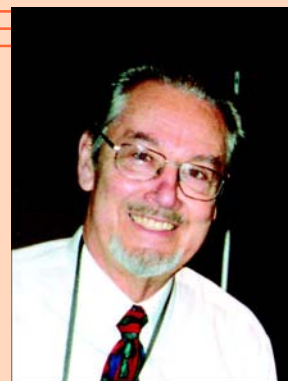


# Измерение микроорганизмов в воздухе – после долгих исследований проблемы еще остаются!

Аке Мюллер, шведский эксперт ICCCS, ISO и CEN

Аке Мюллер – шведский эксперт ICCCS, ISO и CEN, один из основателей международной конфедерации обществ по контролю микрозагрязнений передал эту статью специально для нашего журнала президенту АСИНКОМ XXI Балаханову М.В. при встрече на последнем, 16-ом международном симпозиуме по контролю микрозагрязнений. Симпозиум состоялся в конце апреля 2002 г. в г. Анахайме (США, Калифорния). Автор считает информацию, изложенную в статье, чрезвычайно важной для распространения среди членов ICCCS и всех специалистов, занимающихся проблемами обеспечения микробиологической чистоты.

В подготовке к печати этой статьи принимали участие специалисты АЦВИ ООО «БЛОК ВЕСТ ХОЛДИНГ», к.т.н. Тартанкина Н.И. и Баранов В.А.



Дан обзор более чем шестидесятилетних усилий, направленных на разработку оборудования для измерения взвешенных в воздухе микроорганизмов. Показано, что до сих пор многие проблемы так и не решены и должны быть вынесены на обсуждение. Рассматривается новый стандарт ISO 14698, посвященный микробиологическому контролю, в особенности его разделы, касающиеся отбора проб биоаэрозолей.

Каждый работающий в чистых помещениях любого класса в фармацевтической, пищевой и других отраслях промышленности, а также в больницах, или – если сформулировать проблему наиболее всеобъемлющим образом – каждый, работающий там, где «гигиена имеет важное значение», сталкивается с необходимостью проведения достоверных измерений содержания микроорганизмов в воздухе.

На самом деле обеспечить достоверность таких измерений не просто, но некоторые специалисты этого не понимают. В Правилах GMP – основном документе для фармацевтической промышленности с 1981 года – сформулированы требования по содержанию микроорганизмов в воздухе для различных классов чистоты, но ничего не говорится о том, как проводить подобные измерения или о возникающих при этом проблемах. Тот факт, что различные пробоотборники могут дать результаты, отличающиеся на порядок, вообще не рассматривался. Последняя редакция

GMP Европейского Союза, принятая в 1995 году, также не содержит каких-либо указаний по измерениям биоаэрозолей.

Методы измерения биоаэрозолей стали привлекать внимание исследователей в 30-е годы, а после начала Второй мировой войны в США и Великобритании работы в этой области стали быстро продвигаться. В этот период были разработаны новые методы измерений, которые появились в Швеции в конце 40-х годов (см. табл. 1 и табл. 2).

В 1949 году метод щелевого пробоотбора (slit-sampler) был протестирован группой бактериологов, позже применивших его в госпитальной гигиене (табл. 2). Конструкция щелевого пробоотборника, хорошо известная и до сих пор широко используемая, была разработана в Швеции в 1959-63 годах автором настоящей статьи. Этот прибор был предназначен для фармацевтической и пищевой промышленности (табл. 2).

Методы измерения микробиологических аэрозолей, в особенности при

длительных наблюдениях, исследовались вооруженными силами Швеции; в 1981 году был опубликован обзор большинства существующих методик и проведено исследование ряда методик. Шведский Национальный совет по безопасности в промышленности выпустил в 1983 году хороший обзор на 56-ти страницах существующих приборов и их характеристик (табл. 2). Автор статьи был одним из пяти членов рабочей группы по подготовке этого обзора.

В США необходимость в стандарте по измерениям биоаэрозолей была осознана в конце 80-х годов, когда в Институте исследований окружающей среды и технологий (IEST) была создана рабочая группа по разработке практических рекомендаций (RP) «Микроорганизмы в чистых помещениях». Они были выпущены в 1993 году как IEST-RP-CC023 (табл.1) и содержат важный раздел по измерениям биоаэрозолей. В рабочей группе по подготовке этого документа, состоявшей из 15 членов, принимал участие и автор статьи.

