Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

1.3. ЭПИДЕМИОЛОГИЯ

Биологическая безопасность при глубинном аппаратном культивировании микроорганизмов I—II групп патогенности

Методические указания
МУ 1.3.2411—08

Издание официальное

Москва • 2009

gost.e-ecolog.ru

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

1.3. ЭПИДЕМИОЛОГИЯ

Биологическая безопасность при глубинном аппаратном культивировании микроорганизмов I—II групп патогенности

Методические указания
МУ 1.3.2411—08

ББК 51.9
Б63

Б63 **Биологическая** безопасность при глубинном аппаратном культивировании микроорганизмов I—II групп патогенности: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009.—12 с.

ISBN 5—7508—0763—0

1. Разработаны: Волгоградским научно-исследовательским противочумным институтом Роспотребнадзора (В. М. Самыгин, В. В. Алексеев, А. В. Липницкий, Е. В. Прохватилова, Т. А. Гришкина, Л. К. Жога); Российским научно-исследовательским противочумным институтом «Микроб» (С. А. Еремин, Д. А. Щербаков, А. К. Никифоров, В. В. Кутырев); 48-м Центральным научно-исследовательским институтом Министерства обороны России (И. В. Борисевич, И. В. Дармов, С. Л. Кузнецов, А. С. Кучеренко, К. И. Гурин, В. М. Бакулин, М. В. Щур, В. И. Полищук).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию при Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол от 3 июля 2008 г. № 2).

3. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 28 июля 2008 г.

4. Введены в действие с 1 сентября 2008 г.

5. Введены впервые.

ББК 51.9

Редакторы Н. Е. Акопова, Л. С. Кучурова
Технический редактор Е. В. Ломанова

Подписано в печать 07.04.09

Формат 60x88/16 Печ. л. 0,75

Тираж 500 экз. Заказ 23

Федеральная служба по надзору
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
127994, Москва, Вадковский пер., д. 18/20

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован
отделом издательского обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а
Отделение реализации, тел./факс 952-50-89

© Роспотребнадзор, 2009
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009

Содержание

1. Область применения 4
2. Нормативные ссылки 4
3. Общие положения 5
4. Требования к организации работ 6
5. Принципиальная схема лабораторной установки для культивирования микроорганизмов I—II групп патогенности 7
6. Методика глубинного культивирования микроорганизмов I—II групп патогенности на установках лабораторного типа 9
6.1. Подготовка посевной культуры 9
6.2. Подготовка установки к работе 9
6.3. Порядок эксплуатации установки 10
7. Контроль биологической безопасности лабораторных установок по глубинному культивированию патогенных биологических агентов I—II групп 11

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
28 июля 2008 г.
Дата введения: 1 сентября 2008 г.

1.3. ЭПИДЕМИОЛОГИЯ

Биологическая безопасность при глубинном аппаратном культивировании микроорганизмов I—II групп патогенности

Методические указания МУ 1.3.2411—08

1. Область применения

1.1. В настоящих указаниях предложен комплекс мероприятий по биологической безопасности при проведении глубинного аппаратного культивирования микроорганизмов I—II групп патогенности с целью изучения процессов кинетики и стехиометрии микроорганизмов, а также получения биомассы бактерий и микробных метаболитов, необходимых при конструировании и производстве иммунобиологических препаратов. Приводятся меры биологической безопасности при культивировании микроорганизмов I—II групп патогенности на лабораторных установках с целью получения ограниченного объема материала в процессе выполнения экспериментальной работы.

1.2. Методические указания предназначены для специалистов федеральных государственных учреждений науки и здравоохранения Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, работающих с микроорганизмами I—II групп патогенности, а также могут быть использованы специалистами других заинтересованных организаций.

2. Нормативные ссылки

2.1. Федеральный закон «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» от 30.03.99 № 52.

2.2. Федеральный закон «О защите населения и территорий от чрезвычайных ситуаций природного и техногенного характера» от 21.12.94 № 68.

2.3. Постановление правительства Российской Федерации «Об утверждении Положения о государственной санитарно-эпидемиологической службе Российской Федерации и Положения о государственном санитарно-эпидемиологическом нормировании» от 24.07.00 № 554.

2.4. Федеральный закон «О борьбе с терроризмом» от 25.07.99 № 130.

2.5. СП 1.3.1285—03 «Безопасность работы с микроорганизмами I—II групп патогенности (опасности)».

2.6. СП 1.2.036—95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I—IV групп патогенности».

2.7. СП 1.3.2322—08 «Безопасность работы с микроорганизмами I—IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

2.8. СН 535—81 «Инструкция по проектированию санитарно-эпидемиологических станций».

