

# ОЦЕНКА ЗАГРЯЗНЕНИЯ ВОЗДУХА МИКРОЧАСТИЦАМИ С ПОМОЩЬЮ НОВЫХ МЕТОДОВ УСКОРЕННОГО МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Тим Сэндл, Клер Леви,  
Рейчл Роудз

Департамент микробиологии,  
«Bio Products Laboratory», Elstree,  
Соединенное Королевство

Статья опубликована в журнале «European Journal of Parenteral & Pharmaceutical Sciences»,  
№ 19 (4), 2014

Чистота комнат или зон, предназначенных для переодевания перед входом в чистые помещения, имеет очень большое значение, поскольку гарантирует, что среда, в которой происходит переодевание, и сам процесс переодевания не генерируют большого количества загрязнений, которые могут попадать в производственную зону. Кроме того, при переодевании необходимо избегать загрязнения внешней поверхности одежды для чистых помещений. Авторами было проведено исследование для оценки уровней загрязнения частицами воздушной среды в помещениях для переодевания. Исследование проводилось в различных условиях: в состоянии чистой комнаты «at-rest», т.е. без персонала; в эксплуатируемом режиме при различном количестве сотрудников; а также в состоянии чистой комнаты «post-use», т.е. после переодевания.

Для оценки загрязненности использовался новый метод ускоренного микробиологического анализа. Обычно для этой цели используются стандартные методы, предусматривающие применение питательной среды, однако такие методы требуют проведения инкубации продолжительностью в несколько дней. В настоящей статье описывается применение альтернативной системы мониторинга загрязнения в реальном времени (BioVigilant IMD-A® System), использующей технологию оптической спектроскопии. Согласно наблюдениям, сделанным авторами статьи, увеличение количества персонала, проходящего через комнату для переодевания, приводит к увеличению содержания биологически активных частиц в воздухе и периода времени, необходимого для восстановления требуемого уровня чистоты воздушной среды в этом помещении. Проведенное исследование наглядно демонстрирует эффективность метода ускоренного микробиологического анализа.

*Ключевые слова:* мониторинг окружающей среды, микробиология, методы ускоренного микробиологического анализа, подсчет частиц, микробиологический агар, спектрофотометрия, мониторинг в реальном времени, IMD-A®, жизнеспособные не поддающиеся культивированию микроорганизмы, чистые помещения, комнаты для переодевания.

## Введение

Чистые помещения представляют собой выгороженное производственное пространство, основной функцией которого является максимальное снижение количества генерируемых и переносимых загрязнений. Состояние окружающей

среды в чистых помещениях тщательно контролируется и регулируется международным стандартом ISO 14644-1:1999 [1]. В фармацевтической и биотехнологической отраслях основной проблемой является загрязнение воздушной среды микроорганизмами. Например, в случае производства нестерильной продукции (такой как крем или мазь) загрязнение достаточно большим количеством микроорганизмов может привести к порче продукта или нанесению вреда потребителю. В случае же стерильной продукции, особенно предназначенной для внутривенного введения, любое микробиологическое загрязнение связано уже с риском для здоровья пациента.

Наличие комплекса чистых помещений на фармацевтических предприятиях является необходимым условием надежной системы контроля окружающей среды, которая позволяет снизить количество образующихся частиц и микробиологических загрязнений. Подобные меры контроля также необходимы для предупреждения переноса загрязняющих частиц в критические зоны вместе с оборудованием или персоналом.

Вход персонала в чистое помещение с контролируемой средой осуществляется через специально спроектированные чистые зоны или комнаты, предназначенные для переодевания. В зависимости от уровня чистоты помещения, в которое должен в конечном итоге попасть персонал, процесс переодевания может включать один или два этапа. В случае чистых помещений, предназначенных для проведения асептической обработки продуктов медицинского назначения (т.е. процесса, требующего максимального уровня чистоты окружающей среды) переодевание происходит в два этапа. Именно такой подход использовался при проведении описываемого исследования. На первом этапе в первой зоне для переодевания сотрудники раздеваются до нательного белья и надевают нижнее белье из комплекта одежды для чистых помещений. После этого они перемещаются во вторую зону для переодевания, где надевают верхнюю защитную одежду, капюшоны, обувь, защитные маски, очки и перчатки. Одежда, используемая в чистых помещениях высокого класса чистоты, обычно является стерильной и одноразовой. Как правило, для ее изготовления используются специальные материалы. В качестве альтернативного варианта может использоваться очищенная многоразовая одежда. В этом случае каждый предмет одежды очищается, высушивается и стерилизуется гамма-излучением после

каждого использования. Основной проблемой, связанной с двухэтапным процессом переодевания, является образование частиц непосредственно в процессе одевания [2]. На фармацевтических предприятиях особое внимание уделяется микроорганизмам, находящимся в воздушной среде, поскольку они могут оседать на поверхности одежды для чистых помещений и таким образом попадать в критические зоны, где происходит обработка продукта. Персонал, на одежде которого находится большое количество микроорганизмов, представляет собой потенциальную угрозу как для продукта, так и для процесса.

Из зоны для переодевания микроорганизмы могут проникать в чистые помещения с поступающим воздушным потоком, с недостаточно качественно продезинфицированными объектами, нестерильной одеждой и персоналом [3]. Источником наибольшего количества микроорганизмов является персонал. После входа человека в помещение в воздух выделяются микробиологические частицы (обычно это частицы кожного покрова), которые, оседая на критически важных поверхностях, могут привести к загрязнению продукта. Для снижения вероятности такого загрязнения чистые помещения оснащены различными системами очистки и обработки воздуха. Поступающий в помещение воздух очищается, проходя через высокоэффективные воздушные HEPA-фильтры. Высокая кратность воздухообмена и эффективная модель турбулентного потока воздуха обеспечивают быстрое удаление находящихся в воздухе частиц, а изоляция менее критических зон от более критических посредством перепада давления препятствует перемещению частиц.

Комнаты для переодевания, в которых проводилось описываемое исследование, были оснащены HEPA-фильтрами класса H14 по стандарту EN 1822 и диффузорами турбулентной подачи воздуха. Кратность обмена воздуха в комнатах составляла 40 (что соответствует скорости воздушного потока 1330 литров в секунду). Кроме того, для предупреждения попадания загрязненного воздуха в чистое помещение давление в этом помещении было выше, чем в комнате для переодевания. Плохое техническое обслуживание HEPA-фильтров может отрицательно сказаться на чистоте воздуха – в зависимости от эффективности утвержденных процедур обслуживания, однако данный фактор не учитывался при проведении исследования (техническое состояние фильтров было предварительно проверено и признано удовлетворительным).

Контроль окружающей среды (посредством правильно спроектированных систем отопления, вентиляции и кондиционирования воздуха (HVAC); подходящей одежды для чистых помещений; и контроля поведения персонала) [4] имеет первоочередное значение, однако для определения уровня и тщательности этого контроля необходима надежная программа мониторинга окружающей среды [5, 6].