**Таблица 1**  
Разработка пробоотборных устройств

Вторая мировая война	Война в Корее	Война во Вьетнаме	ХОЛОДНАЯ ВОЙНА, носоглашение между США и СССР о недопустимости бактериологической войны	«Буря в пустыне» Опасность бактериологической войны	Опасность бактериологической атаки террористов
Опасность бактериологической войны (Форт Детрик, США; Портон, Великобритания)		Развитие фармацевтики	Правовое регулирование фармацевтики. Правила GMP	Работа CEN/ISO по созданию комплекса микробиологических стандартов (7, позже 10)	
<b>1940</b>	<b>1950</b>	<b>1960</b>	<b>1970</b>	<b>1980</b>	<b>1990</b>
1941 Линейный щелевой пробоотборник (Bourdillon, США) 1944 Первый ситовый пробоотборник (США) (1960-63 Первый шведский щелевой пробоотборник BIAP)			1950 Щелевой пробоотборник с вращающимся диском (Lidwell, США) 1958 и 1964 Многоступенчатый ситовый пробоотборник (Andersen, США) 1960 Обзор, 343 ссылки (Batchelor, США)		
C 70-х годов – новые конструкции ситовых, щелевых и центрифужных пробоотборников разработаны в США, Германии, Италии и Франции; продажа приборов по всему миру					

**Таблица 2**  
Основные публикации по отбору проб биоаэрозолей  
(наиболее важные работы и приборы выделены жирным шрифтом)

Год	Авторы	Название	Библ. ссылка
<b>1940-е годы</b>			
1941	<b>Bourdillon, Lidwell, Thomas</b>	Щелевой пробоотборник для сбора и подсчета бактерий в воздухе (первая разработка щелевого пробоотборника линейного типа)	<i>Journal of Hygiene</i> , 41 (1941)
1944	<b>DuBuy &amp; Crisp, США</b>	Сравнительное исследование различных пробоотборных устройств для микроорганизмов в воздухе	<i>Public Health Repts</i> , 59 (1944)
1948	<b>Bourdillon, Lidwell, Lovelock</b>	Исследования по гигиене воздуха (описан щелевой пробоотборник и др.)	<i>Med. Res. Council</i> , 262 (1948), UK
1949	<b>Laurell G.; Lofstrom G., Magnusson, Ouchterlony</b>	Первое шведское исследование щелевого пробоотборника типа прибора Bourdillon	<i>Acta Med. Scand.</i> , 134(1949)
<b>1950-е годы</b>			
1950	<b>Lidwell O. M.</b>	Первая публикация о щелевом пробоотборнике с вращающейся чашкой	<i>Lancet</i> , 1 (1950)
1950	Sonkin L. S.	Применение каскадного импактора для исследования бактериальных аэрозолей	<i>Am. J. Hyg.</i> , 51 (1950)
1954	<b>Decker &amp; Wilson (Форт Детрик, США)</b>	Щелевой пробоотборник для сбора микроорганизмов в воздухе (со скоростью вращения 1 оборот/час)	<i>Appl. Microbiol.</i> , 2 (1954)
1956	<b>Orr, Gordon, Kordecki (Georgia Inst. of Techn.)</b>	Термопреципитация (термическое осаждение) микроорганизмов из воздуха	<i>Appl. Microbiol.</i> , 4 (1956)
1957	<b>Kuehne &amp; Decker (Форт Детрик, США)</b>	Исследования с продолжительным (12 час) отбором пробы <i>S. Marescens</i> при помощи щелевого пробоотборника	<i>Appl. Microbiol.</i> , 5 (1957)
1957	<b>Gowns, Kethley, Fincher A. (Georgia Inst. of Techn.)</b>	Импинджер с критическим отверстием	<i>Appl. Microbiol.</i> , 5 (1957)
1958	<b>Andersen A. A.</b>	Новая разработка пробоотборника для улавливания жизнеспособных частиц из воздуха	<i>J. Bact.</i> , 76 (1958)
1959	<b>Wolf H. W. et al. (WG, 7 p)</b>	Обзор по пробоотбору микробиологических частиц (54 стр., 82 библ. ссылки)	<i>Publ. Health Monogr. No 60</i>
<b>1960-е годы</b>			
1960	<b>Batchelor H. W. (Форт Детрик, США)</b>	Обзор по пробоотборникам (33 стр., 343 библ. ссылки)	<i>Adv. in Appl. Micr.</i> , 2 (1960)
1963	<b>Moller A. L. (после исследований в США в 1959)</b>	Оборудование для измерения загрязнения воздуха (первый вращающийся щелевой пробоотборник в Швеции, 1959 год)	<i>Swed. Techn. Research Council Item 2680+3028 (in Swedish) (новая конструкция в 1963)</i>
1964	<b>May K. R. (Форт Детрик, США)</b>	алибровка модифицированного пробоотборника Андерсена	<i>Appl. Microbiol.</i> , 1 (1964)
1967	<b>Proceedings, UK (много статей)</b>	Микроорганизмы в воздухе. 17-ая конференция микробиологического общества (Soc for General Microbiol.), Лондон	<i>Proceedings, Univ. Press, Cambridge, UK (1967)</i>

