MD8 Airscan® и MD8 AirPort®

Отбор проб воздуха активным методом для обнаружения вирусов, бактерий, дрожжей и плесени

Мониторинг воздуха в лабораториях, чистых комнатах и классифицируемых помещениях с целью обнаружения микроорганизмов в окружающей среде - повседневная задача в области фармацевтической | биотехнологической промышленности согласно текущим требованиям GMP (cGMP). Как правило, сбор данных и анализ полученных результатов позволяет уже на раннем этапе обнаружить отклонения и предотвратить возникновение потенциальных проблем, вызванных превышением допустимого уровня микроорганизмов в воздухе.

russia@sartorius.com

Simplifying Progress

ПЕРСПЕКТИВНЫЕ МЕТОДЫ ОТБОРА ПРОБ ВИРУСНЫХ ЧАСТИЦ: ВОДОРАСТВОРИМЫЕ ЖЕЛАТИНОВЫЕ ФИЛЬТРЫ SARTORIUS

Капанова М.А., ООО "Сарториус РУС", marina.kapranova@sartorius.com

Выделение респираторных вирусов из воздуха – один из наиболее важных и в то же время сложных вопросов санитарной микробиологии. Вместе с тем определение вирусной загрязненности закрытых помещений, в первую очередь больничных палат, необходимо для санитарно-вирусологического контроля воздушной среды, так как наличие патогенных микроорганизмов представляет эпидемическую опасность распространения инфекций дыхательных путей. Актуальность этой проблемы стала особенно очевидной в последние несколько месяцев на фоне разыгравшейся во всем мире вспышки коронавирусной инфекции. Одними из первых стран, осознавших необходимость микробиологических исследований воздуха, стали Китай и Япония. В 2014 году ученые Японии провели ряд исследований по обнаружению и контролю распространения вируса гриппа А, и результатом этих исследований стал обязательный мониторинг воздуха в общественных местах, в аэропортах, больницах [1]. Законодательная база Российской Федерации не регламентирует контроль содержания вирусов и вирусных частиц в воздухе ни в общественных местах, ни в специализированных комнатах для работы с микроорганизмами, ни в производственных помещениях.

Главная сложность внедрения в практику мониторинга воздуха на вирусы заключается в нахождении способа отбора пробы, при котором сохраняется жизнеспособность вирусов и вирусных частиц, с учетом низкой концентрации инфекционного агента.

Наиболее часто для активного отбора проб воздуха применяют две группы методов, использующие различные физические принципы. Работа импинджеров и импакторов основана на импакции, т.е. инерционном ударе, в результате которого взвешенные в воздухе частицы осаждаются на поверхности собирающего устройства внутри прибора, как правило, содержащего питательную среду. Другая группа методов основана на фильтрации воздуха. Возможности данного метода при работе с бактериальными аэрозолями значительно выросли с момента изобретения водорастворимых желатиновых фильтров. Сегодня такие фильтры в промышленных масштабах выпускает компания Sartorius Stedim Biotech, расположенная в городе Геттингене в Германии. Благодаря запатентованному способу изготовления желатиновых фильтров с использованием осмозащитных веществ количество собираемых на них жизнеспособных микроорганизмов удваивается по сравнению с желатиновыми фильтрами без добавок [2]. Кроме того, такие фильтры демонстрируют высокую степень механической стабильности, что позволяет увеличивать проходящий через них воздушный поток как минимум в два раза и сокращать время отбора пробы. После отбора пробы желатиновые мембранные фильтры, содержащие микроорганизмы, либо инкубируют в питательной среде, либо хранят

в стерильном растворе, таком как пептонный бульон или изотонический солевой раствор. При инкубации в питательной среде желатиновый фильтр растворяется, и организмы растут непосредственно на агаре.

Обзор доступных на 2019 год методов отбора проб и обнаружения вирусов в окружающем воздухе приведен в работе [3].

Несмотря на то что эффективность желатиновых фильтров для исследования бактерий была продемонстрирована в ряде исследовательских работ [4–6], данные об их применении для вирусов оставались весьма скудными и ограничивались лишь несколькими работами [7–9].

До недавних пор фильтры ограниченно применялись при обнаружении и отборе вирусов из аэрозолей, поскольку использование фильтров считалось эффективным только в случае стабильных и резистентных вирусов, если вообще было возможным.

