

生物安全型禽负压隔离器的研制

张宗兴^{1,2}, 祁建城^{1,2*}, 吴金辉^{1,2}, 张恩雷^{1,2}, 张金明^{1,2}, 衣颖^{1,2}

(1. 军事科学院卫勤保障技术研究所, 天津 300161; 2. 国家生物防护装备工程技术研究中心, 天津 300161)

【摘要】 目的 研制一种生物安全型禽负压隔离器。**方法** 依据国家标准对动物隔离设备的要求, 综合考虑气密传递和消毒功能的实际需求, 对隔离器的结构进行设计。**结果** 隔离器综合集成通风过滤系统、物品传递系统、自控系统、消毒连接系统、污水收集处理系统, 经过第三方检测, 其技术指标达到国家标准要求。**结论** 该隔离器适用于高致病性感染禽类饲养与实验研究, 可满足我国生物安全实验室开展相关研究的现实需求。

【关键词】 生物安全; 禽负压隔离器; 气密传递; 消毒

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 09-0090-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.09.016

Development of a biosafety negative-pressure poultry isolator

ZHANG Zongxing^{1,2}, QI Jiancheng^{1,2*}, WU Jinhui^{1,2}, ZHANG Enlei^{1,2}, ZHANG Jinming^{1,2}, YI Ying^{1,2}

(1. Institute of Medical Support Technology, Academy of Military Sciences, Tianjin 300161, China.

2. National Bio-Protection Engineering Center, Tianjin 300161)

【Abstract】 Objective To develop a biosafety negative-pressure poultry isolator. **Methods** In accordance with national standards for animal isolation equipment, taking into account the actual needs of airtight transfer and disinfection functions, the structure of an isolator was designed. **Results** The isolator was integrated with an operating system, ventilation and filtration system, transfer system, automatic control system, sterilization connection system, and sewage collection and treatment system. Upon testing by a third party, it was confirmed that its technical indicators meet the national standards. **Conclusions** The isolator is suitable for feeding and experimental research of animals with highly pathogenic infections, meeting the practical needs of biosafety laboratories in China.

【Keywords】 biosafety; negative-pressure poultry isolator; airtight transfer; disinfection

近年来,在全球范围内高致病性禽流感疫情频发,而我国部分地区成为疫情重灾区,已造成严重的经济损失。同时,全球各地不断出现人感染禽流感疫情,截止到2013年底,仅我国(包括香港与台湾地区)就有48人死于高致病性禽流感^[1],且仍处于进一步扩散态势,已对我国的公共卫生安全构成严重威胁。高致病性禽流感已被世界动物卫生组织列为法定必须上报的A类传染病,在我国也被列

为《国家中长期动物疫病防治规划(2012—2020年)》优先防治一类动物疫病^[2]。因此,世界各国开始加大投入开展与禽流感相关的科学实验研究。由于高致病性禽流感的危险性,为降低感染风险,开展高致病性禽流感感染动物的饲养、实验以及检验检疫等操作需要在高等级生物安全动物隔离器内进行。

目前,国内从事禽流感科学研究的实验室大多

【基金项目】 国家重点研发计划课题(编号:2016YFC1201401)。

【作者简介】 张宗兴(1985—),男,博士,研究方向:生物防护技术与装备。E-mail: zhangzx@npec.org.cn

【通信作者】 祁建城(1971—),男,研究员,研究方向:生物防护技术与装备。E-mail: qijch@npec.org.cn

数使用的是国产隔离器,多由饲养 SPF 级动物的笼具改造而成^[3],在关键的生物安全指标方面,难以达到 CNAS-CL53《实验室生物安全认可准则对关键防护设备评价的应用说明》^[4]的技术要求,无法满足高致病性感染动物实验的生物安全要求,存在较大的生物安全隐患。因此,使用此类国产隔离器的实验室,均存在无法通过 CNAS 评审而不能继续开展相关实验研究的问题。而国外进口设备价格昂贵,且存在后期维护依赖外方、有保密安全隐患等严峻问题,难以满足我国广泛开展相关研究的现实需求,严重制约了我国高致病性病原微生物防控的能力和水平,亟需研发技术性能指标满足标准要求的隔离操作设备。