Год	Авторы	Название	Библ. ссылка
<b>1970-е годы</b>			
1977	Lundgren & Blome (Gambro, Швеция)	Сравнение двух методов для определения микробиологического загрязнения (BIAP и два вида фильтров Сарториус)	GAMBRO, Internal report
1978	HIMA taskforce, 9 человек	Микробиологический контроль в промышленной среде. Обзор, 24 стр.	HIMA Report 784.3
<b>1980-е годы – Работы скандинавских исследователей</b>			
1981	Blomquist et al.	Сравнительное изучение различных тест-методик для улавливания спор грибов.	National Board of Industrial Safety 1981:11 (in Swedish)
1981	Henningsson E.	Обзор оборудования и методов пробоотбора для микроорганизмов в воздухе	FOA Rapport C 40131-B1 (in Swedish)
1981	Moller A. L.	Общие ошибки при пробоотборе микроорганизмов из воздухе	R3-INFO, 33(1981), pi 7-24 (in Swedish)
1982	Reinmuller B.	Сравнительные характеристики моделей пробоотборных устройств в воздухе (BIAP, метод фильтрации и RCS)	R3-Proceedings Oslo 1982 (in Swedish)
1983	Blomquist et al. (Bovallius, Bucht, Haggstrom, Moller)	Пробоотбор микроорганизмов из воздухе. Обзор (56стр., 30 библ. ссылок)	Arbete och Halsa, 1983:4 Nat. Board o Industr. Safety A Handbook (in Swedish)
2001	Reinmuller B.	Распространение загрязнений воздушным путем и оценка его риска для фармацевтических чистых помещений. Тезисы диссертации	Royal Inst of Technol, Bull, no 56 (2001), 150 p. ISSN 0284 -141 X

### Начало работы по созданию международных стандартов по биозагрязнениям

С 1991 года продолжается международная работа, направленная на создание общих, а не ориентированных на какую-нибудь одну отрасль стандартов по контролю биозагрязнений. Важной частью этих стандартов являются принципы, методы и приборы для измерения микробиологических аэрозолей. В них также сформулированы основные требования к выбору измерительного оборудования и описываются методы, позволяющие убедиться в достоверности результатов измерений с помощью существующего оборудования.

Эта совместная работа специалистов из семи европейских стран началась в 1991-1994 годах в рамках технического комитета CEN TC 243 (CEN – Comitee Europeen de Normalisation – Европейский комитет по стандартизации). В 1994 году работа стала международной, перейдя под эгиду Международной организации стандартизации (ISO) и технического комитета TC ISO 209, который позже разделился на 6 рабочих групп. Ожидается, что документ, подготовленный рабочей группой WG2 и озаглавленный «Стандарт по контролю биозагрязнений», будет принят в качестве стандарта ISO 14698 в 2002 году, а пока он доступен в виде документ ISO DIS 14698

на 50 страницах (DIS – draft international standard, т.е. предстандарт). Автор статьи был делегатом от Швеции в рабочей группе с момента начала ее деятельности в 1991 году и считает, что стандарт ISO 14698 должен стать основным документом для всех отраслей, где гигиена является важнейшим фактором, а отраслевые «специфические» стандарты должны исчезнуть.

В таблице 3 дан краткий обзор четырех основных принципов, лежащих в основе работы современных приборов для отбора микробиологических проб. Три метода считаются активными, а один – пассивным, поскольку полученные с его помощью результаты слож-

