

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2021.6.10

# 动物布鲁氏菌病活疫苗生产环节 生物安全风险分析与对策

秦玉明,冯宇,蒋卉,彭小薇,许冠龙,朱良全,范学政,丁家波\*

(中国兽医药品监察所 国家/OIE 布鲁氏菌病参考实验室,北京 102600)

[收稿日期]2021-02-09 [文献标识码]A [文章编号]1002-1280(2021)06-0067-06[中图分类号]S852.61

**[摘要]** 布鲁氏菌病(布病)活疫苗是世界各国防控布病的重要生物资源,我国目前主要生产和应用的布病活疫苗为 S2 株、M5 株和 A19 株。生物安全是布病活疫苗生产过程中的必须优先考虑的重要环节,随着兽药 GMP(2020 年版)的实施,进一步规范布病活疫苗的生产与检验,防控生产环节中的生物安全风险,成为迫切需要研究和解决的突出问题。通过对布病活疫苗生产检验、设施维修维护、生产人员个人防护等环节的生物安全风险点进行分析,对布病活疫苗生产线提出改进建议,为相关企业动物布病活疫苗生产提供参考。

**[关键词]** 布鲁氏菌病活疫苗;兽药 GMP;生物安全;风险分析

## Prevention and Control of Biosafety Risk in the Production of Animal Brucellosis Live Vaccine

QIN Yu-ming, FENG Yu, JIANG Hui, PENG Xiao-wei, XU Guan-long,

ZHU Liang-quan, FAN Xue-zheng, DING Jia-bo\*

(National/OIE Reference Laboratory for Brucellosis, China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 102600, China)

**Abstract:** Brucellosis live vaccine is an important biological resource for the prevention and control of brucellosis in the world. At present, the main production and application of brucellosis live vaccine are S2 strain, M5 strain and A19 strain in China. Biosafety is an important priority in the production of live brucellosis vaccine. With the implementation of veterinary drug GMP (2020 version), it is urgent to standardize the production and inspection of brucellosis live vaccine, and prevent and control the biosafety risk in the production process. In order to put forward reasonable and standardized suggestions for the process improvement of brucellosis live vaccine, and provide reference for the production of animal brucellosis vaccine, the possible biosafety risk points in the production and inspection of brucellosis live vaccine, facility maintenance, production personnel protection and other links were analyzed.

**Key words:** brucellosis live vaccine; veterinary drug GMP; biosafety; risk analysis

基金项目:国家重点研发计划"牛羊重要疫病诊断与检测新技术研究"(2016YFD0500903)

作者简介:秦玉明,副研究员,从事兽药质量监督与管理及动物布鲁氏菌病诊断技术研究。

通讯作者:丁家波。E-mail: dingjiabo@126.com

布鲁氏菌病(布病)是一种由布鲁氏菌引起的慢性多器官损伤性人兽共患传染病,我国将其列为二类动物疫病<sup>[1]</sup>。我国是畜牧业大国,牛羊猪等家畜的饲养量位居世界首位。在给人民群众提供丰富肉蛋奶等动物产品的同时,也给动物疫病防控带来巨大挑战。近十年来,我国畜间和人间布病感染率居高不下,严重威胁畜牧业的发展和公共卫生事业,防控布病迫在眉睫。在布病流行的国家和地区,使用疫苗是一种必不可少且行之有效的方法。

目前我国生产的布病活疫苗主要有 S2 株、M5 株/M5-90 株、A19 株和 2020 年注册通过的 A19- $\Delta$ VirB12 株。2016 年,四川省一家兽用生物制品企业发生个别生产人员感染布鲁氏菌事件<sup>[2]</sup>。2019 年甘肃省兰州市布病抗体阳性聚集事件表明,兽用的布病弱毒活疫苗(S2 株)虽然感染人的风险较低,但在防控不到位和特殊环境条件下,仍会对生产疫苗的操作工人产生感染风险,威胁直接接触人员的身体健康。因此,农业农村部于 2020 年 1 月发布《农业农村部办公厅关于切实加强兽用布氏菌病活疫苗生产安全监管工作的通知》<sup>[3]</sup>,要求布病活疫苗生产企业加强管理,尤其需要对生产布病活疫苗的生产操作区域(厂房与设施、菌种繁殖及发酵培养、配苗与分装、冻干、轧盖、贴签与包装)使用的专用设备以及在生产与检验及其设备维护过程中存在的生物安全风险进行识别与评估,并在风险评估基础上需要采用有效的措施进行控制。在 2020 年 4 月颁布的新版《兽药 GMP 规范》及随后发布的《中华人民共和国农业农村部公告第 292 号》明确了新版《兽药 GMP 规范》中生物制品的相关要求<sup>[4-5]</sup>,对生产布病活疫苗企业的质量管理、厂房与设施、生产管理、验证与确认等进行规范。