Основным элементом процесса мониторинга окружающей среды можно назвать отбор проб. Наибольшая часть микроорганизмов содержится в воздухе. Уровень связанного с ними риска зависит от количества присутствующих в воздухе микроорганизмов и вероятности их попадания в продукт вместе с воздухом или посредством оседания. Как правило, микробиологические загрязнения находятся в воздухе не в виде свободных микроорганизмов, а объединяются с другими загрязняющими частицами, такими как пыль или частицы кожи [7]. Однако в некоторых отчетах упоминается возможность объединения микроорганизмов в воздушном потоке в самостоятельные частицы большего размера [8].

Мониторинг окружающей среды позволяет получить важнейшую информации об изменении характера и уровня за-

грязнения воздуха микроорганизмами с течением времени, однако для его проведения обычно используются методы, основанные на анализе роста микроорганизмов. Такие методы предусматривают проведение инкубации отобранных проб микроорганизмов с применением питательной среды (агара) при определенной температуре в течение определенного периода времени. Продолжительность инкубационного периода может варьироваться в зависимости от имеющегося оборудования и условий, однако для получения значимых результатов необходимо не менее 2-х дней. Более того, в некоторых случаях (например, при использовании универсального агара или проведении двойной инкубации бактерий и грибов) требуется еще больше времени [9].

Ввиду различной длительности инкубации и, следовательно, периода, необходимого для получения ее результатов, большинство процессов, проводимых в чистых помещениях, осуществляются в условиях некоторой неопределенности, так как точная информация о среде чистого помещения на момент их проведения отсутствует. Косвенно контролировать среду позволяет измерение физических параметров, например, использование системы, сигнализирующей о малой разнице давления между помещениями. Также этому способствует сбор и анализ тенденций изменения, полученных ранее в результате мониторинга. Особенно сильно неопределенность проявляется в условиях значительной активности персонала. Примером такой активности может служить процесс, подробно рассматриваемый в данной статье, – переодевание персонала. Сколько человек может находиться одновременно в комнате для переодевания? Сколько времени необходимо для восстановления уровня ее чистоты? Зависит ли период восстановления от количества персонала в помещении или вида деятельности? Все эти вопросы имеют большое значение и подробно рассматриваются в статье.

В сочетании с методами анализа роста микроорганизмов могут применяться и методы подсчета частиц [10]. Основными недостатками стандартных методов подсчета частиц являются охват небольшого количества частиц, находящихся в чистом помещении, а также невозможность разделения частиц на «жизнеспособные» и «нежизнеспособные» с помощью стандартных оптических приборов (некоторыми авторами предпринимались попытки определения корреляции между этими двумя типами [11], однако определение универсального соотношения частиц невозможно из-за того, что их корреляция зависит от слишком большого числа факторов) [12]. Для устранения этих недостатков были разработаны методы ускоренного микробиологического мониторинга воздуха.

Одним из новейших методов ускоренного мониторинга является спектрофотометрия, позволяющая производить отбор проб твердых частиц и микроорганизмов [13]. Оптические счетчики частиц, созданные на основе данной технологии, позволяют одновременно определять размер и количество частиц, находящихся в определенном объеме воздуха, а также выявлять частицы, содержащие микроорганизмы и определять их количество [14]. Потенциальным преимуществом систем этого типа является возможность определения в пробах аэрозолей количества микроорганизмов, связанных с отдельной частицей, что обеспечивает непрерывный микробиологический анализ конкретного объема воздуха в реальном времени.

Другим преимуществом этих технологий является улучшенная регистрирующая способность и точность. Так как регистрация микроорганизмов не опирается на использование питательных сред, данные, относящиеся к микробиологической активности, вероятно, в лучшей степени пред-

ставляют воздух чистого помещения. Ограничение методов, основанных на использовании питательных сред, связано с так называемыми «жизнеспособными, но не культивируемыми» микроорганизмами, которые не растут на используемой питательной среде, однако сохраняют жизнеспособность и метаболическую активность [15]. Более того, существуют организмы, которые могут расти на данной питательной среде при одних условиях, но не будут расти в других условиях из-за стресса или полученных сублетальных повреждений.

Другим преимуществом таких альтернативных методов, помимо дифференциации биологической активности, является получение данных о степени загрязнения микроорганизмами образца в «реальном времени», что позволяет провести оценку рисков непосредственно в то самое время, когда такая активность имеет место. Другие преимущества, с точки зрения автоматизации, заключаются в том, что такие системы требуют меньшего вмешательства человека и менее субъективны при оценке результатов, т.е. позволяют снизить влияние человеческого фактора. Существуют также и некоторые недостатки подобных систем. Например, они могут обнаруживать молекулярные или аэрозольные загрязнения, не связанные с микроорганизмами.

Типичным представителем приборов для мониторинга микробиологического загрязнения в реальном времени является Azbil BioVigilant IMD-A®. Прибор IMD-A® отбирает, детектирует и подсчитывает частицы в размерном диапазоне 0,5–15 мкм. Он заключен в корпус из нержавеющей стали. Воздух при помощи насоса засасывается в прибор через изокINETический пробоотборник. Скорость отбора пробы системы составляет 28 л/мин. Основой системы является лазер. При прохождении частицы через лазерный луч в случае ее микробиологической природы появляется флуоресценция.

Таким образом осуществляется подсчет микроорганизмов – «био-отсчет» (bio-count).

«Био-отсчет» – это мера биологической активности, связанная с «подсчетом» микроорганизмов. Система способна подсчитывать бактерии как в вегетативном состоянии, так и в состоянии эндоспоры, а также грибки (дрожжи и плесень) [16]. При некоторых обстоятельствах два или более микроорганизма, проходящих через прибор, могут детектироваться как один отсчет. Производитель старается избежать этого при помощи большой скорости отбора пробы. На основании этого и случайного характера распределения микроорганизмов в воздушном потоке, ложные отсчеты маловероятны, но не могут быть исключены полностью. Таким образом, один «био-отсчет» нельзя рассматривать как точный эквивалент одного микроорганизма.

В данной статье описано исследование, проведенное для оценки уровней аэрозольного и биологического загрязнения в комнате для переодевания фармацевтического предприятия при помощи прибора IMD-A®. Работа преследовала перечисленные ниже цели:

- Определить изменения в уровне биологического загрязнения в зависимости от количества присутствующего в помещении персонала.
- Проследить за изменением уровня биологического загрязнения в зависимости от стадии переодевания.
- Оценить время, требуемое для возврата помещения в состояние, предшествовавшее началу активности, после ее завершения.
- Определить базис, с которым можно будет сравнивать последующие измерения.
- Оценить полезность нового скоростного микробиологического метода.

