全密闭的装置将操作空间(A

级环境)与周围环境完全隔离,并配备相应的空气处理单元(包含高效过滤器)以及过氧化氢灭菌装置,可以自动完成装置内部的环境灭菌、空气净化处理等工作,具有极高的安全性,如图 6 所示。

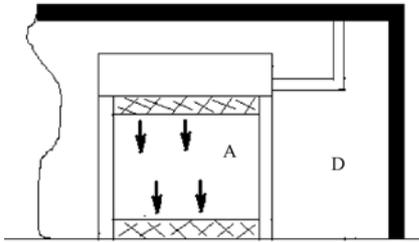


图 6 无菌隔离器系统示意图

Fig. 6 Isolator system model

目前,在悉生生物学研究中发现,实验和生产环境对洁净度要求越来越高,主要是以下两个方面的要求:

(1) 无菌动物、悉生动物及悉生态本身需要无菌环境;

(2) 实验和生产对象要求避免环境微生物污染,必须保证实验和生产操作过程在无菌环境下完成。

另外,随着生物安全管理的日益严苛,病原菌研究的隔离措施也越来越严。无菌隔离技术不仅可以防止环境微生物污染研究对象,也可以防止正在研究的病原菌污染环境。因此,在实验环境国标(GB14925)中,隔离环境是分为正压和负压的^[2]。

无菌隔离器已发展压力为正负压的各种类型的无菌隔离器系统,包括隔离舱体、空气处理系统、过氧化氢喷雾消毒自动灭菌系统、双门快速无菌环境传递系统等。隔离器内的洁净度能够达到 5 级,保障隔离器内的无菌环境。国家食品药品监督管理局规定,在药品生产和检验中使用的隔离系统,应配备 7 级或更高级别洁净空气过滤装置,并使内部环境与外环境完全隔离^[3]。隔离器的舱体屏障对操作人员提供了安全有效的防护,使操作人员彻底地从传统的洁净室中解放出来;同时无需庞大的净化系统支持,舱内外完全的隔离,使无菌隔离器在一般清洁环境中可随意移动,相当于一个可移动的、高洁净级别的微型实验室。

3 无菌隔离器的优势与应用

无菌隔离器技术与传统洁净室、限制进出屏障系统(RABS)相比,具有明显的优势:

(1) 避免安全风险

传统的洁净室,由于操作环境与周围环境没有物理隔离,容易产生交叉污染。另外,操作人员直接在洁净室中工作,人员本身会导致固体颗粒的产生和对洁净室层流的破坏。其中,人员、环境极易与高活性、高毒性的样品接触,不利于保护人员的安全。事实证明,洁净室内的微生物和固体颗粒浓度也只能控制在 10^{-3} 的水平^[4]。

开放式 RABS 系统,A 级的操作环境与 B 级的洁净室被物理屏障隔开,操作人员采用手套操作,很大程度减少了洁净室环境交叉污染的可能性,在保证产品质量和保护人员的安全方面都有非常好的效果。但是,由于开放式 RABS 与洁净室共用同一高效过滤器的空调系统,虽然控制微生物和粒子污染的能力增强,但还是存在交叉污染的可能性。

封闭式 RABS 系统,A 级的操作环境内部配备有独立的空气净化单元,且 RABS 内部的空气为循环使用,将人员、环境与产品几乎完全隔离开来,所以避免微生物和粒子污染风险的安全性大大提高。实践证明,可以使用封闭式 RABS 系统进行一些易变质、高活性和高毒性的样品测试或生物制品的生产。然而,检测数据表明,封闭式 RABS 的 A 级操作环境与外部环境之间仍然不能够达到标准要求的绝对隔离,还需要外部环境洁净空间作为背景。

与传统洁净室和 RABS 不同的是,无菌隔离器系统能够将 A 级的操作环境与外部环境和人员完全隔离。操作环境内部不仅配备单独的高效过滤器,而且还配备有独立空气处理单元,相当于一个独立的洁净空间,同时还配有过氧化氢灭菌系统,可以独立对其箱体内部表面和设备表面进行灭菌。因此,无菌隔离器可以完全摆脱周围环境也需要净化处理的背景限制,简化了无菌操作的复杂性。