本文对动物布病活疫苗的生产、检验、个人防护及环境监测管理等各环节中存在的主要生物风险进行识别,对易被忽视的主要生物安全风险点进行分析,并就如何加强生物安全风险防控进行论述,供兽药生产企业及地方药政管理部门监督检查时参考。

## 1 主要生物安全风险点

### 1.1 硬件设备与设施

1.1.1 发酵罐 布鲁氏菌活疫苗的生产首先需要通过发酵罐采取通气培养方式实现扩大繁殖。因此,发酵罐是布病活疫苗生产最为重要和生物安全风险最大的生产设备之一。在布鲁氏菌发酵培养过程中需要输入氧气和二氧化碳,同时还会产生废气。发酵罐内的菌液在不断搅拌过程中产生大量含有布鲁氏菌的气溶胶,会随着废气排出发酵罐外。发酵结束后,在对发酵罐进行在线原位灭菌(SIP)和在线清洗(CIP)中忽视对呼吸器灭菌效果验证,也存在一定风险。

1.1.2 密闭的分装、加塞、轧盖联动装置 发酵培养结束后的菌液经沉淀浓缩处理后就进行配苗与分装。布病活疫苗的分装、加塞、轧盖过程中除了要考虑避免环境中的微生物污染产品外,还要考虑分装过程中因敞口或者非密闭操作过程中产生的气溶胶给相关生产人员带来的感染风险。在轧盖过程中极少量压碎、压裂的疫苗瓶也会外包装生产区散播大量布鲁氏菌,在普通的开放的负压环境下,也给操作人员带来一定的生物安全风险。

1.1.3 冻干机 弱毒活疫苗需要经过冻干机的冷冻干燥过程。真空泵在冷冻干燥过程,疫苗瓶中升华的水蒸气必然携带存活的布鲁氏菌,直接排放就是对大气环境散毒。在冻干结束后,疫苗瓶外壁也会存留少量分装或者冻干过程中外溢到瓶壁上的布鲁氏菌,给随后轧盖、贴内标签的操作人员带来感染风险。

1.1.4 高效过滤器 根据 2020 年版《兽药 GMP 规范》和农业农村部相关规定,生产布病活疫苗车间涉及活菌的负压环境,需在排风口安装高效过滤器。高效过滤器性能好直接关系到车间内活菌排放风险。决定高效过滤器性能的主要是过滤效率和过滤阻力<sup>[6]</sup>。一旦其过滤效能未验证,或未及时发现滤膜破损,则可能直接向环境散毒。

1.1.5 活毒废水灭活罐 涉及活菌操作产生的废水都需要收集到密闭罐内进行无害化处理。在处

理过程中如果灭菌温度不够,或者灭菌温度没有维持到规定的灭活时间,或者在罐体上的温度压力等仪表出现数据漂移导致显示不准确,都有可能出 现灭活不彻底造成散毒风险。

**1.1.6 生物安全柜** 布鲁氏菌从扩繁菌种到半成品及成品检验都需要使用生物安全柜。一般,成品活菌计数都会在生物安全柜内进行。一旦企业为生产方便,将疫苗种子逐级扩繁和半成品检验就在车间内的超净工作台内进行,就会对操作人员带来暴露风险。此外,生物安全柜没有进行定期校验、沉降菌、风速等检测,其也无法确定对操作人员起到保护作用。