## Международная конференция

### Темы конференции:

- HVAC и чистые помещения
- Вода очищенная
- Вода для инъекций
- Чистый пар и SIP

### Организатор:

**favea**

Тел. (Россия): +7 499 550 68 30  
Тел. (Чехия): +420 222 265 407  
Эл. почта: [conf@gep-russia.ru](mailto:conf@gep-russia.ru)  
Интернет: [gep-russia.ru](http://gep-russia.ru)

**GEP-RUSSIA**  
Надлежащая инженерная практика  
**2015**  
Москва 23-24 сентября



[GEP-Russia.ru](http://GEP-Russia.ru)

### Информационная поддержка:

Новости GMP

Решения в технологии очистки воздуха

Чистые Помещения в технологическом здравоохранении

выглек

научно-производственный журнал РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ ОТРАСЛЬ PHARMACEUTICAL INDUSTRY REVIEW

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЕ ОБЩЕСТВО КАЗАХСТАНА

Фармацевтические технологии и упаковка Лекарство по GMP

PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY AND PACKAGING

Оценка активных действий персонала проводилась непрерывно, затем данные анализировались и делились на временные периоды. Основной целью была имитация реального рабочего периода комнаты для переодевания.

Для обычных измерений счетной концентрации частиц были приняты пределы для помещения класса В согласно EU GMP в состоянии помещения «функционирующее» (класс 7 по ISO 14644-1:1999) для частиц размером более 0,5 и 5,0 мкм. Следует заметить, что при использовании обычных счетчиков для измеряемых частиц часто используется термин «нежизнеспособные». Как нам кажется, это слово вводит в заблуждение, так как эти счетчики могут обнаруживать и те, и другие частицы, скорее, они не могут различить биологически активные и инертные частицы. Предельные концентрации указаны в таблице 1 [22].

**Таблица 1**  
Предельные концентрации для изучаемого помещения

Класс EU GMP	Максимально допустимая концентрация м <sup>3</sup>	
	0,5 мкм	5,0 мкм
В функционирующее	352 000	2 900

Так как методика новая, предельные значения для био-отчетов не задавались. Однако одной из поставленных целей было оценить уровень био-отчетов в отсутствие персонала и сравнить с результатами после завершения рабочей активности, чтобы определить возврат к норме. В качестве начального приближения было принято, что если различие био-отчетов между двумя периодами не более чем в 10 раз, эквивалентное состояние было достигнуто. Естественно, приемлемые уровни в процессе использования помещения были неизвестны, для этого потребуются профессиональная оценка, подкрепленная дополнительными исследованиями.

Обычный микробиологический мониторинг не проводится в виду того, что традиционно используемые пробоотборники имеют конструкционные ограничения, влияющие на их способность улавливать все микроорганизмы из воздуха. Даже если эти микроорганизмы будут задержаны, они могут быть повреждены или засушены, что помешает их прорастанию на агаровой питательной среде [23]. В виду сказанного выше было решено, что прямое сравнение таких пробоотборников и IMD-A® не имеет большого значения.

**Результаты**

Данные, собранные при различных условиях, были проанализированы и представлены в виде диаграмм и таблиц.

**Комната для переодевания до начала рабочей активности**

Для определения целевого уровня, соответствующего восстановлению параметров, были проведены измерения в отсутствие персонала в течение 20 мин. В таблице 2 представлены полученные результаты – среднее количество от-

четов в минуту, стандартное отклонение (как мера разброса значений) и максимальное полученное значение.

Согласно таблице 2 за рассматриваемый период времени количество нежизнеспособных частиц оставалось значительно ниже указанных в таблице 1 предельных значений (как средние, так и максимальные зафиксированные значения). Более того, разброс значений также относительно невелик (согласно стандартному отклонению).

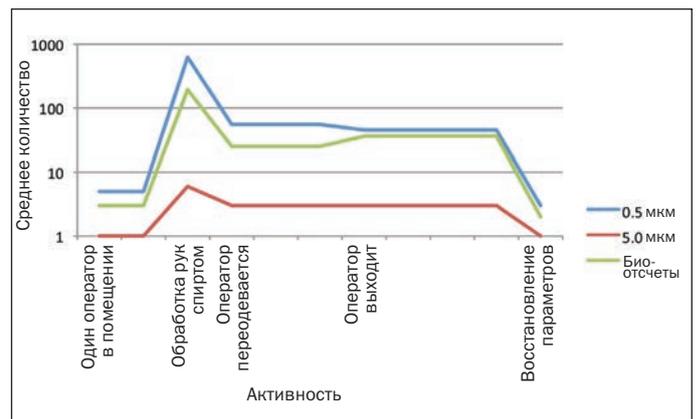
Для био-отчетов было получено среднее значение 2, причем максимальное значение составило 3. Эти данные показывают, что в помещении для переодевания нет жизнеспособных микроорганизмов в значительных количествах. Это неудивительно, учитывая, что в помещение поступает воздух через HEPA-фильтры с большой кратностью воздухообмена, более того, измерения проведены при отсутствии персонала.

Так как прибор IMD-A® представляет новый метод, и подобные измерения не проводились ранее, полученные результаты не с чем сравнить. Тем не менее, можно утверждать, что полученные био-отчеты относительно невысоки. Собранные данные представляют подходящую основу для последующего сравнительного анализа, приведенного ниже.

**Измерения для одного оператора, входящего, переодевающегося и выходящего из помещения**

После оценки состояния помещения в нерабочем режиме началась следующая фаза измерений. В течение этой фазы оператор должен был зайти в помещение, обработать руки 70%-ным раствором изопропилового спирта (в виде спрея), затем следовать стандартной процедуре переодевания и покинуть помещение. Чтобы продемонстрировать изменения контролируемых параметров, измерения были разбиты на ряд временных отрезков. Кроме того, было оценено время восстановления контролируемого параметра до исходного уровня, установленного в таблице 2. Концентрация частиц и био-отчеты на каждом этапе представлены в таблице 3.

Прибор фиксирует результаты раз в минуту, поэтому для этапов, длящихся 1 мин, среднее и максимальные значения параметров совпадают. Ключевые этапы представлены на



**Рис. 1.** Результаты измерений для помещения при переодевании одного оператора

**Таблица 2**  
Результаты измерений для помещения до начала рабочей активности

Время измерений	Состояние помещения	Среднее/мин			Стандартное откл.			Макс/мин		
		≥0,5 мкм	Био-отсчет	≥5,0 мкм	≥0,5 мкм	Био-отсчет	≥5,0 мкм	≥0,5 мкм	Био-отсчет	≥5,0 мкм
20 мин	Функционирующее	5	2	1	3	1	1	10	3	1

Таблица 3

Результаты измерений для помещения при переодевании одного оператора

Период времени	Вид активности	Среднее/мин			Стандартное откл.			Макс/мин		
		≥0,5 мкм	Био-отсчет	≥5,0 мкм	≥0,5 мкм	Био-отсчет	≥5,0 мкм	≥0,5 мкм	Био-отсчет	≥5,0 мкм
2 мин	Один оператор в помещении	5	3	1	3	1	1	9	5	1
1 мин	Оператор использует спирт для обработки рук	625	193	6	0	0	0	625	193	6
3 мин	Оператор переодевается	55	25	3	12	5	1	195	64	7
1 мин	Оператор выходит из помещения	45	36	3	0	0	0	45	36	3
4 мин	Возврат к исходным значениям	3	2	1	2	1	1	5	2	1

диаграмме рис.1 в виде зависимостей средних результатов от времени (для результатов измерений использовалась логарифмическая шкала).

