

# Микробиологический мониторинг

Статья опубликована в журнале *Cleanroom Technology*, v.8, ч 8, 2002, стр. 34-38 и воспроизводится с разрешения редакции ([www.cleanroom-technology.co.uk](http://www.cleanroom-technology.co.uk)).  
Перевод выполнен Семеновой Еленой (ООО «СКИФ Б.В.»)

**Петер Когер (компания PMT Partikel-Messtechnik AG) обсуждает тему частого, продолжительного или непрерывного микробиологического мониторинга в фармацевтической промышленности**



«необходимо проверять несколько кубических метров воздуха, чтобы получить достаточно точные и правильные результаты». Есть множество других моментов, которые нужно учитывать при обсуждении в свете GMP чистых помещений класса А, где требующее принятия мер микробиологическое загрязнение составляет 1 КОЕ. В новом, находящемся на стадии обсуждения стандарте ISO 14698 [4] также упоминается необходимость частого микробиологического мониторинга в рабочем состоянии, а в части 2 косвенно говорится о том, что частота мониторинга и объем проб должны обеспечивать достоверность получаемых данных. Действительно, «частота отбора проб зависит также от множества факторов, таких как тип производственного процесса или продукта, проект предприятия, степень вмешательства человека, а также от изменяющейся со временем микробиологической обстановки в окружающей среде. Не существует

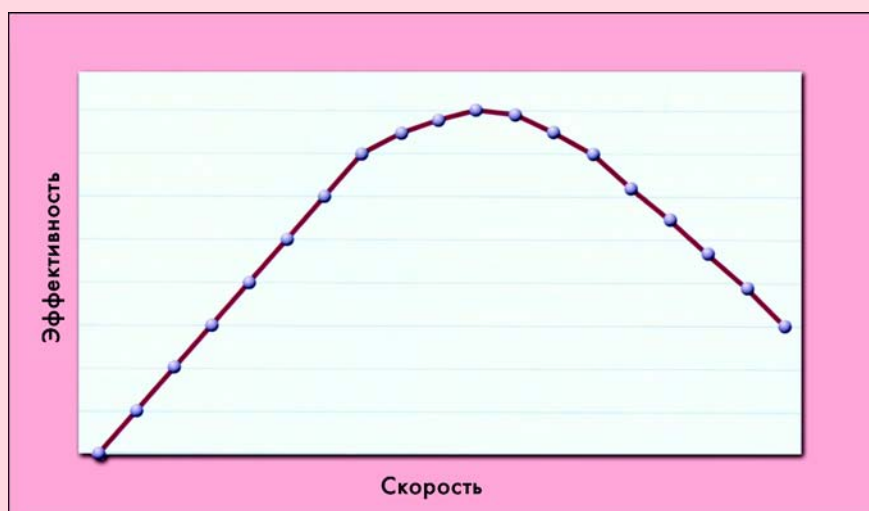
единой схемы отбора проб, которая подходила бы для всех случаев» [5].

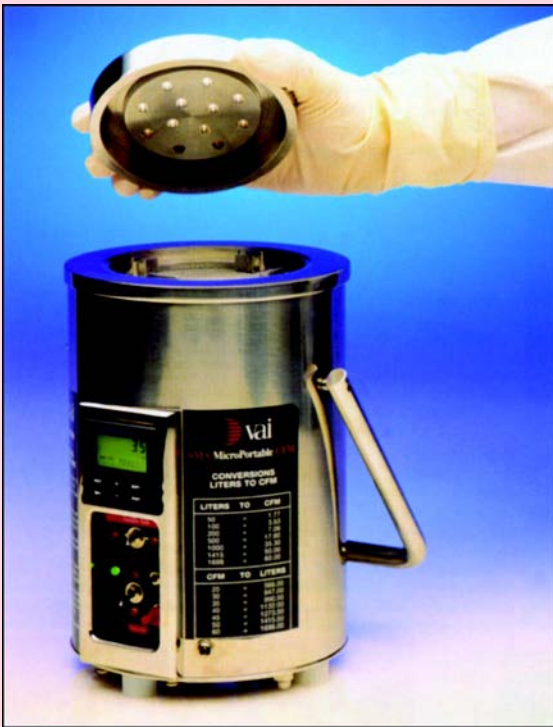
## Простое решение?