Чтобы последовательно разобраться с предлагаемым методом мониторинга, в статье представлены исследования, проведенные в 1991 году Хельмутом Яшхофом (Helmut Jaschhof), одним из авторов патента на желатиновые фильтры компании Sartorius [10].

Работа проводилась с использованием экспериментально полученных аэрозолей колифагов Т1 и Т3, а также

вирусов гриппа (штамм A/PR/8/34 (H1N1)), и убедительно продемонстрировала, что применение желатиновых фильтров типа 12602 производства Sartorius Stedim Biotech обеспечивает стабильную эффективность отбора указанных вирусных частиц даже при высоких скоростях входящего потока (до 1,6 м/с) и длительном времени отбора (до 15 мин).

Успешное испытание эффективности данного метода на практике в условиях сезонного пика острых респираторных заболеваний (ОРЗ) в начале 1990 г. (3–5-я неделя) оказалось возможным благодаря высокой механической стабильности желатинового фильтра и устойчивости вируса гриппа. Исследование основывалось на результатах испытаний с использованием экспериментально полученных аэрозолей вирусов и бактериофагов.

Пробы воздуха отбирали на протяжении 3 дней в помещении приемного покоя детской поликлиники г. Грайфсвальда. Далее водорастворимые фильтры с отобранным материалом помещали в среду для культивирования вирусов. Параллельно проводились эксперименты по культивированию вирусных частиц из назального секрета пациентов детского возраста, поступивших в приемный покой с недавно выявленными ОРЗ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и методы. Исследованное помещение: приемный покой детской поликлиники г. Грайфсвальда (объем помещения приблизительно 120 м³), который на протяжении 2 часов посетили не более 57 детей в сопровождении родителей. Температура: +25 °С, относительная влажность 60 %.

Материалы исследования. Назальный секрет пациентов детского возраста с недавно выявленными ОРЗ. Желатиновый фильтр производства Sartorius Stedim Biotech (тип 12602-050). Фильтрация воздуха производилась в течение 3 дней с пропусканием 1,8 м³ воздуха через каждый желатиновый фильтр каждые 15 минут при скорости потока воздуха 120 л/мин.

После отбора пробы фильтр упаковывали в полиэтиленовый пакет с 5 мл изотонического буферного раствора для культивации клеток (рН 7,4), содержащего 0,5% дрожжевой экстракт (Difco), пенициллин G (400 ЕД/мл) и стрептомицин (400 мкг/мл). Все образцы выдерживались в течение 4 часов (для промежуточного хранения использовалась холодильная камера).

Вирусологические анализы

Назальный секрет. К пробам добавили раствор Хенкса (по 3 мл на каждую пробу) и центрифугировали в течение 30 мин на скорости 3000 об./мин с добавлением 10 мкл раствора антибиотика на 1 мл супернатанта, после чего проводили инкубацию в течение 1 ч при комнатной температуре. Амниотическую жидкость куриных яиц, подвергавшихся

Рис.1. Сканирующая электронная микрофотография вируса гриппа A/PR/8/34 (H1N1), выделенного из культуры эмбриона куриного яйца (время культивирования — 11 дней). Вирусные частицы выделяли методом центрифугирования в градиенте плотности сахарозы

инкубации на протяжении 10 дней, высевали вместе с данными пробами и инкубировали в течение 3 дней при температуре +33 °С. Были приготовлены 3 пересеянных культуры для слепого исследования; вирусы выявляли с помощью реакции торможения гемагглютинации (РТГА).

Пробы воздуха. Материал фильтров растворяли с добавлением буфера при нагревании на водяной бане в течение 5 мин и при температуре +37 °С. Как описывалось выше, раствор антибиотика добавляли к суспензии, которую использовали для инокуляции инкубированных куриных яиц. Затем в среде культивировали клетки человеческого амниона линии FL и клетки асцитной карциномы. Для обнаружения вирусов использовали стандартные методы: РТГА, тест на наличие цитопатического действия (ЦПД) и реакцию на торможение гемадсорбции (РТГад).

Вирус гриппа, полученный из назальных выделений, типировали и идентифицировали путем перекрестного титрования, используя реакцию пассивной гемагглютинации с иммунными сыворотками крови кролика, содержащими антитела к вирусу гриппа A/Greifswald/1/89 (H1N1) и A/Greifswald/1/90 (H3N2) и антигены вируса гриппа A/Sichuan/2/87 (H3N2) и вируса гриппа A/Greifswald/2/88 (H3N2).