Данные, представленные в таблице 3 и на рисунке 1 показывают, что вход оператора в помещение не сказывается в существенной степени на получаемых результатах, тогда как следующее действие – обработка рук спреем изопропилового спирта – дает наибольшие значения параметров за весь период измерений. После этого результаты несколько снизились, однако, пока оператор переодевался, как концентрация частиц, так и био-отсчеты находились на более высоком уровне, чем до входа оператора в помещение. После выхода оператора из помещения результаты стали снижаться дальше и приблизительно через 4 минуты вернулись на уровень исходных значений.

**Измерения последовательно для одного, двух и трех операторов в помещении**

Третья фаза измерений началась через 4 минуты перерыва. Два оператора зашли в помещение и следовали тем же этапам, что и один оператор согласно таблице 3. После того как первый оператор закончил переодеваться, вошел третий. Последовательность действий продолжалась, пока все три оператора не завершили переодевание. Результаты измерений по всем этапам представлены в таблице 4 и на диаграмме рис. 2.

Данные, представленные в таблице 4 и на рис. 2 показывают, что количество частиц и био-отсчеты для двух операторов выше, чем для одного, и увеличиваются еще больше, когда входит третий. Результаты увеличиваются снова, когда персонал занят переодеванием (однако здесь существуют

Таблица 4

Результаты измерений для помещения при переодевании одного оператора

Период времени	Вид активности	Среднее/мин			Стандартное откл.			Макс/мин		
		≥0,5 мкм	Био-отсчет	≥5,0 мкм	≥0,5 мкм	Био-отсчет	≥5,0 мкм	≥0,5 мкм	Био-отсчет	≥5,0 мкм
2 мин	Два оператора в помещении	56	22	3	12	8	2	141	48	8
1 мин	Оператор 1 использует спирт для обработки рук	821	274	42	0	0	0	821	274	42
3 мин	Оператор 1 переодевается, оператор 2 ждет	320	110	15	21	14	7	509	178	32
2 мин	Оператор 3 входит в помещение	167	93	27	24	35	13	293	159	35
1 мин	Оператор 1 уходит	798	77	155	0	0	0	798	77	155
4 мин	Оператор 2 переодевается, оператор 3 ждет	790	78	120	14	19	18	1098	117	193
1 мин	Оператор 2 уходит	172	13	27	0	0	0	172	13	27
3 мин	Оператор 3 переодевается	350	98	2	12	14	2	435	137	5
1 мин	Оператор 3 уходит	32	8	31	0	0	0	32	8	31
6 мин	Возврат к исходным значениям	1	1	1	1	1	1	2	2	1

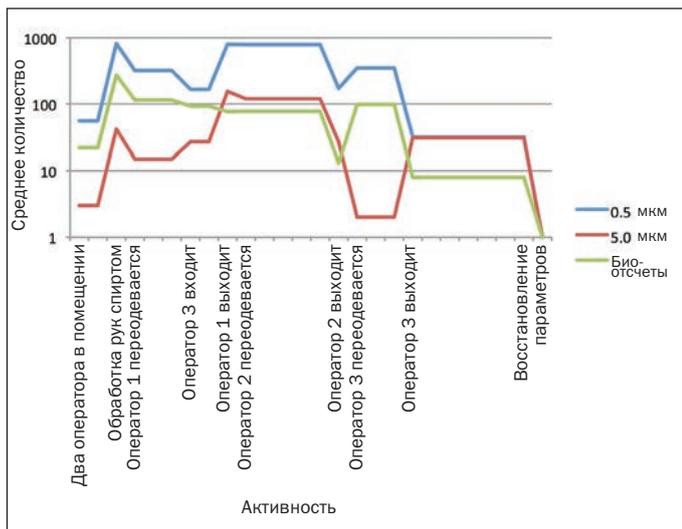


Рис. 2. Результаты измерений для помещения при переодевании до трех операторов

вариации, если сравнивать с рис. 3 ниже). По мере выхода персонала из помещения уровни измеряемых величин падают, пока в присутствии одного оператора не становятся близки к показанным в таблице 3 для одного оператора.

Второй вывод, сделанный на основании таблицы 4, заключается в том, что при обработке рук спиртом получаются сходные результаты как и для одного оператора. Третий вывод относится ко времени восстановления, увеличившемуся до 6 мин.

Другой интересный момент – пик продолжительностью 1 мин, когда оператор 1 покидает помещение (оставляя в помещении двух человек). Согласно наблюдениям, достигнутый уровень результатов сохраняется на следующий четырехминутный период переодевания оператора 2, пока оператор 3 ждет. В связи с этим возникает вопрос, связано ли это с увеличившимся количеством человек в помещении или показывает, что загрязнения не удаляются из помещения достаточно быстро (здесь часто используют термины «скорость восстановления» или «время восстановления»).

Таблица 5

Результаты измерений для оператора разворачивающего упаковки с расходными материалами

Период времени	Вид активности	Среднее/мин			Стандартное откл.			Макс/мин		
		≥0,5 мкм	Био-отсчет	≥5,0 мкм	≥0,5 мкм	Био-отсчет	≥5,0 мкм	≥0,5 мкм	Био-отсчет	≥5,0 мкм
1 мин	Оператор входит в помещение	20	5	1	0	0	0	20	5	1
1 мин	Оператор обрабатывает расходные материалы спиртом	1 698	512	19	0	0	0	1 698	512	19
3 мин	Оператор снимает внешнюю упаковку	320	110	15	21	14	7	556	207	5
3 мин	Оператор переодевается	44	3	1	7	2	1	77	5	2
1 мин	Оператор выходит из помещения	231	122	22	0	0	0	231	122	22
3 мин	Возврат к исходным значениям	6	4	1	1	1	1	8	5	1

### Измерения для одного оператора в помещении, разворачивающего упаковки с расходными материалами для чистых помещений и дезинфицирующего их

В третьей фазе измерений присутствовавший в помещении один оператор занимался разворачиванием расходных материалов и обработкой их спреем изопропилового спирта перед передачей на участок производства. Процедура включала в себя обработку внешней упаковки и извлечение внутренней упаковки с расходными материалами. В качестве расходных материалов использовались пробоотборные головки, стерильные салфетки и микробиологическая питательная среда. Полученные результаты измерений представлены в таблице 5 и на диаграмме рис. 3.