3. Общие положения

Изучение и практическое использование микроорганизмов и продуктов микробного синтеза предполагает наличие простых и эффективных методов их получения. Продуктивным и технологичным методом получения биомассы или другого целевого продукта является глубинное культивирование, позволяющее получать препаративно значимые количества бактериальных клеток и экстрацеллюлярных биополимеров в относительно короткие сроки.

Аппаратное глубинное культивирование микроорганизмов относится к числу наиболее распространенных технологических методов, которые широко применяют для получения микробной биомассы и продуктов микробного синтеза. Эти методы эффективны, экономичны, обеспечивают получение целевого продукта в короткие сроки и не предусматривают особых условий по биологической безопасности в том случае, если используются непатогенные бактерии. Однако возникновение биологической угрозы становится реальным при выращивании микроорганизмов I—II групп патогенности, особенно возбудителей, способных вызывать легочные формы заболеваний, таких как чума, туляремия, бруцеллез, мелиоидоз, сап, сибирская язва. Развитие вышеуказанных заболеваний возможно в результате аэрогенного заражения.

Определяющим условием для соблюдения мер биологической безопасности является использование для глубинного культивирования в лабораторных условиях установок, соответствующих определенным

конструктивным принципам. Кроме того, важное значение имеют средства и методы инактивации бактериальных аэрозолей, образующихся в результате принудительной аэрации бульонных культур.

Для получения биомассы микроорганизмов или продуктов микробного синтеза существуют различные серийные установки (аппараты, ферментеры, ферментаторы, биореакторы), используемые в основном в пищевой промышленности. Эти установки ориентированы на повышение эффективности и экономичности биотехнологического процесса, а также обеспечение условий защиты конечного продукта.

Основным недостатком данных установок, с точки зрения биологической безопасности, является повышенное, по сравнению с атмосферным, давление воздуха в ферментерах в момент посева культуры, отбора проб материала и на протяжении всего процесса выращивания глубинным методом. Это создает реальную угрозу для работающего персонала вследствие выброса в окружающую среду бактериального аэрозоля. Кроме того, при эксплуатации установок возникает проблема деконтаминации отработанного воздуха, использованного для барботирования питательной среды в процессе культивирования.

В данных методических указаниях изложены общие требования к организации работ, предложена принципиальная схема лабораторной установки для культивирования микроорганизмов I—II групп патогенности, приведены дополнительное оборудование и методические приемы, обеспечивающие биологическую безопасность работ.

4. Требования к организации работ

Глубинное культивирование микроорганизмов I—II групп патогенности (опасности) следует проводить в бактериологических боксах. Требования к помещениям для данных работ регламентированы СП 1.3.1285—03 «Безопасность работы с микроорганизмами I—II групп патогенности (опасности)».

Помещение для культивирования должно быть оборудовано приточно-вытяжной вентиляцией, снабженной фильтрами тонкой очистки воздуха. В помещении создается отрицательное давление в соответствии с СН 538—81 «Инструкция по проектированию санитарно-эпидемиологических станций». Оптимальным следует считать размещение установки для культивирования в ламинарных шкафах или боксах биологической безопасности для работы с возбудителями особо опасных инфекций (III класс защиты).

Культивирование разрешается на оборудовании, прошедшем аттестацию в комиссии учреждения по контролю биологической безопасности.

К работе допускается персонал, прошедший курсы специализации по особо опасным инфекциям, имеющий опыт работы с ПБА I—II групп, допущенный приказом руководителя учреждения, обученный работе на установке.

Аппаратное глубинное культивирование в биореакторах проводится только в условиях разрежения под вакуумом. Категорически запрещается создавать избыточное давление в полости аппаратов для передавливания культуры, аэрирования и отбора проб.

Биореакторы должны быть оснащены системами внесения посевной культуры и отбора проб, вакуум-очистительной системой отработанного воздуха с двумя каскадами фильтров тонкой очистки и каплесборником или очистительной системой (седиментатор, скруббер) с термостабильным дезраствором. В случае если биореакторы установлены стационарно, они должны быть дополнительно оснащены материальными трубопроводами из нержавеющей стали и аварийным сборником культуры с объемом, соответствующим объему реактора. При необходимости в него переносится бактериальная масса для последующей термической инактивации.

Системы внесения инокулята и отбора проб должны иметь резиновые трубки для подсоединения соответствующих емкостей при помощи стальных (реже стеклянных) переходников.