На фармацевтических производствах растет интерес к непрерывному мониторингу или к мониторингу больших объемов воздуха в течение более продолжительного времени в тех случаях, когда продолжительность производственного цикла приближается к трем или четырем часам. На первый взгляд, было бы логично увеличить частоту отбора проб во время производства, но, к сожалению, это отрицательно влияет на ситуацию: увеличение человеческого вмешательства при взятии большего числа отдельных проб повышает риск загрязнения. Неприемлемым решением является и усреднение данных нескольких проб за более короткий период времени. Таким образом, единственным выходом остается более продолжительный отбор проб. К сожалению, это также сопряжено с проблемами, такими как неудобство для отбирающего пробы и людей, находящихся в том же помещении, обезвоживание питательной среды, высыхание и гибель микроорганизмов, отобранных на начальном этапе сеанса мониторинга. Кроме того,

В соответствии с европейскими требованиями GMP для стерильных производств [1] (основанными на 91/356/ЕС и 91/412/ЕС) в зонах класса А микробиологический мониторинг необходимо проводить с большой частотой. Микробиологический мониторинг предполагает сочетание различных методов: расстановки чашек с питательной средой, активного отбора проб воздуха и взятия проб с поверхностей при помощи тампонов или контактных чашек. Мониторинг должен быть рутинной процедурой. В главе 1116 USP25 приводится график, в соответствии с которым в зонах класса 100 и вспомогательных зонах, непосредственно примыкающих к чистым помещениям класса 100, мониторинг должен проводиться «каждую рабочую смену» при объеме пробы воздуха не менее 1 м<sup>3</sup>. Кроме того, не говорится ли там о том, что желательно, чтобы объем пробы был больше 1 м<sup>3</sup>? Ведь в контролируемой среде в чистом помещении класса 100, которое в соответствии с Руководством FDA по стерильным лекарственным средствам называется критической зоной, и где допускается присутствие всего 1 КОЕ на 10 куб. футов (т.е. 3,5 КОЕ/м<sup>3</sup>) воздуха,

та мониторинга и объем проб должны обеспечивать достоверность получаемых данных. Действительно, «частота отбора проб зависит также от множества факторов, таких как тип производственного процесса или продукта, проект предприятия, степень вмешательства человека, а также от изменяющейся со временем микробиологической обстановки в окружающей среде. Не существует





все большее распространение изоляторных технологий также приносит в уравнение определенные проблемы.

### Как всегда, скорость ограничена...

Повышение скорости может отрицательно влиять на эффективность отбора проб в результате того, что при увеличении скорости воздуха увеличивается отскок и динамический отбор, особенно когда речь идет о более мелких частицах. В соответствии с выведенными в 19 веке уравнениями Навье-Стокса, молекулы воздуха отскакивают от поверхности среды, на которую осаждаются частицы, тем самым «отталкивая» мелкие частицы, которые в противном случае столкнулись бы с поверхностью. Этот эффект наиболее выражен при малых размерах частиц и возрастает с повышением скорости воздуха. Такое влияние в определенной мере характерно для любых приборов, основанных на соударении с поверхностью (*impaction instrument*). Увеличение скорости воздуха влияет также и на более крупные частицы, что может приводить к снижению эффективности. Поэтому для каждого размера частиц есть своя точка оптимального соотношения «скорость/эффективность».

Другим серьезным вопросом является обезвоживание питательной среды. В среде обитания любого живого организма должны присутствовать все вещества, необходимые для выработки энергии и клеточного биосинтеза. Точно так же, микроорганизмам для выживания и размножения нужно специфическое питание. Помимо химических соедине-