Согласно таблице 5 и рис.3 вход оператора в помещение сопровождается незначительным повышением концентрации частиц и био-отчетов (аналогично данным таблицы 2). Однако во время обработки упаковок раствором спирта получаемые результаты заметно возросли. При этом наблюдается больший уровень концентрации частиц и био-отчетов по сравнению с аналогичными данными, приведенными в таблицах 3 и 4. Это связано с тем, что предыдущие данные были получены во время обработки операторами рук,

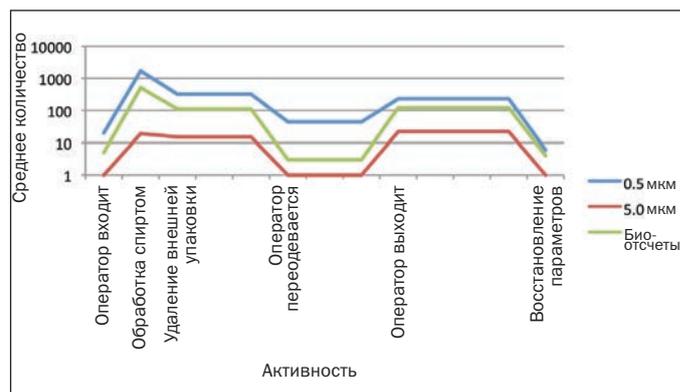


Рис. 3. Результаты измерений для помещения с одним оператором, разворачивающим упаковки с расходными материалами

в то время как данные таблицы 5 соответствуют обработке оператором упаковок с расходными материалами, во время которой используется большее количество дезинфектанта на большей площади. Далее, когда оператор снимал внешнюю упаковку, также регистрировались более высокие результаты. После завершения обработки и распаковки произошло довольно быстрое снижение значений. В процессе переодевания и после выхода оператора наблюдаемые значения были даже меньше, чем для одного оператора согласно таблице 2 и рис. 1. Однако время восстановления до исходных значений оказалось сходным с отмеченным в таблице 2.

### Обсуждение результатов

Собранные и представленные в виде таблиц и диаграмм данные несут интересную информацию об уровнях концентрации частиц в помещениях для переодевания. Во-первых, помещение для переодевания как работающее чистое помещение в отсутствие персонала, имеет низкие концентрации частиц и минимальную биологическую активность (как показано в таблице 2). Таким образом, согласно проведенному исследованию, помещение соответствует предъявляемым к нему требованиям. Во-вторых, существенным источником загрязнений является человек, что видно по таблице 2, исходя из уровней концентрации частиц и био-отсчетов при появлении первого оператора в помещении. В-третьих, появление в помещении еще одного или более человек приводит к возрастанию результатов (возможные причины такого возрастания являются предметом обсуждения ниже).

В-четвертых, большая часть частиц в контролируемой среде, где присутствует персонал, имеет биологическую природу, и, при рассмотрении при помощи спектрофотометрического оборудования, скорее всего, также микробиологическую. В-пятых, по прошествии определенного периода времени нормально функционирующая контролируемая среда возвращается в состояние с низким количеством как инертных, так и биологических частиц. Конкретное время восстановления параметров зависит от проводимых работ и количества присутствующего персонала. При этом количество персонала влияет на время восстановления в большей степени, чем вид производимых работ (распаковка или использование дезинфектанта в виде спрея). Представленные наблюдения обсуждены более подробно ниже в соответствии с обработанными данными.

Если рассматривать измерения для одного оператора в помещении согласно таблице 3, появление оператора в помещении не вызывает значительных событий биологической природы. Вероятно, это связано с тем, что оператор заходит из помещения, в котором происходит первая стадия переодевания, где его обдувает чистый воздух и он надевает специальную технологическую одежду. Более того, оператор движется медленно и не выполняет каких либо действий.

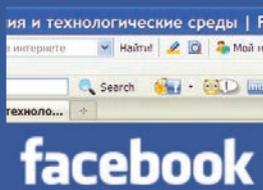
Следующее действие этого оператора – обработка рук 70%-ным раствором изопропилового спирта в виде спрея – приводит к регистрации самого высокого уровня частиц за всю фазу. Аналогичные данные получены для трех операторов в помещении и при обработке упаковок с расходными материалами (согласно таблицам 3 и 4). Проблема, связанная с аэрозолями дезинфектанта, рассматривается ниже в связи с оценкой прибора IMD-A®.

Данные таблицы 3 показывают, что после завершения использования раствора спирта уровни концентрации частиц и био-отсчетов снижаются, но остаются на определенном уровне выше базовых значений, пока оператор переодевается в спецодежду. После того как оператор вышел из помещения, уровень концентрации частиц снизился, однако уровень био-отсчетов изменялся в меньшей степени, что указывает на микробиологическую активность, связанную, возможно, с отшелушиванием частичек кожи. Причиной получения таких результатов в течение некоторого времени предположительно является зависание частиц в воздушном потоке на несколько минут.

Время, затраченное на восстановление параметров чистоты воздушной среды до уровня исходных значений (после того как оператор вышел из помещения), составило 4 мин. Таким образом, если во время переодевания возникают вызывающие опасения уровни загрязнений, необходим промежуток в 4 мин между периодами использования помещения (т.е. ни один оператор не должен заходить в помещение для переодевания, пока не истечет указанный промежуток времени). Согласно таблице 4, это время нужно увеличить до 6 мин, если операторов несколько. Эти периоды восстановления до некоторой степени подобны. Хотя вариации результатов измерений наблюдаются, время восстановления при изменении количества персонала изменяется незначительно, например 3 и 4 минуты для одного оператора (таблицы 3 и 5) и 6 минут после использования помещения тремя операторами (таблица 4).

В присутствии нескольких операторов результаты измерений выше. Результаты изменяются пропорционально при переходе от одного оператора к двум (и также наблюдалось повышение, когда к двум операторам присоединился третий). Из приведенного анализа неясно, связано ли это напрямую с количеством персонала, или является отражением постепенного накопления загрязнений. Более того, плато ближе к концу диаграммы на рис. 2 и 3 может быть несколько растянутым из-за минутного интервала между получением результатов.

Полученные данные либо указывают на то, что персонал является основным источником взвешенных загрязнений (при условии, что помещение для переодевания функционирует в соответствии с заданными параметрами), либо, что



## Присоединяйтесь к нам в Facebook!

Наш журнал стал участником одной из наиболее популярных социальных сетей. Для наших читателей это хорошая возможность для профессионального знакомства и общения. Новости, фоторепортажи, вопросы и ответы, комментарии – все это объединяет специалистов и, в итоге, помогает ответить на многие вопросы, установить партнерские отношения.