1 禽负压隔离器简介

禽负压隔离器是动物隔离器的一种。动物隔离器作为一种实验动物专用设施,可通过采用多种有效隔离方法维持隔离器内部环境(实验动物所处环境)与外界环境处于有效隔离状态(无菌或无外来污染),如空气经过高效过滤器后送入,并经过高效过滤器处理后排出,物品经过无菌处理后方能进出饲养空间,该设备既能保证动物与外界隔离,又能满足动物所需要的特定环境;同时,避免操作者穿着过多的防护服,改善操作人员工作的舒适度、灵活性,降低误操作,提高安全水平;感染物质完全受控,使污染区域最小化^[5]。

根据压力可将隔离器分为正压隔离器和负压隔离器。正压隔离器是指隔离器内压力高于外部大气压力,多用于清洁动物饲养(防止外部环境感染内部环境);负压隔离器则指隔离器内压力低于外部大气压力,多用于感染动物实验(防止内部环境有害物质污染外部环境),通常高等级生物安全实验室安装负压动物隔离器进行感染动物的饲养和实验。根据负压隔离器的机械密封性能,又可将隔离器分成非气密式隔离器和气密式隔离器。两者主要区别在于设备结构、消毒方式、气密性要求等方面。非气密式隔离器多用于饲养中型动物,由于非气密式隔离器无法有效防止病原微生物泄漏至其所在室内环境,若开展携带或感染了高致病病原微生物的动物实验时,必须有效提高实验室基础隔离设施的防护水平和人员个体防护水平,这极大地提高了开展此类实验活动的门槛;而气密式动物隔离器则可以保证在开展同类实验活动时起到有

效安全隔离的作用,有效降低了对实验室基础隔离设施和人员个体防护的要求,更加适用于我国目前的大多数 ABSL-3 实验室。

我国实验室生物安全装备起步较晚,且由于国产禽负压隔离器多数是通过对于 SPF 级动物饲养的正压隔离器改造而来,其箱体结构气密性、高效过滤器安装可靠性、过滤器原位检测、物品气密传递、气(汽)体消毒、手套的连接方式、操作方便性等方面与进口产品均存在较大差距。目前,国内引进的进口禽负压隔离器主要来自美国与法国的两家公司,两者的结构形式存在较大差异,箱体主体结构分别采用了不锈钢材质与 HDPE(高密度聚乙烯)材质,传递装置则分别采用了液体密封传递与快速传递接口(rapid transfer ports, RTP)双门传递系统。引进上述进口隔离器除存在前文提到的问题之外,在隔离器本身技术层面,仍存在一些问题,比如:①压差控制多采用手动调节方式,无法实时对压差进行自动调节;②手套口中心风速普遍偏低,无法在操作手套脱落情况下自动增大隔离器排风量以提高手套口风速;③某些型号隔离器无法安全更换手套,即手套更换过程中无法保证隔离器整体气密性;④某些型号隔离器本身缺少高效过滤器原位检漏的条件;⑤密闭阀均为手动操作,操作不便。

2 生物安全型禽负压隔离器设计原则

生物安全型禽负压隔离器不仅需要具备高可靠性的空气过滤装置以有效防止隔离器内部有毒有害微粒未经过滤而泄漏到外部,而且需要具备良好的箱体严密性和稳定的负压控制以实现机械密封和负压双重隔离防护,其所有操作均需要通过手套来实现且物品传递过程中不能破坏隔离器箱体的严密性,同时,还需具备对隔离器进行整体消毒的技术措施以满足生物安全要求。因此,生物安全型禽负压隔离器(以下简称“隔离器”)的设计主要遵循三个原则:一是可满足我国相关标准的要求;二是建立方便快捷的气密传递链条;三是建立完整的消毒链条。

我国关于动物饲养环境的标准主要有 GB 14925-2010《实验动物 环境及设施》^[6],关于生物安全性能评价标准主要为 RB/T 199-2015《实验室设备生物安全性能评价技术规范》^[7]与 GB 50346-2011《生物安全实验室建筑技术规范》^[8];同时,本文所研究的隔离器为气密式隔离器,其结构与Ⅲ级

生物安全柜类似,因此可参考采用 JG 170 - 2005 《生物安全柜》^[9]。在本产品设计过程中,充分参考了上述标准的相关要求。

隔离器的物品传递系统主要用于实验前与实验过程中清洁物品的传入,实验过程中血液唾液等样本、实验废弃物、粪便等物品的传出。实验前,需要将实验鸡、饲料、实验装置等提前放入隔离器;实验过程中,需要向隔离器内定期添加饲料与放入实验器材,同时需要不定期从隔离器内取出采集的样本、已使用的器材(不可重复使用的)、死亡的鸡等,并定期取出收集的粪便。其中,动物粪便的处理有干法和湿法两种处理手段:干法通常是在隔离器的底部铺设塑料布,定期或实验结束后将落满粪便的塑料布卷起,打包传出;湿法通常是定期使用冲洗水枪冲洗隔离器底部的粪便,并将污水排放至污水收集装置。