Вирусные РНК и паттерны белков вирусов определяли методом электрофореза в полиакриламидном геле.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В день исследования из находившихся в помещении детей в возрасте от 8 лет 75% имели респираторные инфекции, острые катаральные симптомы: кашель, чихание, насморк проявлялись не более чем у 40% пациентов. Из отобранных экспериментальных материалов были выделены три типа вирусов из назального секрета

Рис.2. Разделение РНК вируса гриппа A|Greifswald|1|90 (H3N2), выделенного из проб пациентов, и вируса гриппа A|Greifswald|2|90, собранного и выделенного из воздуха, методом электрофореза в полиакриламидном геле

и вирус гриппа А из пробы воздуха. Данные вирусы были успешно культивированы в среде инкубированных куриных яиц с эмбрионами во время третьего пассажа с целью пересева (вирус гриппа A|Greifswald|2|90 [H3N2]) (рис.1).

Анализ методом РТГА показал, что антигены выделенных вирусов и антигены вариантов A|Greifswald|2|88 и A|Sichuan|2|87 были в целом аналогичными и не отли-

чались от штамма, культивированного из носовых выделений пациента, который находился в помещении во время отбора проб воздуха с помощью фильтров (вирус гриппа A|Greifswald|1|90 [H3N2]).

Скорости миграции белков выделенных вирусов (НА, NP, NS и М) и все полосы вирусных РНК, полученные методом электрофореза в полиакриламидном геле, имели высокую степень соответствия (рис.2). Попытки выделения других вирусов из проб воздуха с помощью клеточных культур оказались неудачными.

Взятие проб во время президемической фазы распространения ОРЗ подтверждает эффективность метода сбора с помощью фильтров для обнаружения аэрозольных частиц вируса гриппа.

Обнаружение вируса гриппа А в воздухе приемного покоя детской поликлиники в период незначительного увеличения сезонной заболеваемости ОРЗ в регионе хорошо согласуется с данными по исследованию экспериментально созданных статических аэрозолей колифагов и вируса гриппа А [11] и подтверждает практическую пригодность желатиновых фильтров для отбора из воздуха частиц респираторных вирусов.

Учитывая относительное сокращение трудозатрат при использовании несложного метода фильтрования, применение желатиновых мембранных фильтров служит перспективным средством для анализа возникновения, стабильности и распространения инфекционных вирусных аэрозолей, например, в области генной инженерии.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Hatagishi E., Okamoto M., Ohmiya S., Yano H., Hori T.** et al. Establishment and Clinical Applications of a Portable System for Capturing Influenza, Viruses Released through Coughing // PLoS ONE. 2014. V. 9. N 8. e103560. doi:10.1371/journal.pone.0103560.
2. **Herbig H., Jaschhof H., Vinh R.T.** Gelatin membrane filters and method for producing the same // US6406906B1. 2000.
3. **Pan M., Lednicky J.A., Wu C.-Y.** Collection, particle sizing and detection of airborne viruses // Journal of Applied Microbiology. 2019. V. 127. P. 1597–1611. doi.org/10.1111/jam.14278.
4. **Burton N.C., Grinshpun S.A., Reponen T.** Physical Collection Efficiency of Filter Materials for Bacteria and Viruses // The Annals of Occupational Hygiene. 2007. V. 51. P. 143–151. https://doi.org/10.1093/annhyg/mel073.
5. **Lewandowski R., Kozłowska K., Szpakowska M., Trafny E.A.** Evaluation of applicability of the Sartorius Airport MD8 sampler for detection of Bacillus endospores in indoor air // Environ Monit Assess. 2013. n. V. 185. N 4. P. 3517–3526. doi: 10.1007/s10661-012-2807-6.
6. **Fabian P., McDevitt J.J., Houseman E.A., Molton D.K.** Airborne influenza virus detection with four aerosol samplers using molecular and infectivity assays: considerations for a new infectious virus aerosol sampler // Indoor Air. 2009. V. 19. P. 433–441. doi.org/10.1111/j.1600-0668.2009.00609.x.
7. **Zuo Zh., Kuehn T.H., Verma H., Mor S.K., Goyal S.M., Appert J., Raynor P.C., Ge S., Pui D.Y.** Association of Airborne Virus Infectivity and Survivability with its Carrier Particle Size // Aerosol Science and Technology. 2013. V. 47. P. 373–382. doi.org/10.1080/02786826.2012.754841.
8. **Zhao Y., Aarnink A.J.A., Wang W., Fabri T., Groot Koerkamp P.W. and de Jong M.C.** Airborne virus sampling – efficiencies of samplers and their detection limits for infectious bursal disease virus (IBDV) // Ann Agric Environ Med 2014. V. 21. P. 464–471.
9. **Tseng C.C., Li C.S.** Collection efficiencies of aerosol samplers for virus-containing aerosols // J Aerosol Sci. 2005. V. 36. P. 593–607.
10. **Jaschhof H., Finke E.J., Herrmann B.** Detecting Airborne Influenza Virus A // Sartorius Stedim Biotech, 2009. Application Note No.: SM-4018-e09066.
11. **Jaschhof H.** Collection of Viruses and Phages with the Gelatin Membrane Filter Method // Sartorius Stedim Biotech, Application Note SLF4028-e04014.