<http://www.facebook.com/cleanrooms.ru>





загрязнения поступают из других источников – от разворачиваемой одежды или при использовании дезинфектантов. Каков бы ни был источник, и это должно стать предметом дальнейшего исследования, схема повторяется, когда первый оператор переодевается, а второй ждет. Также наблюдается увеличение результатов, когда заходит третий оператор, по сравнению с отрезком времени в начале измерения, когда два оператора заходили в помещение.

Суммарный эффект присутствия трех человек в помещении наиболее заметен, когда первый оператор вышел из помещения, а второй сразу же начал переодеваться (периода восстановления между уходом первого оператора и переодеванием второго не было). Сходный эффект, хотя и в меньшей степени, наблюдался и когда второй оператор выходит из помещения, а третий начинает переодеваться. Согласно данным, представленным в таблице 4, кажется вполне вероятным, что чем большее количество человек находится в помещении, тем выше получаемые результаты. Альтернативной возможностью является зависимость результатов скорее от типа производимых действий, чем от количества персонала (данные таблицы 5 показывают, что даже один оператор, использующий раствор спирта, может привести к генерации высокого уровня частиц).

Другой интересный аспект виден при сравнении данных таблиц 5 и 3. В обоих случаях в помещении находится один оператор. Однако, согласно данным таблицы 5, в измерениях при переодевании полученные результаты находились на другом уровне (результаты в таблице 5 ниже). Это может быть связано с неравномерностью в работе вентиляционной системы; вариациями применяемых персоналом процедур или с вариациями и природой выполняемых действий. Так как проводилась регулярная проверка параметров чистого помещения, маловероятно, что результаты связаны с нестабильной работой вентиляции. Вполне вероятно, что разные предметы одежды генерируют разное количество частиц или персонал с разной степенью квалификации выполняет процедуры переодевания.

Хотя для био-отсчетов наблюдается более заметное снижение, чем для частиц, наблюдения показывают, что, учитывая уровень био-отсчетов, возможно разумным решением будет ввести некоторую задержку между процедурами переодевания операторов (или, по крайней мере, провести дальнейшие исследования, чтобы установить насколько существенной является проблема). Интересные данные можно получить, изменяя периоды восстановления между процедурами переодевания операторов.

В случае эксперимента с расходными материалами (таблица 5), уровни концентрации частиц, когда оператор заходит в помещение, эквивалентны данным в таблице 2 (также невысоки). Когда оператор начинает использовать раствор спирта, наблюдается существенное повышение концентрации частиц и био-отсчетов. Сходная тенденция наблюдается каждый раз и в других случаях использования дезинфектанта. Существуют, однако, и некоторые различия при применении раствора спирта. Так, результаты в таблице 5 значительно выше, чем в таблицах 3 и 4, например, для частиц 0,5 мкм полученный результат 1 698, тогда как предыдущие результаты находятся на уровне 800 и 600.

На следующей стадии, когда оператор разворачивает упаковки, также генерируется относительно высокое количество частиц. Разворачивание упаковок подразумевает физическую активность со стороны оператора, включающую быстрые движения руками, в результате чего концентрация частиц остается на высоком уровне. Маловероятно, что био-

отсчеты связаны с упаковкой (учитывая, что упаковочные материалы производятся из специальной пластмассы для чистых помещений, подвергнутой облучению); логично предположить, что физическая активность оператора привела к попаданию в воздух частичек кожи, и некоторая часть таких частиц может нести микробы. Из полученных данных можно сделать вывод, что переодевание второго оператора, пока первый разворачивает упаковки, несет риск внесения загрязнений.

После завершения распаковки результаты быстро снижаются, и следующие действия оператора (переодевание и выход из помещения) дают результаты, сравнимые с полученными для одного оператора в помещении согласно таблице 2. Здесь чистое помещение также возвращается к исходному состоянию за сравнимое время (3 минуты в данном случае и 4 минуты при переодевании одного оператора, как показано в таблице 2).

Возвращаясь к рассматриваемому ускоренному микробиологическому методу, исследование показало, что прибор IMD-A® может детектировать, определять размерность и подсчитывать частицы в процессе непрерывного отбора проб, и, кроме того, прибор может определять биологическую или небактериальную природу измеряемых частиц. Таким образом, можно получить меру свободно парящих и прикрепленных к инертным частицам микроорганизмов.

Существует требующий рассмотрения аспект, связанный с неопределенностью измерений. В рамках данной работы – это увеличение био-отсчетов при использовании спрея изопропилового спирта. Генерация большого количества частиц размером 0,5 мкм и выше при распылении спрея не вызывает удивления (влияние дезинфектантов на уровень концентрации частиц изучался ранее [24]). Более интересно то, что число био-отсчетов также увеличилось, показывая, что прибор чувствителен к каплям изопропилового спирта. Существует три возможных источника этих отсчетов: микроорганизмы вносятся оператором, спрей спирта вызывает автофлуоресценцию в спектрофотометрическом приборе, изолированные микроорганизмы. Некоторые исследования предполагают, что часть генерируемых частиц неотличима от «биологических» частиц [25]. Это может быть связано с тем, что, хотя изопропиловый спирт специально фильтруется и стерилизован, он может содержать мертвые микроорганизмы, остатки метаболитов которых приводят к появлению отсчетов. Это явление не отрицает возможности прибора по оценке микробиологического риска при различных действиях. Однако, подобные результаты означают, что требуются дополнительные исследования, позволяющие определить базовые значения так, чтобы события биологической природы, связанные с микроорганизмами, источником которых является персонал, могут быть отделены от эффектов, связанных с изопропиловым спиртом, и соответственно оценены. Одной из возможностей в ходе дальнейших исследований может быть использование дезинфектантов на гелевой основе, применяемых контролируемым образом через дозатор.

В любом исследовании, связанном с новой технологией, всегда существует некоторая неопределенность в полученных результатах. В случае био-отсчетов связь с реальным количеством микроорганизмов не может быть показана напрямую. Частично это связано с тем, что невозможно точно определить количество микроорганизмов в чистом помещении и какая часть из них не определяется традиционными методами. Другая сложность при сравнении разных методологий связана с тем, что любые два прибора будут отбирать