**Таблица 3**

Принципы измерения содержания микроорганизмов в воздухе

Активные методы
<p>1. <b>ИМПАКЦИЯ</b> (через щель или отверстия). Воздух с микроорганизмами всасывается через щель или отверстия, расположенные напротив поверхности с питательной средой с такой высокой скоростью, что микрочастицы ударяются о поверхность и прилипают к ней (затем в процессе инкубации эти микроорганизмы будут размножаться на питательной среде). Воздух огибает препятствие и отводится в сторону. Возможно применение твердой или жидкой питательной среды.</p> <p>2. <b>ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЕ</b>. Воздух с микроорганизмами всасывается вдоль оси вращающейся турбины, а затем движется в радиальном направлении с высокой скоростью. Частицы ударяются о внутреннюю поверхность камеры и улавливаются поверхностью питательной среды (затем в процессе инкубации эти микроорганизмы будут размножаться на питательной среде). Воздух огибает препятствие и отводится в сторону. Возможно применение твердой или жидкой питательной среды.</p> <p>3. <b>ФИЛЬТРОВАНИЕ</b> (на волокнах или мембранах). Фильтр может быть сделан из волокон определенной толщины или являться мембраной с отверстиями, размер которых меньше, чем диаметр улавливаемых частиц. При прохождении воздуха с микроорганизмами через фильтр частицы остаются либо к объему фильтра, либо на его поверхности (фильтрация или ситовый эффект).</p>
Пассивный метод
<p>4. <b>СЕДИМЕНТАЦИЯ</b>. Микроорганизмы из воздуха спонтанно оседают на горизонтально расположенную поверхность с питательной средой (чашку Петри) в течение определенного времени, которая затем инкубируется.</p>

но сопоставить с реальной концентрацией биоаэрозолей. Все три активных метода имеют очень разные свойства; ниже мы обсудим наиболее важные из них, включая конструкцию и характеристики приборов.

В ноябре 2001 года в Royal Institute of Technology, в Стокгольме, была представлена к степени PhD и защищена работа шведского автора миссис Берит Рейнмюллер (Berit Reinmuller), посвященная изучению различных методов измерения биоаэрозолей и сравнению их достоверности. Эта работа основана на результатах, полученных в течение нескольких лет; в частности, она показала ненадежность некоторых конструкций пробоотборников.

### Проблемы все еще остаются

Несмотря на все усилия прошедших шести десятилетий ситуация сегодня такова, что обзор существующих методов измерения биоаэрозолей просто необходим. В этой области все еще остались неясности и проблемы, которые следует обсуждать на официальном уровне всему международному сообществу исследователей. В противном случае понятия «предельная концентрация частиц-носителей микроорганизмов для данного класса микробиологической чистоты», «контроль качества» и прочие им подобные будут недостоверны. На это указывает и документ ISO 14698, в котором не только говорится, что «соответствующие методы измерений и аппаратура должны подбираться тщательно», но и приводятся соответствующие рекомендации. Часть материалов из ISO 14698 представлена в этой статье.

Настоящая статья предназначалась для публикации в журнале *R<sup>3</sup>-Nordic* и сначала была написана на шведском языке. Однако редактор журнала счел тему статьи настолько важной, что попросил представить ее на английском языке с тем, чтобы распространить ее среди всех членов Международной конфедерации обществ по контролю загрязнений (ICCCS).

### История вопроса: необходимость в измерении биоаэрозолей зародилась в 40-е годы

Развитие методов измерения микроорганизмов в воздухе – биоаэрозолей – началось в начале 20-го века. В это время стало известно, что такие болезни, как туберкулез, распространяются воздушно-капельным путем, и потребовались методы их контроля. В период Второй мировой войны 1939 – 1945 гг. увеличился риск возникновения бактериологической войны: известно, что Япония испытывала бактериологическое оружие в Китае. Эти чисто военные факторы инициировали разработку надежных методов измерений. Научно-исследовательские работы этой тематики

для военных целей стали быстро развиваться, в особенности в США (Форт Детрик) и Великобритании (Портон), но в них принимали участие и такие небольшие страны как Швеция.

В это же время, т.е. после войны, потребность в измерении биоаэрозолей возникла и в производстве антибиотиков, которое быстро вышло на промышленный уровень. Микроорганизмы *Subtilis*, попадаая в ферментер вместе с воздухом, необходимым для культивации, могли за несколько часов разрушить сотни килограммов ценного пенициллина. Резко возросшее производство стерильных лекарств потребовало создания стерильных помещений и разработки методов для измерения биоаэрозолей.