隔离器的消毒链条主要包括隔离器(含高效过滤器)本身以及所有在实验过程中从隔离器内传出物品的消毒,包括污染废弃物、采集样本、动物粪便、污水(湿法)等。隔离器在整个实验周期结束后,需要进行整体气体消毒;实验过程中污染废弃物的传出,需要进行无害化处理,如高温或气体消毒;对于采集的样本,由于需要进行进一步的实验或样本保留,只能对其所收集的容器表面进行气体消毒;采用干法收集的动物粪便,可采用高温消毒或液体浸泡消毒方式,而采用湿法收集的动物粪便则主要采用液体消毒方法。

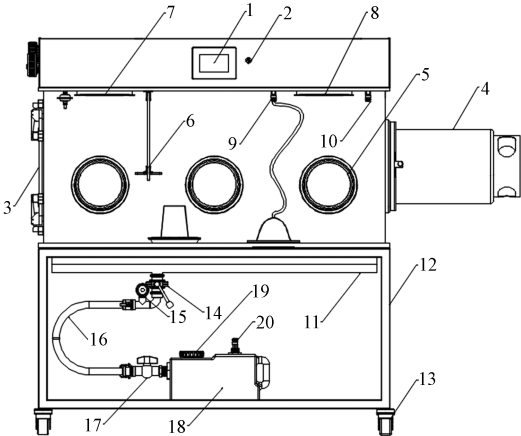
3 隔离器结构设计

禽负压隔离器主要由隔离箱体、通风过滤系统、传递系统、自控系统、污水收集处理系统组成,如图 1 所示。

3.1 箱体

隔离器箱体四周均采用硬质透明材料密闭焊接制作,具有良好的可视性,同时箱体上的所有接口均采用密闭方式穿板连接以有效保证隔离器的密封性。隔离器的顶部为通风过滤系统和自控系统。隔离器箱体顶部面板设置禽饮用水接口和冲洗用水接口,工作台面由多块格栅板组成,用于禽类栖息以及放置饲料和饮水,金属网架的底部为排水槽,用于收集粪便和污水。隔离器箱体底部安装不锈钢支架,支架底部四角均设置移动脚轮。

隔离器两侧操作面板上均安装有长手套,长手



注:1:显示屏;2:电源开关;3:设备门;4:RTP 传递系统;5:手套口;6:可折叠式置物台;7:送风口;8:排风口;9:饮用水接口;10:液体冲洗接口;11:底部水槽;12:支架;13:脚轮;14:排水截止阀;15:过滤器;16:排水管;17:污水收集桶截止阀;18:污水收集桶;19:污水收集桶盖;20:消毒接口。

图 1 隔离器正视图

Note. 1: Display screen; 2: power switch; 3: equipment door; 4: RTP transfer system; 5: glove port; 6: folding shelving unit; 7: air supply outlet; 8: air exhaust outlet; 9: drinking water port; 10: liquid wash port; 11: bottom water channel; 12: trestle; 13: trundles; 14: drainage globe valve; 15: filter; 16: drain-pipe; 17: globe valve of sewage collection bucket; 18: sewage collection bucket; 19: bung of sewage collection bucket; 20: sterilization port.

Figure 1 Front view of isolator

套通过弹性橡胶圈固定于箱体法兰凹槽上。用于固定手套的法兰上设置有两条凹槽,可方便在线安全更换手套^[10]。长手套为氯丁橡胶(neoprene)材质,具有良好的操作手感,同时对臭氧、紫外线、浓酸、浓碱和强氧化剂都有很好的耐性,适用于生物安全操作环境。隔离器箱体两端分别设置设备门和 RTP 传递系统。隔离器箱体顶部设置可折叠式置物台,需要时可可将台架放下用于临时摆放实验器材。

3.2 通风过滤系统

通风过滤系统由送风高效过滤器、排风高效过滤器、通风管路、生物密闭阀、排风机等组成,如图 2 所示。进风口设置有初效过滤器,送、排风高效过滤器均为 H14 级高效过滤器,其最低穿透粒径(most penetration particle size, MPPS)过滤效率 $\geq 99.995\%$ 。