## Комментарий к данной статье

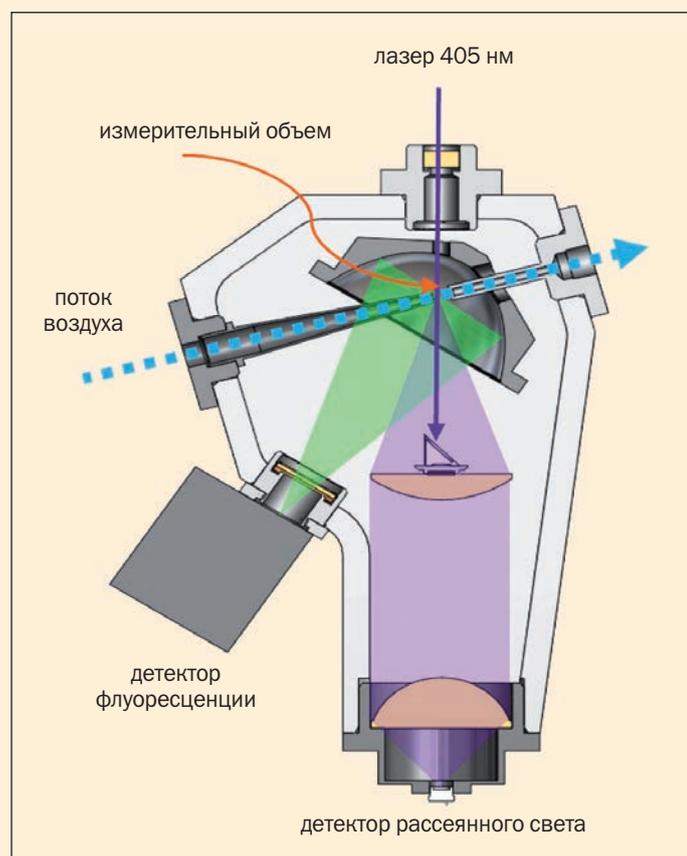
Тим Сэндл, один из авторов этой статьи, хорошо знаком нашим читателям. Он прекрасный экспериментатор, и его работы на протяжении десятилетий вносят неоценимый вклад в развитие контроля микрозагрязнений. Но не всегда полученные результаты удается интерпретировать однозначно, что ни в коей мере не умаляет их ценности. Они позволяют задуматься и двигаться дальше.

Данная публикация ставит перед специалистами, эксплуатирующими чистые помещения, и ряд вопросов, поэтому наш зам. Главного редактора В.И. Калечиц, управляющий директор группы компаний «Клинтрум Инструментс» и ведущий специалист по контролю параметров чистых производственных помещений, предложил свой комментарий к статье.

Попытки создать счетчики частиц, которые в реальном масштабе времени могли бы отличать нежизнеспособные частицы от микроорганизмов, предпринимаются уже довольно давно, несколько десятилетий. Некоторые из таких приборов, в том числе и IMD-A, использованный в изложенных в статье экспериментах, выпускаются серийно. Поскольку авторами статьи принцип его работы описывается только вскользь, сделаем небольшое пояснение.

В основе всех счетчиков частиц, которые уже в момент измерения могут отличить жизнеспособную частицу от «нейтральной», лежит явление флуоресценции. Лазерное излучение, падающее на микроорганизм, переизлучается им на другой, большей длине волны. В то же время свет, попавший на нейтральную, нежизнеспособную частицу, рассеивается упруго, то есть без изменения длины волны излучения.

Принцип флуоресценции использован и в приборе IMD-A, оптическая схема которого представлена на рисунке. Поток воздуха, содержащий частицы, проходит через луч лазера,



разные пробы воздуха (в которых распределение микроорганизмов отличается от нормального). Более того, приборы будут иметь различные диапазоны, разную калибровку (эффективность отбора) и определять микробиологическую активность разными средствами [25].

Таким образом, при использовании прибора IMD-A® уровни микроорганизмов могут оцениваться только как «низкие» и «высокие», в зависимости от биологической активности. Это не представляется серьезной потерей в понимании ситуации, так как традиционные методы мониторинга также имеют свою степень неопределенности. Более того, учитывая, что спектрофотометрические методы позволяют проводить непрерывный мониторинг, такие приборы как IMD-A®, вероятно, обеспечивают большую надежность. Для сравнительного анализа можно использовать камеру с биоаэрозолями и смешанный набор микроорганизмов, однако такая ситуация будет в некоторой мере искусственной, тогда как для большинства пользователей чистых помещений интересна возможность применения прибора *in situ* (попытка, предпринятая в данном исследовании).

Другим ограничением является отсутствие информации о типах микроорганизмов, к которым относятся био-отсчеты. Это было не очень важно в случае данного исследования. Тем не менее, в большинстве случаев микробиолог должен знать природу микроорганизмов, поэтому, в настоящее время, маловероятно, что технология мониторинга в реальном времени полностью заменит традиционные методы.

В заключение, в рамках данного исследования и рассмотренных ограничений можно сказать, что прибор IMD-A® позволяет получить представление об изменении условий в помещении и позволяет произвести сравнение для различного количества персонала и различных действий. Полученные данные показывают, что должны существовать ограничения по количеству людей одновременно использующих помещение, а также установлены периоды для восстановления параметров. Прибор IMD-A® может быть использован для оценки рисков и необходимости такого контроля в целях снижения био-отчетов и концентрации частиц до приемлемых уровней. Более того, возможность получения результатов в реальном времени позволяет принять необходимые решения достаточно быстро.

**Благодарность**

Авторы хотели бы поблагодарить компании BioVigilant и Technopath за возможность использовать прибор IMD-A® и помощь при проведении исследований. Данная статья была написана независимо от этих компаний.

**Справочные материалы**

1. International Organization for Standardization. ISO 14644-1:1999. Cleanrooms and Associated Controlled Environments. Part 1: Classification of Air Cleanliness. Geneva, Switzerland: ISO; 1 May 1999.
2. Hallworth M. Monitoring of Nonviable Particles In: Validation of Pharmaceutical Processes, Third Edition. Agalloco JP, Carleton FJ, Eds. Boca Ranton, FL, USA: CRC Press; 2013, pp. 339–355.
3. Halls N. Microbiological Contamination Control in Pharmaceutical Clean Rooms. Boca Ranton, FL, USA: CRC Press; 2010, p. 12.
4. Sandle T, Saghee MR. Cleanroom certification and ongoing compliance. In: Cleanroom Management in Pharmaceuticals and Healthcare. Sandle T, Saghee MR, Eds. Passfield, UK: Euromed Communications; 2013, pp. 169–184.