В рабочей зоне биореактора, где проводятся операции по подсоединению емкостей с инокулятом, рабочими растворами (питательными средами и жидкостями), оборудуется рабочий стол с поддоном, в который помещается коврик, смоченный раствором дезинфицирующего средства (в соответствии с видом возбудителя). Также устанавливается емкость с дезинфицирующим раствором для замачивания инструментов и отработанных материалов (бумаги оберточной, ваты, ватных тампонов, резинок, стальных и стеклянных переходников, зажимов).

Все работы по культивированию проводятся персоналом, обеспеченным противочумными костюмами соответствующего типа.

5. Принципиальная схема лабораторной установки для культивирования микроорганизмов I—II групп патогенности

Основным требованием, предъявляемым к лабораторным установкам для глубинного культивирования микроорганизмов I—II групп, является биологическая безопасность. На рисунке представлена схема установки, отвечающая данному принципу. Ее конструкция предусматривает создание в культуральном сосуде отрицательного давления и обеззараживание отработанного воздуха, использованного для барботирования жидкой питательной среды.

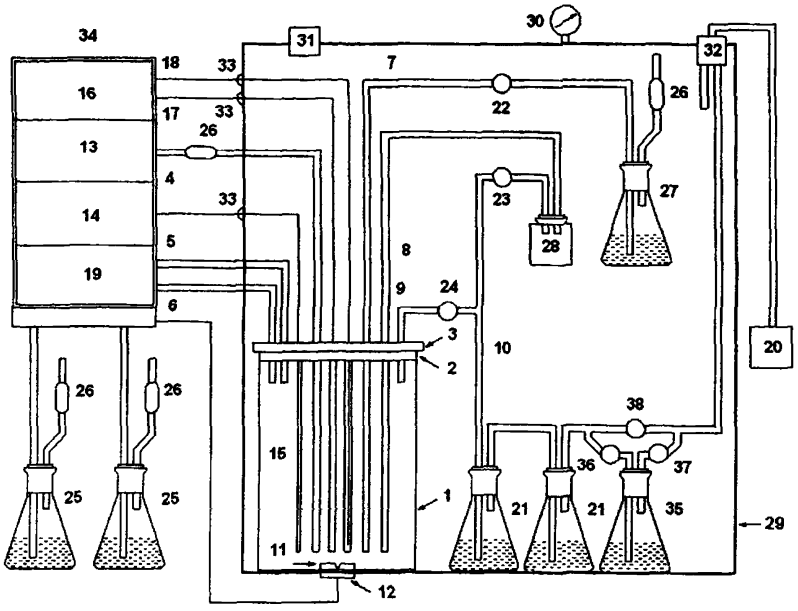

Рис. Схема лабораторной установки для культивирования микроорганизмов I—II групп патогенности:
1 – культуральный сосуд; 2 – пробка с отверстиями для патрубков; 3 – крышка; 4 – патрубок для подачи воздуха; 5, 6 – патрубки для подачи корригирующих растворов; 7 – патрубок для внесения инокулята; 8 – патрубок для отбора проб; 9, 10 – патрубки для отвода отработанного воздуха; 11 – импеллер; 12 – привод импеллера; 13 – компрессор для подачи воздуха; 14 – pH-метр; 15 – pH-электрод; 16 – термостатирующее устройство; 17 – нагревательный элемент; 18 – термистор; 19 – перистальтический насос; 20 – вакуумный насос; 21 – скрубберы с дезинфицирующим раствором; 22, 23, 24 – клапаны; 25 – емкости с корригирующими растворами; 26 – фильтры очистки воздуха; 27 – инокулятор; 28 – пробоотборник; 29 – бокс биологической безопасности; 30 – манометр; 31 – входной фильтр тонкой очистки воздуха; 32 – выходной фильтр тонкой очистки (общий для бокса биологической безопасности и культурального сосуда); 33 – герметичные разъемы для электрических коммуникаций; 34 – блок регуляции и контроля; 35 – импинжер; 36, 37, 38 – клапаны импинжера

Культуральный сосуд (1), инокулятор (27), пробоотборник (28), система очистки отработанного воздуха (21) и импинжер (35) размещены в боксе биологической безопасности (29) типа 4 БП (ТУ 95.7217—77), в котором при помощи вакуумного насоса (20) поддерживают реги-

стрируемое манометром (30) разрежение, необходимое для соблюдения мер биологической безопасности. На его боковой стенке установлены герметичные разъемы электрических коммуникаций (33).

Вне бокса расположены вакуумный насос (20), емкости с корригирующими растворами (25), магнитный привод импеллера (12), компрессор (13), термостатирующее устройство (16), pH-метр (14) и перистальтический насос (19).