ВНИМАНИЮ СПЕЦИАЛИСТОВ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДСТВ!

БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЕ ПРОИЗВОДСТВО. Разработка, проектирование и внедрение технологических процессов

Г. Ягшиш, Э. Линдског, К. Лаки, П. Галлихер

Перевод с англ. (2018, *Biopharmaceutical Processing. Development, Design, and Implementation of Manufacturing Processes*)

Под ред. Ишмухаметова А.А., Пятигорской Н.В.

2020 г., 2 тома, ок. 1500 с., цв.ил., табл., тв. пер., 210×270 мм

Цена – 9 500 р.

В уникальном издании рассматривается весь спектр биотехнологий от создания линии клеток до получения лекарственной субстанции. Описанные в нем методы и стратегии представляют собой сведения, необходимые для всех исследователей, инженеров-технологов и специалистов, занятых в области производства биофармацевтических препаратов и вакцин.

Целостность биопроцесса в конечном итоге определяет качество биотерапевтического препарата, и в настоящей книге подробно рассматриваются все стадии производства, включая все технологии, связанные с очисткой целевого продукта и процессом культивирования. Особое внимание уделено обширным экономическим аспектам с рекомендациями по уменьшению затрат и повышению эффективности. Приведены многочисленные данные, расчеты и руководства, что позволяет использовать издание в качестве незаменимого инструмента для исследователей и управленческих работников биофармацевтической отрасли. В специальных главах рассмотрены аналитические методы и вопросы регулирования.

Российскими авторами, сотрудниками регуляторных и ведущих научных учреждений (Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения (Росздравнадзор), Федерального научного центра исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН, кафедры промышленной фармации Первого Московского государственного медицинского университета имени И.М. Сеченова) добавлены главы, касающиеся аспектов обращения биопрепаратов в Российской Федерации и странах ЕАЭС; рассмотрены актуальные регуляторные требования к фармаконадзору и государственному контролю качества биологических препаратов, освещены принципы производства продукции на первичной культуре клеток, современные подходы к процессу лиофилизации, производство полиомиелитных вакцин, аспекты качества и безопасности биопрепаратов. Широкий круг рассматриваемых в данных главах вопросов делает издание особенно ценным для отечественных разработчиков и производителей биофармацевтических препаратов.

Издание не имеет российских аналогов и адресовано специалистам биофармацевтических производств - исследователям, биотехнологам, биоинженерам, разработчикам вакцин, биосубстанций и препаратов, руководителям и менеджерам, отвечающим за организацию, внедрение, безопасность и контроль качества, органам регулирования и надзора биофармацевтических производств, преподавателям и студентам профильного направления.

Оглавление

1. Здравоохранение и биофармацевтическая промышленность, препараты и процессы
2. Принципы и методы upstream-процессов (культивирования)
3. Процессы, принципы и методы выделения целевого продукта
4. Процессы очистки, принципы и методы
5. Оборудование для биопроизводства
6. Проектирование промышленного процесса
7. Проектирование и эксплуатация производственной площадки
8. Аналитические методы, регуляторные нормативы, аспекты качества и безопасности
9. Финансовое управление и стоимость процесса

www.epcprof.ru - заказ on-line и все книги издательства

по тел./факсу: +7 (812) 313-54-14

почтой по адресу: 190020, Санкт-Петербург, а/я 140

по электронной почте: shop@epcprof.ru, info@epcprof.ru