**1.1.7 负压独立隔离器(IVC)** 一般弱毒活疫苗的安全检验仅需要正压环境即可进行,但布病活疫苗成品安全检验必须使用负压的独立通风隔离器(IVC)。否则,小鼠体内增殖的布鲁氏菌可能随着粪便或者尿液排到 IVC 鼠笼内,随着空气排到环境中,对室内检验人员带来生物安全风险。安全检验结束后,如果没有先将 IVC 鼠笼原位消毒就移到清洁区外进行清洗和灭菌,也会散毒并造成清洗人员感染风险。

**1.1.8 正压呼吸头套、N95 口罩、眼罩等个人防护设备(PPE)** 在涉及到活菌菌种扩繁、发酵扩大培养、分装与轧盖、半成品检验、成品检验或者车间设备维护维修过程中,相关的操作人员都有可能遇到存留的或者意外溢出的少量布鲁氏菌。如果没有根据操作工序风险大小选择佩戴正压呼吸头套、N95 口罩、眼罩等适宜的个人防护设备(PPE),就可能造成人员感染风险。在重复使用正压呼吸头套或者其他防护设施后,一旦消毒效果不确实,也存在交叉感染的风险。

## 1.2 生产过程

**1.2.1 生产工艺确认与变更** 企业需要以农业农村部注册批准的工艺规程制定适合自身的布病活疫苗工艺规程。该工艺规程一经审批就不能随意变更,轻易变更其中的任何一项关键参数,都会对整个产品带来不确定性。比如,更换新灭菌设备,按照原有参数可能导致灭菌效果不

彻底;改变培养发酵一些参数,导致细菌生长曲线变动;改变培养方式,对产品质量产生不确定性风险。

**1.2.2 有菌区洁净级别的控制** 布病活疫苗在涉及到开口暴露的分装、冻干、加塞等生产过程中,很可能污染外源病微生物。因此,对相应的生产环境的洁净界别要进行严格控制,防止产品污染环境微生物,造成疫苗产品本身的安全性风险。

**1.2.3 清洁灭菌方法验证消毒剂配制及更换** 在布病疫苗整个生产、检验、设备检修及废弃物无害化处理过程中,都涉及到对病原微生物的灭菌处理。发酵罐灭菌温度维持不够,或者活毒废水灭活操作不合理,就会造成向环境散毒风险;日常清洁消毒擦拭的消毒液选择或者配制不对<sup>[7-8]</sup>,就无法实现对残留的病原菌的杀灭作用。

## 1.3 人员

**1.3.1 相关人员生物安全知识培训及效果评价** 布病活疫苗在生产、检验甚至设备维护与检修人员都有可能在工作中接触到布鲁氏菌活菌。尤其是布鲁氏菌疫苗株种子批制备人员、发酵罐操作人员,分装、轧盖与冻干人员,半成品与成品活菌计数、成品安全检验、高效过滤器更换与维修人员,如果未经岗位培训,或者培训效果不好,在正常工作中就会有感染风险。

**1.3.2 突发泄露事件的演练及环境监测** 前面都是正常生产、检验、或者维修时可能遇到的暴露风险,但实际生产过程中难免会遇到意外发生。比如隔离服在操作中意外破损,正压呼吸头套故障,贴标签发现破损疫苗瓶,高效过滤器泄露,负压车间出现正压情况,生物安全柜风速异常等等,都会对操作人员产生暴露风险。

## 2 应对措施

**2.1 加强对涉及活菌操作中主要设备风险点的管控**

**2.1.1 加强对发酵罐的管理** 对于发酵罐设置疏水型的呼吸阀并将排出气体严格进行无害化处理。在发酵后期,伴随氧气和二氧化碳气体的输入及搅拌喷出的气溶胶,需采取有效的气体与液体分离技

术,分别进行灭菌或者除菌措施。发酵结束后对罐体进行彻底的消毒灭菌时,要严格执行原位在线灭菌和在线清洁的操作规程,保护车间内人员免于布鲁氏菌暴露感染风险。

**2.1.2 采用分装、加塞、轧盖密封隔离系统** 农业农村部在 2020 年版《兽药 GMP 规范》中明确规定<sup>[4]</sup>,布病疫苗配制与分装等过程中要采用隔离操作技术,在密闭的系统进行活菌操作。因此,企业应该采用处于负压环境下的密封全自动灌、轧、消联动的生产设施,既保证产品不会被环境微生物污染,也可以防止疫苗在配制、分装、轧盖等过程中产生的气溶胶感染操作人员。