Фильтры (26) выполнены из стерильной ваты или другого пористого материала. Входные и выходные фильтры (31), (32) выполнены из ткани Петрянова.

Термостатирующее устройство (16), компрессор (13), pH-метр (14) и перистальтический насос (19) объединены в блок регуляции и контроля (34).

Для бактериологического контроля отработанного воздуха установка оснащена импинжером (емкость со стерильным бульоном) (35), который располагается между системой очистки воздуха (21) и выходным фильтром тонкой очистки (32). Фильтр (32) оснащен регулирующим устройством (на рисунке не обозначено), позволяющим изменять интенсивность воздушных потоков из культурального сосуда (1) и бокса биологической безопасности (29). Импинжер подсоединяют к трубопроводу, здесь же располагаются три клапана (36—38), которые позволяют регулировать направление движения воздуха.

Рабочий объем культурального сосуда установки составляет 400 мл, скорость подачи воздуха регулируется в пределах от 0 до 1 л/мин, а скорость вращения импеллера – от 0 до 800 об./мин.

6. Методика глубинного культивирования микроорганизмов I—II групп патогенности на установках лабораторного типа

6.1. Подготовка посевной культуры

Для внесения в биореактор посевная культура должна быть предварительно помещена в емкость, оснащенную воздушным фильтром и системой забора материала (резиновая трубка, опущенная до дна емкости). Вид и характеристики посевного материала определяются задачами конкретного исследования.

6.2. Подготовка установки к работе

Перед началом каждого цикла выращивания проверяется работоспособность всех элементов биореактора, запорной арматуры, систем обеспечения безопасности. Запорная арматура на материальных трубопроводах проверяется на герметичность с помощью галлоидного течеискателя с использованием четыреххлористого углерода.

Культуральный сосуд заполняется питательной средой, через пробку подсоединяются все необходимые патрубки и датчики и стерилизация реактора проводится в автоклаве согласно инструкции по приготовлению питательной среды. Допускается раздельная стерилизация питательной среды и биореактора с последующим внесением питательной среды в асептических условиях.

Стерилизации также подвергаются материальные трубопроводы, съемные монтажные системы резиновых трубок и переходников.

До начала работы к ферментеру подсоединяются все необходимые емкости с рабочими жидкостями и растворами, используемыми в процессе культивирования.

6.3. Порядок эксплуатации установки

Установка работает в периодическом режиме. Культуральный сосуд (1) заполняют приготовленным инокулятом в объеме 400 мл, находящемся в инокуляторе (27), включая вакуумный насос (20) и создавая разницу давления между культуральным сосудом (1) и инокулятором. Для этого (при отсутствии импинжера) открывают клапаны (22) и (24), а клапан (23) оставляют закрытым. После перекачивания инокулята в культуральный сосуд (1) клапан (22) закрывают и отсоединяют инокулятор. В случае если установка не оснащена боксом биологической безопасности, то отсоединение инокулятора проводится путем разрезания резиновой трубки между двумя зажимами под салфеткой, обильно смоченной дезраствором. При периодическом культивировании и наличии бокса биологической безопасности допускается перекрытие трубопровода инокулятора с помощью клапана и оставление его до окончания процесса культивирования.

После внесения инокулята в культуральный сосуд (1) при помощи компрессора (13) подают воздух, который стерилизуется, проходя через фильтр (26). Производительность вакуумного насоса (20) устанавливается выше, чем производительность компрессора (13). Таким образом в культуральном сосуде (1), во всех патрубках, инокуляторе (27), пробоотборнике (28) и системе очистки воздуха (21) устанавливается отрицательное давление в пределах (20 ± 5) Па.

При помощи термостатирующего устройства (16) и pH-метра (14) устанавливают необходимые значения температуры и pH. Контроль pH внутри культурального сосуда осуществляется автоматически при помощи комбинированного pH электрода (15), сигнал с которого подается согласно заданным параметрам опыта на два перистальтических насоса (19) для подачи корригирующих растворов из емкостей (25). В качестве корригирующих растворов используются растворы щелочи (0,1 N NaOH), кислоты (0,1 N HCl) или глюкозы (40 %) в зависимости от поставленных задач. Если в процессе работы возникает необходимость

замены емкостей, то эта операция осуществляется аналогично операции отбора проб, описанной далее.

Для предотвращения избыточного пенообразования в культуральный сосуд вводят химические пеногасители типа Silicon Antischaum-emulsion M30 или другие.