5. Moldenhauer J. Environmental monitoring. In: *Microbiology in Pharmaceutical Manufacturing*. Prince R, Ed. Bethesda, MD, USA: Parenteral Drug Association; 2008, pp. 19–92.
6. Sandle T. Environmental Monitoring: a practical approach. In: *Environmental Monitoring: a Comprehensive Handbook, Volume 6*. Moldenhauer J, Ed. River Grove, USA: PDA/DHI; 2012, pp. 29–54.
7. Whyte W, Hejab M. Dispersion of particles and microorganisms from people. *EJPPS*2007;12(2):39–46.
8. Tham KW, Zuraimi MS. Size relationship between airborne viable bacteria and particles in a controlled indoor environment study. *Indoor Air*2005;15(Supplement 9):48–57.
9. Arduino MJ, Bland LA, Agüero SM, Favero MS. Effects of incubation time and temperature on microbiologic sampling procedures for hemodialysis fluids. *J Clin Microbiol* 1991;29(7):1462–1465.
10. Li C-S, Hou P-A. Bioaerosol characteristics in hospital clean rooms. *Sci Total Environ*2003;305(1–3):169–176.
11. Raval JS, Koch E, Donnenberg AD. Real-time monitoring of non-viable airborne particles correlates with airborne colonies and represents an acceptable surrogate for daily assessment of cell-processing cleanroom performance. *Cytotherapy* 2012;14(9):1144–1150.
12. Oxborrow GS, Fields ND, Puleo JR, Herring CM. Quantitative relationship between airborne viable and total particles. *Health Lab Sci*1975;12(1):47–51.
13. Sandle T. Real-time counting of airborne particles and microorganisms: a new technological wave? *Clean Air Containment Rev* 2012; 9:4–6.
14. Ljungqvist B, Reinmüller B. Monitoring of air in clean environments – a comparative study with instantaneous microbial detection. *EJPPS*2011;16:49–53.
15. Sandle T. A review of cleanroom microflora: types, trends, and patterns. *PDA Pharm Sci Technol*2011;65(4):392–403.
16. Miller MJ, Walsh MR, Shrake JL et al. Evaluation of the BioVigilant IMD-A®, a novel optical spectroscopy technology for the continuous and real-time environmental monitoring of viable and nonviable particles. Part II: Case studies in environmental monitoring during aseptic filling, intervention assessments and glove integrity testing in manufacturing isolators. *PDA J Pharm Sci Technol*2009;63(3):258–282.
17. International Organization of Standardization. ISO 21501-4:2007 Determination of Particle Size Distribution – Single Particle Light Interaction Methods. Part 4: Light Scattering Airborne Particle Counter for Clean Spaces. Geneva, Switzerland: ISO.
18. Bjerner G, Kene V, Åkerlund E, Andersson K. Real-time microbiological air monitoring. *EJPPS*2012;17(3):52–55.
19. Miller MJ, Lindsay H, Valverde-Ventura R, O’Conner MJ. Evaluation of the BioVigilant IMD-A®, a novel optical spectroscopy technology for the continuous and real-time environmental monitoring of viable and nonviable particles. Part I. Review of the technology and comparative studies with conventional methods. *PDA J Pharm Sci Technol* 2009; 63(3):244–257.
20. Bohren CF, Huffman DR. Absorption and Scattering of Light by Small Particles. New York, USA: Wiley-Interscience; 2010, p. 431.
21. BioVigilant. Validation Testing of IMD-A 300/350 Systems. BioVigilant fact sheet, LI007. Tucson, AZ, USA: BioVigilant; 25 August 2011. Available at: [www.BioVigilant.com](http://www.BioVigilant.com).
22. Eudralex. The Rules Governing Medicinal Products in the European Union Volume 4: EU Guidelines to Good Manufacturing Practice Medicinal Products for Human and Veterinary Use, Annex 1: Manufacture of Sterile Medicinal Products. Brussels, Belgium: European Commission; 2009.
23. Jensen PA, Lighthart B, Mohr AJ, Shaffer BT Instrumentation used with microbial bioaerosol. In: *Atmospheric Microbial Aerosols: Theory and Applications*. Lighthart B, Mohr AJ, Eds. New York, NY: Chapman & Hall; 1994, pp. 226–284.
24. Eaton T. Cleanroom airborne particulate limits and 70% isopropyl alcohol: a lingering problem for pharmaceutical manufacturing? *PDA J Pharm Sci Technol*2009;63(6):559–567.
25. Eaton T, Davenport C, Whyte W. Airborne microbial monitoring in an operational cleanroom using an instantaneous detection system and high efficiency microbial samplers. *EJPPS* 2012; 10(4):339–351.
26. Whyte W, Green G, Albus A. Collection efficiency and design of microbial air samplers. *J Aerosol Sci*2007;38:101–114. ■

излучающего в синей области видимого спектра света (405 нм). Два детектора одновременно регистрируют излучение, рассеянное на длине волны 405 нм, и излучение в зеленой области спектра (флуоресценцию). Таким образом, все частицы, прошедшие измерительный объем, будут сосчитаны детектором рассеянного света, но только те из них, которые жизнеспособны, будут одновременно сосчитаны детектором флуоресценции.

Поскольку идея получать данные о микробиологической чистоте воздуха в реальном масштабе времени, без длительной лабораторной инкубации и подсчета выросших колоний, чрезвычайно заманчива, нет сомнения, что статья Т. Сэндла с соавторами должна быть очень интересна всем специалистам, занимающимся измерениями параметров чистых помещений. По сути, это первая публикация на русском языке, посвященная не описанию прибора такого типа, а результатам измерений, полученных с его помощью в реальных чистых помещениях.

Даже беглое изучение этих результатов показывает, что метрологические характеристики прибора IMD-A еще далеки от совершенства. Прежде всего, это относится к детектору рассеянного света, т.е. к счетчику нейтральных частиц. Из приведенных в статье таблиц видно, что концентрация частиц в функционирующем помещении класса В по GMP (класса 7 ИСО) на два-три порядка меньше, чем пределы этого класса, т.е. комната для переодевания фактически соответствует классу 4 или даже классу 3 ИСО! Конечно, в это трудно поверить.

Анализ результатов измерений концентрации в воздухе микроорганизмов также вызывает целый ряд вопросов. Прежде всего, бросается в глаза резкое увеличение числа «био-отсчетов» при распылении дезинфицирующих веществ. Если такое распыление проводится при обработке рук оператора, еще можно попытаться списать его на повышенное отделение биочастиц кожей оператора, но рост «био-отсчетов» при дезобработке упаковки под это объяснение никак не попадает. Приходится признать, что, по-видимому, некоторые органические вещества (небиологического происхождения), содержащиеся в дезинфицирующих растворах, также способны вызвать флуоресценцию частиц. Жаль, что такое простое предположение не было проверено авторами в ходе контрольных опытов. Также вызывает некоторое недоумение отказ авторов от одновременного измерения числа как нейтральных, так и жизнеспособных частиц традиционными методами, то есть счетчиками частиц и микробиологическими пробоотборниками. Необходимость такого сравнения представляется очевидной.

Но необходимо отметить, что авторы прекрасно понимают стоящие перед ними проблемы и не замалчивают их, что является основой для дальнейшего продвижения вперед. Надеемся, что они продолжат свои эксперименты и будем ждать их результатов.

Таким образом, можно сделать вывод, что техника «мгновенной» регистрации биообъектов из стадии разработки и первых опытных образцов приборов перешла к этапу их коммерческого выпуска и эксплуатации. Конечно, многие характеристики, и прежде всего чувствительность измерений и их селективность, еще весьма далеки от идеала, но ведь их совершенствование – только вопрос времени. Пока не стоит рекомендовать приборы такого типа для точных измерений, например, при аттестации чистого помещения, но как средство индикации они уже вполне себя оправдывают, позволяя регистрировать тренды при измерении концентрации микроорганизмов в воздухе. ■