(2) 降低成本

1) 建筑成本:由于 RABS 与传统洁净室建筑上相同,需要 B 级环境为背景,因此建筑费用没有很大区别。而对于无菌隔离器来说,由于 B 级的环境背景不再是必需条件,传统洁净室中的 B 级背景部分可以取消,从而降低了建筑成本。

2) 设备成本:由于 RABS 是在传统洁净室中增加了 RABS,必然导致设备成本高于洁净室,而无菌隔离器系统由于加装了过氧化氢处理系统和独立的空气处理单元,因此设备成本较其他方式要高。

3) 运行成本:RABS 与传统洁净室相比没有改变任何的洁净级别,因此其能源消耗(主要为空调

系统,包括空气处理、温度和湿度的控制)、洁净服的使用成本等均相同,同时由于 RABS 的引入又带来更多的监测项目如 RABS 手套的检查、空调系统的检测等,因此 RABS 的运行成本会略高于传统洁净室。而无菌隔离器因为不存在 B 级环境,可以大大减少能耗、检测设备以及人工。因此,无菌隔离器是三者中运行成本最低的。据测算,传统洁净室的运行费用是隔离器的 3 倍^[5]。

通过以上分析可以看出,在避免污染风险方面,无菌隔离器安全性最高;在成本投入方面,无菌隔离器虽然设备本身成本较高,但因为降低了建筑费用和基础设施费用,所以总固定资产投资成本最低;在运行成本方面,无菌隔离器因没有了 B 级环境背景从而简化了无菌操作的复杂性,故运行成本最低。

因为无菌隔离器本身的特点和优势,在世界范围内已经得到了越来越广泛的应用。发达国家在制药、生物制品等行业标准方面有关装备的描述中,都有对无菌隔离器的定义和要求。无菌隔离器与超净工作台连接使用,可以最大程度保证实验操作的安全性^[6]。

2011 年 3 月 1 日我国制药行业实行了新版 GMP。在新版 GMP 中对无菌药品的生产要求更加严格,首次提出了无菌药品生产隔离概念,提出无菌药品生产工艺,明确了生产工艺对应环境级别的要求,自动化进出料和隔离化的环境控制已成为药品生产不可逆转趋势,无菌隔离器必然起到关键的作用。同时,随着我国生物领域研究水平的发展,无菌隔离器在国内悉生生物学科领域中逐渐得到推广,许多生物科学工作者根据研究需要也都开始

引进和使用无菌隔离器系统。

4 结语

综上所述,相对于传统洁净室和 RABS 而言,无菌隔离器具备安全性高、投入运行成本低的特点。随着我国政府对实验动物使用、药品生产的要求日益严格,无菌隔离器已在我国制药行业得以普及。我国随着新 GMP 的施行,逐渐与国际 GMP 接轨,无菌隔离器技术将是无菌隔离技术的最重要发展趋势。随着现代生物科学的发展,无菌隔离器技术与自动化技术相结合是当前中国悉生生物学研究手段的一个发展方向,其宗旨是通过无菌隔离以及对操作者限制进出的干预,从而降低悉生生物受到外界环境污染;另一方面,在进行有毒性或高致敏性实验时,可以有效地保证操作人员的生物安全。

参考文献:

- [1] Quality Risk Management for Aseptic Processes, PDA Technical Report 2008, 44(62): S-1.
- [2] 全国实验动物标准化技术委员会. 实验动物环境及设施[S]. 北京:中国标准出版社,2011:3-4.
- [3] 卫生部. 药品生产质量管理规范(2010 年修订)[S]. 北京:卫生部 2011 第 79 号令.
- [4] 马伟,孙石磊. 无菌隔离器的优势及其发展趋势[J]. 中国制药装备,2013,(7):33-36.
- [5] Beyeler N. Porter. M "Barrier Isolator Cost Analysis Revisited" ISPE, 2009 Washington Conference June 1 2009 Arlington, VA.
- [6] 李志满,田之宁. 无菌隔离器与超净工作台、洁净层流柜的直连改造尝试[J]. 实验动物科学,2010,27(4):68-69.

[修回日期]2014-04-09