禽负压隔离器的送排风高效过滤器均应具备原位检漏条件以检测过滤器的完整性和安装的可靠性,从而有效防止病原微生物扩散至外环境。由于送风高效过滤器的出风面紧邻隔离器进风口,因

而 HDPE 传递桶则采用气(汽)体熏蒸消毒,其桶底外部安装有 2 个消毒接口用于连接消毒机,桶底内部安装有 2 只高效过滤器,分别与消毒接口连通。HDPE 传递桶可用于传递需要保存的样本,采用气体熏蒸消毒可对样本外包装进行消毒而不破坏样本本身。

自控系统主要由 PLC 控制模块、显示屏、压差传感器、密闭阀执行器、变频器、照明、加热模块、温湿度传感器、报警模块、开关、电源等组成。自控系统可控制排风机的启停、密闭阀开关、压差、温度、照明、报警等,并可实时记录隔离器内环境参数。由压差传感器、变频器、风机与隔离器内压差构成闭环控制回路,可根据隔离器内实时压差自动调节风量时刻保持压差恒定在设定值。由加热模块、温湿度传感器与隔离器排风温度构成闭环控制回路,可根据隔离器排风温度实时调节加热模块,可满足不同日龄的禽类对环境温度的要求。温湿度传感器安装在生物密闭阀和风机之间的管路上,可有效避免在隔离器消毒过程中消毒剂对传感器的化学腐蚀。照明由 LED 光源组成,可手动控制开关。报警系统可在压差、温度超出设定范围后进行声光报警。

消毒连接系统主要由消毒接口、消毒循环管路组成。在排风管上设有消毒循环旁路,隔离器正常运行模式下,消毒循环旁路出口端是密闭的。在消毒模式下,隔离器进风口则转换为消毒剂注入口,将消毒循环旁路的接口打开,作为消毒剂排出口,分别连接消毒机的进出口,同时生物密闭阀关闭。

污水收集处理系统主要由排水槽、截止阀、污水排放管路、污水收集桶组成。污水排放管路靠近截止阀一端设置有消毒接口,消毒接口安装有高效过滤器,高效过滤器另一端作为消毒剂的排出口。污水收集桶由桶身、桶盖、消毒剂注入接口、污水注入口(兼作污水排放口)、截止阀组成。

对隔离器进行消毒是防止隔离器内病原微生物存活、增殖及向外扩散的有效手段和关键一环,主要包括隔离器箱体、高效过滤器、RTP 传递桶以及污水收集桶的消毒。



Note. Arrows indicate the direction of airflow.

Figure 2 Diagram showing principle of isolator ventilation filtration system

传递系统位于隔离器箱体两端,由设备门和 RTP 传递系统组成。设备门可用于在实验准备阶段,可通过设备门将实验用禽类、饲料、实验装置等提前放入隔离器,同时,为了避免在实验过程中人员误操作而打开设备门,在设备门上设置了锁具。RTP 传递系统主要用于实验过程中物品的传入和传出,主要包括饲料、实验器材、采集的样本、已使用的器材(不可重复使用的)、死鸡、粪便等。RTP 传递系统由安装在隔离器上 RTP 传递门和 RTP 传递桶组成,RTP 传递门通常称为 α 门,而 RTP 传递桶上的门称为 β 门。将传递桶安装到 α 门之后,传递桶与隔离器形成密封,同时, α 门与 β 门结合在一起并形成密封,打开 α 门与 β 门的合体门之后,隔离器与传递桶相连通。根据传递桶的材质,可分为不锈钢材质和 HDPE(高密度聚乙烯)材质,不锈钢传递桶采用高温高压方式对其内部物品及内腔进行消毒,传递桶上安装有用于泄压的高效过滤器;

4.1 隔离器整体消毒

隔离器整体消毒是在整个实验周期结束后进行的,可对隔离器箱体内部及送排风高效过滤器进行整体消毒,通常采用气(汽)体循环消毒方式。采用气(汽)体循环消毒方式进行消毒时,将气体消毒机消毒剂的输出口通过管路连接至消毒剂注入口(隔离器进风口),打开隔离器消毒接口,将消毒机的消毒剂回收口连接至气体消毒剂排出口形成闭环消毒环路,然后开启消毒机发生气体消毒剂,对隔离器箱体内部及送、排风高效过滤器进行原位消毒;采用气体一过式消毒方式时,则需将气体消毒剂排出口通过消毒管路连接至所在实验室排风系统或外环境,其他步骤同上;消毒结束后,取下隔离器的消毒管路,打开生物密闭阀,开启隔离器通风系统对残余消毒剂进行吹扫,吹扫结束后,取出生物指示剂进行培养验证消毒效果,则整个消毒流程完成。见图 3。