**2.1.3 重视冻干机的管控** 为防止冻干过程中将布鲁氏菌排放到大气中,必须将冻干机排放升华的水蒸气进行无害化处理后才能排放到大气环境中。在冻干结束后,还需要对冻干机箱体内的疫苗瓶外表面进行消毒,以防止外溢的少量残留的布鲁氏菌在贴内标签过程中带给操作人员的感染风险。现在,布病活疫苗在冻干结束出箱前会通过过氧化氢、臭氧等气体进行熏蒸或者喷洒不易挥发的对布鲁氏菌非常敏感的消毒液进行灭菌。这就需要验证熏蒸消毒对布病活疫苗保存期的影响。

**2.1.4 尤其要重视排风口高效过滤器维护** 在排风口的高效过滤器安装阻力监测仪就可以实现对检漏实时监测,防止生产过程中泄露的微生物污染大气环境。企业还要评估制定高效过滤器的更换制度,以避免生产过程中泄露概率的发生。在排风口采用专用的袋进袋出过滤箱(BIBO),也可以避免更换时箱体内气体与外界接触,BIBO 过滤箱上配有手套,还方便工作人员安全操作。

**2.1.5 注意生物安全柜、负压的独立通风隔离器(IVC)、活毒废水灭活罐等重要设备的验证或者校验** 对布病活疫苗生产、检验中使用的生物安全柜、独立通过隔离器以及活毒废水灭活罐的无害化处理等都需要进行验证或者校验。一般,生物安全柜 1 年校验一次,使用中随时注意吸入风速与垂直风速。必须使用负压独立通风隔离器(IVC),确保检验人员的安全。对 IVC 鼠笼原位消毒后,才能移动

到清洁区外。确认对灭活罐体内维持的温度及其持续时间,对温度表及其压力计进行定期验证,确保其灭菌效果。

**2.1.6 注意正压呼吸头套等个人防护设备的正确使用与维护** 根据布鲁氏菌感染人员的途径与感染形式的不同,在整个生产、检验等涉及活菌操作的人员防护中就需要针对性做好个人防护。在涉及到大量布鲁氏菌的繁殖、分装过程中,生产车间内的工作人员应该佩戴正压呼吸头套,结束后应及时对正压呼吸头套进行消毒以防止交叉污染。一般常用的 0.2% 苯扎溴铵溶液、0.1% 聚维酮碘溶液、戊二醛、癸甲溴铵、0.1% 聚维酮碘溶液<sup>[7-8]</sup> 或者 75% 酒精溶液灭菌效果较好。此外,最好能将正压呼吸头套置入密闭熏蒸柜内熏蒸消毒,以彻底杀灭内外表面残留的微量病原微生物。

**2.2 加强对生产工艺、关键参数的控制及消毒灭菌的验证**

**2.2.1 加强对生产工艺审批备案等管理,对关键参数进行验证** 2020 年版《兽药 GMP 规范》规定<sup>[4]</sup>,企业自己经过验证后制定的布病活疫苗生产工艺一旦审批通过,就不能轻易变更。如需变更,必须经过验证和生物安全风险评估,证明其对产品质量不会产生不良影响,且不会产生生物安全风险,将变更后的工艺到原审批单位进行备案。因此,布病活疫苗生产企业一定严格按照农业农村部审批的生产工艺规程<sup>[9-10]</sup> 制定经过自己验证的生产工艺,并严格按照申报审批的工艺规程进行生产与检验。

**2.2.2 做好洁净区域洁净级别的监测** 2020 年版《兽药 GMP 规范》规定应该对无菌生产过程进行动态检测,可以采用测定沉降菌和浮游菌的方式进行。一旦超标,就要对分离培养的细菌进行是否为布鲁氏菌鉴定,以及时发现生物安全风险,降低人员感染风险。由于单个沉降平皿需要暴露 4 h<sup>[5]</sup>,普通的培养基常因表面干裂影响分离效果,产生假阴性结果。为此,也可以采用同一位置使用多个平皿连续进行监测并累积计数的方法进行检测。对于操作活菌区域的人员还要进行隔离服及手套等