В процессе культивирования осуществляют аэрацию жидкой питательной среды путем подачи воздуха и перемешивания импеллером (11). Отработанный воздух отбирается вакуумным насосом (20) и поступает в систему очистки, состоящую из 2-х последовательно соединенных скрубберов (21) с дезинфицирующим раствором. В качестве дезинфицирующего раствора используется формальдегид в виде 4 %-го раствора (10 %-й формалин). Скорость прохождения отработанного воздуха не должна превышать 1,0 л/мин для установок с рабочим объемом культурального сосуда 400 мл.

Отбор проб бульонной культуры осуществляют из культурального сосуда (1) в пробоотборник (28), открывая клапан (23), и при закрытом клапане (24). Заполненный пробоотборник заменяют пустым. Запрещается заполнять пробоотборники жидкой микробной культурой больше чем наполовину. При невозможности визуального контроля следует использовать технические весы.

После завершения цикла глубинного культивирования аналогично процедуре отбора проб осуществляют перекачивание конечного продукта, заменяя пробоотборник (28) емкостью соответствующего объема. Затем отключают компрессор (13), подающий воздух для аэрации культуры, перемешивающее и термостатирующее устройства и pH-метр. Вакуумный насос (20) отключают в последнюю очередь.

По окончании работы культуральный сосуд и инокулятор вместе с соединительными шлангами помещают в металлический контейнер и обеззараживают автоклавированием. В случае стационарной установки ферментера материальные трубопроводы и культуральный сосуд обеззараживаются острым паром. Режим обеззараживания зависит от используемого в работе вида микроорганизмов и должен соответствовать СП 1.3.1285—03. В помещении бактериологического бокса проводится текущая дезинфекция и облучение бактерицидной лампой.

7. Контроль биологической безопасности лабораторных установок по глубинному культивированию патогенных биологических агентов I—II групп

С целью защиты окружающей среды от выбросов бактериальных аэрозолей и обеспечения условий биологической безопасности для персонала лаборатории установка по глубинному культивированию оборудована двухуровневой системой очистки воздуха.

Первый уровень включает два последовательно соединенных скруббера, выполненных в виде закрытых емкостей, содержащих дезинфицирующие растворы. В качестве дезинфицирующего средства используют формальдегид в виде 2,5 %-го раствора, через который барботируют воздух, необходимый для аэрации жидкой питательной среды при выращивании бактерий. Скорость прохождения воздуха не должна превышать 2,5 л/мин на 1 л дезинфицирующего раствора для установок с рабочим объемом культурального сосуда 400 мл.

Второй уровень защиты представлен выходным фильтром тонкой очистки. Он может быть общим для бокса биологической безопасности и отработанного воздуха, прошедшего через скрубберы.

Бактериологический контроль биобезопасности установки проводят 1 раз в 6 месяцев. Он включает в себя проверку эффективности работы выходного фильтра, герметичности установки и эффективности работы скрубберов.

В качестве тест-культуры используют штамм *Serratia marcescens*, питательных сред – мясо-пептонный бульон и мясо-пептонный агар с 1 % галактозы.

Эффективность работы выходного фильтра бокса биологической безопасности проводят в соответствии с СП 1.3.1285—03 «Безопасность работы с микроорганизмами I—II групп патогенности (опасности)».

Для проверки установки на герметичность, а скрубберов – на эффективность работы, проводят цикл глубинного культивирования с использованием тест-культуры. До начала культивирования в бактериологическом боксе располагают десять открытых чашек Петри с агаровой средой. Взвесь *S. marcescens* засевают в культуральный сосуд в количестве 10^8 м.к./мл среды и выращивают в условиях аэрации до наступления стационарной фазы. Объем питательной среды, используемой для бактериологического контроля, составляет 200 мл. Клапаны (36) и (37) открывают, перекрывая клапан (38). Таким образом отработанный воздух, пройдя через скрубберы, поступает в импинжер с жидкой питательной средой. Культивирование продолжают еще в течение часа.

По окончании опыта чашки Петри, находившиеся в помещении бокса, закрывают, импинжер отсоединяют и помещают в термостат на 18—24 ч при 28 °С. Через сутки из жидкой питательной среды делают высевы на агаровые чашки и инкубируют в том же режиме. Для выявления специфических для тест-штамма окрашенных колоний посевы дополнительно выдерживают при комнатной температуре в течение 24 ч. Отсутствие роста на питательных средах ярко красных колоний, характерных для *S. marcescens*, свидетельствует о биологической безопасности установки и возможности ее дальнейшей эксплуатации.

gost.e-ecolog.ru