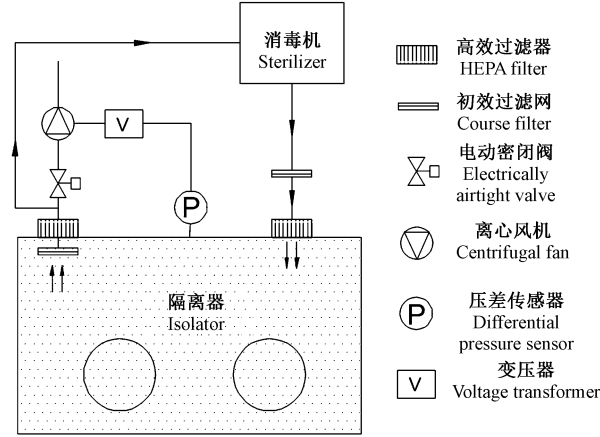


图 3 隔离器气体消毒原理图

Note. Arrows indicate the direction of airflow.

Figure 3 Diagram showing principle of isolator gaseous disinfection

4.2 RTP 传递桶消毒

4.2.1 不锈钢传递桶

将污染物品放置在传递桶内,关闭传递门,并将传递桶从隔离器摘下后,需将传递桶直接放置在高压灭菌器内进行整体高温高压消毒。

4.2.2 HDPE 传递桶

将污染物品放置在传递桶内,关闭传递门,将传递桶从隔离器摘下后,将气体消毒机的注入口和回收口分别连接至传递桶底部的消毒接口,进行气体熏蒸消毒。

4.3 污水收集桶消毒

收集污水前,可先将消毒剂提前放置在污水收

集桶内,然后将污水收集桶通过排水管连接至隔离器底部的排水口,打开排水口上部的截止阀,将隔离器内的污水排放至污水收集桶,但要控制水量避免将污水收集桶灌满,以免污水外溢;污水排放结束后,关闭排水截止阀,将消毒机的气体注入口连接至污水收集桶上的消毒接口,而气体回收口则连接至污水排放段上的过滤器入口,构成消毒循环环路,进行气体熏蒸消毒;消毒结束后,关闭污水收集桶上的截止阀,将排水管拆下,将污水收集桶的污水排放至特定的污水处理系统。

5 性能验证

根据相关标准要求,隔离器的检测项目主要包括:气密性、换气次数、静压差、空气洁净度、手套口风速、高效过滤器检漏、噪声、照度。目前,认可标准 RB/T 199 - 2015《实验室设备生物安全性能评价技术规范》^[7]规定了气密式动物隔离器的工作区气密性要求,而对于安装类似 RTP 传递桶这种脱卸式传递装置其气密性则没有规定。GB/T 25915.7 - 2010《洁净室及相关受控环境 第 7 部分:隔离装置(洁净风罩、手套箱、隔离器、微环境)》^[10]要求传递装置不应降低隔离装置的性能,同时,对于可单独使用的传递装置其小时泄漏率不得大于其所服务的隔离装置的小时泄漏率,换言之,传递装置的气密性不应降低隔离装置的气密性。且由于 RTP 传递装置在传递高致病性病原微生物过程中存在泄漏风险,因此,RTP 传递装置本身的气密性以及其安装到隔离器并与隔离器构成一体后的气密性均应满足隔离器工作区的气密性要求。

2016 年 10 月,委托国家建筑工程质量监督检验中心对该型隔离器的整体性能进行了检测。检测结果如下:

(1)气密性:在 +1000 Pa 下,隔离器工作区小时泄漏率为 0.09%;在 +1000 Pa 下,隔离器与 RTP 传递桶构成一体后小时泄漏率为 0.07%;在 +1000 Pa 下,隔离器与 RTP 传递桶构成一体后小时泄漏率为 0.07%;在 +1000 Pa 下,RTP 传递桶的小时泄漏率为 0.07%;上述测试结果均远高于 RB/T 199 - 2015《实验室设备生物安全性能评价技术规范》^[7]中在 250 Pa 下小时泄漏率不超过 0.25%的气密性要求;