部位擦拭检测含菌量,以验证车间动态洁净级别。

**2.2.3 消毒及验证工作** 消毒及消毒效果验证主要根据布鲁氏菌的生物学特性及其对物理、化学等因素的抵抗力决定。根据布鲁氏菌对湿热的敏感性选择湿热灭菌对发酵罐进行消毒,采用高压灭菌对重复使用的衣物及耐高压的物品进行灭菌处理,采用擦拭消毒剂对操作台面进行消毒处理,采用气体熏蒸对密闭空间内灭菌消毒。不同消毒灭菌的方法也需要采用适宜的验证方法,对环境温度、溶液温度、消毒剂浓度/雾滴大小、作用时间、压力等重要参数对最终消毒效果的影响因素。

**2.3 加强对相关人员的培训及应急演练** 布鲁氏菌主要传染途径为消化道、眼结膜、破损的皮肤、呼吸道等途径<sup>[11]</sup>。所以,布病疫苗生产、检验及设施维护的人员要经过必要的专业知识培训,重点对正压呼吸头套、乳胶手套、N95 口罩等个人防护设备设施正确使用的培训以及正确配制消毒液与正确消毒操作及的培训。对密闭空间消毒时人员防护,布鲁氏菌泄露或者操作活菌人员出现利器刺伤时应急演练应该成为检验培训效果常态。

### 3 结 语

本文仅就布病疫苗生产、检验、维护中主要的生物安全风险点进行分析与梳理。在整个布病活疫苗生产过程中还有很多其他的风险点往往容易被大家忽视。因此,需要不断提高认识,杜绝在布病疫苗生产、检验中出现的泄露误判或者漏检等风险。

就布病疫苗生产企业而言,还需要对生产车间内外环境进行检测。在车间内,同时动态检测沉降菌<sup>[12]</sup>、浮游菌<sup>[13]</sup>、悬浮粒子<sup>[14]</sup>。在车间外,定期在周边树叶、地面等环境采样,分析散毒风险,并对相关人员进行抗体检测。根据 2020 年版《兽药 GMP 规范》附录 3<sup>[5]</sup>第 15 条和第 24 条的规定,布病疫苗生产区域可以根据风险评估的结果采用绝对负压或者相对负压,以确保生物安全风险。实际上,对车间生产状态下进行负压控制受很多因素影响<sup>[15]</sup>,比如在开门与闭门,不同区域功能压力波动瞬间干扰,送排风机机启动与关闭造成气流分配紊

乱等也会存在一定影响,需要对变频调节风速与风量系统进行验证与风险评估。

随着我国的布病疫苗生产企业的生物安全风险认识及控制水平不断提升,布病疫苗的质量管理水平必然得到进一步的提高。只有不断加强布病活疫苗生产工艺重要参数的验证,对生产检验各个环节制定详细的操作规程及其风险防控预案,才能持续提升兽药生产企业生物安全管控能力。