ний и элементов, важнейшее значение имеют такие факторы, как температура, кислород (его наличие или отсутствие) и вода. «Вода – это растворитель, в котором растворены молекулы жизни, и поэтому доступность воды является критическим фактором, влияющим на рост всех клеток. Доступность воды для клетки зависит от ее содержания в атмосфере (относительная влажность) или в растворе либо веществе (водная активность). Водная активность ( $A_w$ ) чистой  $H_2O$  равна 1,0 (100% воды). Микроорганизмы живут при  $A_w$  от 1,0 до 0,7» [6]. Это значит, что бактерии чрезвычайно чувствительны к количеству воды. Поэтому обезвоживание среды снижает выживаемость и рост собранных микроорганизмов. Результаты валидации чашечного пробоотборника Veltex SMA [7] однозначно подтверждают вышесказанное. В ходе проверки роста четырех штаммов микроорганизмов, а именно, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger* и *Candida albicans*, при разной продолжительности отбора проб была выявлена четкая зависимость между временем отбора пробы, объемом среды и скоростью воздуха. При использовании стандартной чашки Петри с 25 мл среды и объеме воздуха около 3 м<sup>3</sup> рост все еще был удовлетворительным. При увеличении объема среды до 32 мл, а объема пробы до 6 м<sup>3</sup> испытываемые организмы также демонстрировали удовлетворительный рост. При дальнейшем 15-минутном увеличении времени отбора, а, следовательно, и объема пробы, рост всех испытываемых организмов ухудшился. Роль играл не только объем среды, но и выбор ее поставщика. Некоторые среды в объеме 32 мл обеспечивали рост организмов при продолжительности отбора 3 часа (что соответствовало 6 м<sup>3</sup>), в то время как при использовании других сред пробу можно было отбирать в течение 4 часов. Испытания проводились при комнатной температуре (21°C) и 60% влажности, чашки иноку-

лировали после взятия пробы и инкубировали в течение 72 часов [6]. Влияние температуры и влажности в помещении было достаточно мало по сравнению с объемом и скоростью воздуха. Ускорение отбора пробы за счет увеличения скорости воздуха не приводило к улучшению результатов. Таким образом, увеличение скорости может отрицательно влиять на эффективность пробоотбора и приводить к обезвоживанию среды.

В части 1 проекта международного стандарта ISO 14698 говорится, что скорость соударения «должна 1) быть достаточно высокой, чтобы микроорганизмы увязали в среде примерно на 1 мкм, но 2) достаточно низкой, чтобы обеспечить выживание микроорганизмов, исключая механическое повреждение или разбивание групп бактерий или микромицетов» [8]. Поэтому чрезмерное увеличение скорости пробоотбора может уменьшать выживаемость микроорганизмов и потенциально снижать его эффективность.

При использовании фильтрующих пробоотборников не возникает проблем, связанных с обезвоживанием среды, но сохраняется риск механического повреждения микроорганизмов, кроме того, возникает опасность гибели бактерий в результате их непосредственного обезвоживания. Увеличение скорости также затрудняет работу лаборатории в связи со сложностью сбора с фильтра всех содержащихся в пробе микроорганизмов.