(2)换气次数:不小于每小时 30 次;

(3)空气洁净度:达到 5 级;

(4)静压差:在负压运行状态下,隔离器内与房间的相对负压符合安全柜标准中不小于 120 Pa 的要求;

(5)手套口风速:达到 1.1 m/s,符合安全柜标准中不小于 0.7 m/s 的要求,可保证在手套意外脱落或破损时手套口的气流流向明显向内,无外逸;

(6)送风高效过滤器检漏:采用扫描法对送风高效过滤器进行检漏测试,边框及滤芯均未见泄漏;

(7)排风高效过滤器检漏:采用效率法对其进行检漏检测,并对结果进行 95% 置信度计算,对粒径为 0.3 ~ 0.5 μm 粒子的过滤效率大于 99.99%;

(8)噪声:隔离器内部与外部噪声均低于 50 dB(A),有效保证实验动物福利要求和工作人员环境舒适性要求;

(9)平均工作照度:正常运行状态下,平均工作照度符合安全柜标准中不低于 650 lx 的要求。

由此可见,所研制的该型禽负压隔离器相关性指标可满足标准 GB 14925 - 2010《实验动物 环境及设施》^[6]、RB/T 199 - 2015《实验室设备生物安全性能评价技术规范》^[7]、GB 50346 - 2011《生物安全实验室建筑技术规范》^[8]以及 JG 170 - 2005《生物安全柜》^[9]的相关要求,达到了设计要求。目前,该型禽负压隔离器已在我国多家高等级生物安全实验室示范应用,且均通过了国家建筑工程质量监督检验中心的检验,达到相关标准的要求。

6 结论

动物隔离装置是高等级动物生物安全实验室的硬件基础,是保护工作人员与外环境的重要初级防护屏障之一。本文介绍了国产生物安全型禽负压隔离器的研制概况,在国家重点研发计划项目的资助下,有效解决了气密防护、气密传递、微环境控制、过滤器检漏和消毒、废弃物收集处理等关键技术问题。具有国家检测资助的第三方机构检测结果表明,所研制的禽负压隔离器相关性能指标均可

满足相关标准及设计要求,可满足生物安全实验室开展高致病性感染禽类隔离饲养和实验的重大需求;同时,与进口同类产品相比,自动化程度更高,安全性更好。该型隔离器的研制成功,打破了发达国家对高等级生物安全隔离装备的技术垄断,进一步提高了我国生物安全关键防护装备的保障水平,将为我国实现实验室生物安全装备自主可控奠定更加坚实的基础。

参考文献:

- [1] 陈桂珍,郭叙林. 基于 CNKI 的我国禽流感研究现状与热点分析 [J]. 中国家禽, 2015, 37(8): 1 - 5.
- [2] 韦平,秦爱建. 重要动物病毒分子生物学 [M]. 北京:科学出版社, 2008.
- [3] 吴福林,樊宝仁,翟君生,等. 正负压不锈钢隔离器的研制与使用 [J]. 中国兽药杂志, 2002, 36(3): 52 - 55.
- [4] 中国合格评定国家认可中心. CNAS-CL53: 2016, 实验室生物安全认可准则对关键防护设备评价的应用说明 [S]. <https://www.cnas.org.cn/rkgf/sysrk/rkyzyz/2016/12/879912.shtml>
- [5] Sawyer J, Bennett A, Haines V, et al. The effect of microbiological containment systems on dexterity [J]. J Occup Environ Hyg, 2007, 4(3): 166 - 173.
- [6] 全国实验动物标准化技术委员会. GB 14925 - 2010, 实验动物 环境及设施 [S]. 北京:中国标准出版社, 2011.
- [7] 中国国家认证认可监督管理委员会. RB/T 199 - 2015, 实验室设备生物安全性能评价技术规范 [S]. 北京:中国标准出版社, 2016.
- [8] 中华人民共和国住房和城乡建设部. GB 50346 - 2011, 生物安全实验室建筑技术规范 [S]. 北京:中国建筑工业出版社, 2011.
- [9] 中华人民共和国建设部. JG 170 - 2005, 生物安全柜 [S]. 北京:中国标准出版社, 2005.
- [10] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 25915.7 - 2010, 洁净室及相关受控环境 第 7 部分:隔离装置(洁净风罩、手套箱、隔离器、微环境) [S]. 北京:中国标准出版社, 2010.

[收稿日期]2017 - 12 - 20