### 参考文献:

- [1] 农业农村部. 农业农村部公告第 1125 号[EB/OL]. [http://www.moa.gov.cn/gk/tzgg\\_1/gg/201006/t20100606\\_1535636.htm](http://www.moa.gov.cn/gk/tzgg_1/gg/201006/t20100606_1535636.htm).  
Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China. Announcement No. 1125 [EB/OL]. [http://www.moa.gov.cn/gk/tzgg\\_1/gg/201006/t20100606\\_1535636.htm](http://www.moa.gov.cn/gk/tzgg_1/gg/201006/t20100606_1535636.htm)
- [2] 杨媛,王琳,彭琦.一起动物疫苗生产引起的疑似职业性布鲁菌病案例分析[J]. 预防医学情报杂志, 2017, 33(11): 1091-1094.  
Yang Y, Wang L, Peng Q. With the analysis of suspected Brucellosis case of occupation[J]. Journal of Preventive Medicine Information, 2017, 33(11):1091-1094.
- [3] 农业农村部. 农办牧[2020]5号[EB/OL].  
Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China. Document [2020] No.5[EB/OL].
- [4] 中华人民共和国农业农村部. 中华人民共和国农业农村部部令第3号. 兽药生产质量管理规范[EB/OL]. [http://www.moa.gov.cn/gk/tzgg\\_1/bl/202004/t20200429\\_6342658.htm](http://www.moa.gov.cn/gk/tzgg_1/bl/202004/t20200429_6342658.htm) 2020.  
Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China. Decree No. 3 of the Ministry of Agriculture. Good Manufacturing Practice for Animal Drugs [EB/OL]. 2020. [http://www.moa.gov.cn/gk/tzgg\\_1/bl/202004/t20200429\\_6342658.htm](http://www.moa.gov.cn/gk/tzgg_1/bl/202004/t20200429_6342658.htm).
- [5] 农业农村部. 农业农村部公告第 292 号[EB/OL]. [http://www.moa.gov.cn/gk/tzgg\\_1/gg/202005/t20200513\\_6343760.htm](http://www.moa.gov.cn/gk/tzgg_1/gg/202005/t20200513_6343760.htm).  
Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China. Announcement No. 292 [EB/OL]. [http://www.moa.gov.cn/gk/tzgg\\_1/gg/202005/t20200513\\_6343760.htm](http://www.moa.gov.cn/gk/tzgg_1/gg/202005/t20200513_6343760.htm).
- [6] 曹国庆. 高效空气过滤器性能检测系统的研制与相关问题研究[D]. 天津大学, 2006.  
Cao G Q. Study on Performance Testing System of HEPA Filter

- and Some Relevant Issue [D]. Tian Jing University, 2006.
- [7] 冯宇, 王芳, 丁家波, 等. 常用消毒剂对布鲁氏菌疫苗株的灭菌效果评估[J/OL]. 微生物学通报;1-10. [2021-01-26]. <https://doi.org/10.13344/j.microbiol.china.200662>.
- Feng Y, Wang F, Ding J B, *et al.* Evaluation of common disinfectants with their sterilization effect on vaccinstrains of *Brucella* [J/OL]. *Microbiology China*;1-10. [2021-01-26]. <https://doi.org/10.13344/j.microbiol.china.200662>.
- [8] 董炳梅, 杨丽梅, 张含侠, 等. 猪种布鲁氏菌对 4 种常用新型消毒剂敏感性的研究[J]. 中国动物保健, 2017, 19(1): 74-78.
- Deng B M, Yang L M, Zhang H X, *et al.* Study on the sensitivity of *Brucella suis* to four new kinds of disinfectants[J]. *Chinese Journal of animal health*, 2017, 19(1):74-78.
- [9] 兽用生物制品规程委员会. 中华人民共和国兽用生物制品规程[M]. 化学工业出版社, 2000.
- Veterinary biological products Regulatory Committee. Regulations of the People's Republic of China on veterinary biological products [M]. Chemical Industry Press, 2015.
- [10] 农业农村部. 农业农村部公告第 315 号[EB/OL]. [http://www.moa.gov.cn/govpublic/xmsyj/202007/t20200721\\_6348993.htm](http://www.moa.gov.cn/govpublic/xmsyj/202007/t20200721_6348993.htm).
- Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China. Announcement No. 315 [EB/OL]. [http://www.moa.gov.cn/govpublic/xmsyj/202007/t20200721\\_6348993.htm](http://www.moa.gov.cn/govpublic/xmsyj/202007/t20200721_6348993.htm)
- [11] Corbel M. Brucellosis; an overview [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 1997, 3(2):213-221.
- [12] GB/T16294-2010. 医药工业洁净室(区)沉降菌的测试方法[S]. GB/T16294-2010. Test method for setting microbe in clean room (zone) of the pharmaceutical industry[S].
- [13] GB/T16293-2010. 医药工业洁净室(区)浮游菌的测试方法[S]. GB/T16293-2010. Test method for airborne microbe in clean room (zone) of the pharmaceutical industry[S].
- [14] GB/T16292-2010. 医药工业洁净室(区)悬浮粒子的测试方法[S]. GB/T16292-2010. Test method for airborne particles in clean room (zone) of the pharmaceutical industry[S].
- [15] 范志顺. 生物安全实验室负压环境控制研究及应用[D]. 武汉理工大学, 2005.
- Fan Z S. Research and application of the negative pressure of biosafety laboratory [D]. Wuhan University of Technology, 2005.

(编辑:李文平)