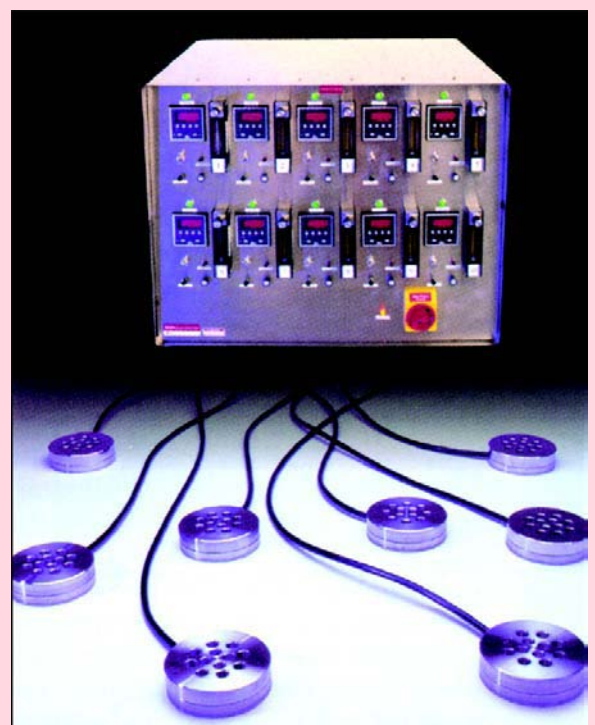
Увеличение времени

В тех случаях, когда увеличение продолжительности пробоотбора,

Увеличение времени

### Увеличение времени

В тех случаях, когда увеличение продолжительности пробоотбора,





## Таблица

25 мл среды, SMA-304-25-1/2		
90 минут	<i>Bacillus subtilis</i>	Хорошо
90 минут	<i>Escherichia coli</i>	Хорошо
90 минут	<i>Aspergillus niger</i>	Хорошо
90 минут	<i>Candida albicans</i>	Хорошо
120 минут	<i>Bacillus subtilis</i>	Плохо
120 минут	<i>Escherichia coli</i>	Плохо
120 минут	<i>Aspergillus niger</i>	Плохо
120 минут	<i>Candida albicans</i>	Плохо
32 мл среды, SMA-304-32-1/2		
150 минут	<i>Bacillus subtilis</i>	Хорошо
150 минут	<i>Escherichia coli</i>	Хорошо
150 минут	<i>Aspergillus niger</i>	Хорошо
150 минут	<i>Candida albicans</i>	Хорошо
180 минут	<i>Bacillus subtilis</i>	Хорошо
180 минут	<i>Escherichia coli</i>	Хорошо
180 минут	<i>Aspergillus niger</i>	Хорошо
180 минут	<i>Candida albicans</i>	Хорошо

технически и физически возможно, это связано с большими неудобствами при использовании распространенных ручных пробоотборников. Такие приборы часто имеют ограничения по продолжительности отбора и, следовательно, объему пробы. Некоторые из них не позволяют даже устанавливать большее время или объем. Часть подобных приборов приходится в буквальном смысле держать в руках, что само по себе очень неудобно при продолжительной работе. Кроме того, существует проблема ресурса батарей и необходимости их регулярной подзарядки. Шум, создаваемый вентиляторами и насосами пробоотборников, также может доставлять неудобство при продолжительной работе.

Как уже говорилось, увеличение продолжительности пробоотбора приводит к обезвоживанию среды и микроорганизмов.

### Изоляторы

Использование изоляторов связано с целым рядом практических проблем. Обычно они требуют систем, которые могут отбирать пробу извне, поскольку приборы в целом не очень хорошо переносят воздействие перекиси водорода при обработке в передаточных шлюзах. Кроме того, ограниченный размер изолятора диктует необходимость использования миниатюрных пробоотборников. Использование защитной оболочки для питательной среды, что часто бывает необходимо в изоляторах для защиты от перекиси водорода, также в определенной мере способствует обезвоживанию.

Со всеми вышеуказанными проблемами достаточно неплохо могут справиться многие существующие приборы. Предпочтение должно отдаваться системам, отличающимся простым или

«продвинутым» контролем цикла отбора пробы, практически не требующим вмешательства персонала и которые можно расположить поблизости или непосредственно в точке пробоотбора. Пробоотбор больших объемов воздуха в течение продолжительного времени при условии решения проблем, связанных с обезвоживанием, позволяет добиться высокой эффективности при взятии микробиологических проб воздуха с хорошей выживаемостью после сбора.

### Литература

1. EU Guide to Good Manufacturing Practice, Eudralex Volume 4, annex 1 Manufacture or Sterile Medicinal Products.
2. USP25, chapter 1116, Microbiological evaluation of clean rooms and other controlled environments.
3. Guideline on Sterile Drug Production Produced by Aseptic Processing June 1987, (reprinted June 1991).
4. Draft International Standard ISO/DIS 14698-1.2 Cleanrooms and associated environments – Biocontamination control – Part 2. Evaluation and interpretation of biocontamination data.
5. Technical report No. 13, Fundamentals of an Environmental Monitoring Program, PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology.
6. Nutrition and growth of bacteria, 2001 Kenneth Todar University of Wisconsin -Madison Department of Bacteriology K. Todar, University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology.
7. SMA Sterilizable Microbiological Atrium, 17,2001, Veltek Associates, Inc. Atrium Validation Report, Art Vellutato Jr.
8. Draft International Standard ISO/DIS 14698-1.2 Cleanrooms and associated environments – Biocontamination control – Part 1. General principles.



## Лаборатория наладки и аттестации ЗАО «ЭКОПРОЕКТ» предлагает услуги по:

- наладке систем кондиционирования, вентиляции, холодоснабжения и теплоснабжения;
- аттестации чистых помещений;
- обследованию систем вентиляции, кондиционирования, холодоснабжения и разработке технических мероприятий по повышению эффективности их работы;
- обследованию систем фильтровентиляции и разработке технических мероприятий по повышению класса чистоты помещений.

По всем интересующим вопросам обращаться к Спиридонову Валерию Григорьевичу

Тел/факс: (095) 484-7295, 483-2914, 484-7451, 485-2533