В практической медицине пришли к выводу, что биоаэрозоли особенно нежелательны при проведении хирургических операций, в особенности сложных и длительных, например, при пересадках тазобедренных суставов, операциях на сердце и др. Растущая пищевая промышленность, с ее расширяющимся экспортом, также нуждается в соблюдении требований гигиены. К сожалению, сейчас, в 21 веке, мы вновь вернулись к опасности бактериологической войны. Хронология этих событий представлена в табл. 1. За шестьдесят лет исследований была проделана огромная работа, разработаны новые методы измерения биоаэрозолей – но некоторые из них были признаны недостоверными или ошибочными. Несмотря на то, что очень много работ проводилось в условиях секретности для военных целей, многие публикации доступны. Обзор, выпущенный еще в 1960 году, содержит 343 библиографические ссылки. Краткое перечисление наиболее важных публикаций с 1940 года дается в табл. 2.

### Важные годы

Первый щелевой прибор для отбора проб биоаэрозолей появился в 1941 году. С 1950 года для улавливания частиц стала применяться вращающаяся (1 оборот в час) чашка Петри с агаром. Когда автор статьи в 1959 году приехал в фирму Merck, Sharpe & Dohme (США) для изучения отбора проб биоаэрозолей, он обнаружил, что там используется этот метод, модифицированный в 1954 г. (табл. 2). Многоступенчатый пробоотборник Андерсена появился в 1958 г. и был приспособлен для отбора проб биоаэрозолей в 1964 г. В 1960 г. появился первый обзор по измерению биоаэрозолей (H. W. Batchelor из Форт Детрик), 343 библиографические ссылки в котором ясно демонстрировали размах работ по этой проблеме.

### Этапы развития

На начальном этапе исследований появилось много исследовательских работ. Были разработаны довольно

зabавные прототипы приборов, но большинство из них за 60-е и 70-е годы так и не воплотились в коммерчески доступные приборы. Так, широко распространенные ранее стеклянные импинжеры сегодня практически не используются. Это был период ученых, внедряющих новые идеи. Ценность исследований того времени заключалась в том, что были определены основные физические закономерности, а вслед за ними последовательно выявлены основные ограничения и источники ошибок при измерениях. Контрастом является картина сегодняшнего рынка, когда слишком много приборов предлагается потребителю без описания их ограничений и недостатков, а то и без реального понимания их самим производителем.

На фотографиях 1-3 показаны три основных вида приборов для отбора проб.



Фото 1. Один из первых пробоотборников с вращающейся щелью (Decker, Wilson, 1954 – см. библиографические ссылки). Тяжелый, но эффективный



Фото 2. Один из первых легких портативных приборов, использовавший принцип центрифуги и батарейное питание. На рынке с 1975 года. Низкий расход воздуха, позднее был усовершенствован



Фото 3. Современный щелевой пробоотборник, эффективный, но все еще громоздкий и тяжелый. Сегодняшний вариант модифицированного прибора BIAP

Среди обилия ранних публикаций оказались погребены многие важные результаты. Характерным примером является зависимость между размерами частиц и эффективностью их улавливания для приборов, использующих эффект импакции (рис.1). Переменной для различных графиков является скорость частицы в момент импакции (удара о поверхность), хотя для более строгого рассмотрения требуется учесть и плотность частиц.

Из графиков рис.1 видно, что частицы, являющиеся чешуйками кожи размером 40x40 мкм, несущими по несколько сот стафилококковых бактерий, эффективно улавливаются даже при низких скоростях импакции, но при улавливании на этих же скоростях одиночных спор грибов размером 1-2 мкм возникают большие проблемы. Для их улавливания требуется скорость импакции около 10-20 м/с или более.

Также очень важно знать степень улавливания микроорганизмов после их прохождения через расположенную по радиусу щель или через круглое отверстие. Эти соотношения были исследованы вместе с величиной  $\lambda$  (stop distance – пробег до остановки), т.е. длиной пути, который проходит в воз-

духе частица определенного размера с данной начальной скоростью (при этом переменным фактором является также плотность частицы). Зависимость эффективности улавливания частиц от параметра  $P$  (равного величине  $\lambda$ , деленной на диаметр отверстия или на ширину щели) для щелевого и ситового методов были опубликованы в Лондоне в 1967 году на конференции «Микроорганизмы в воздухе» (рис. 2).

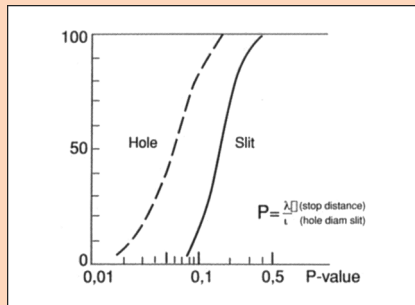


Рис. 2. Зависимость эффективности улавливания от величины параметра  $P$  для отверстия и щели

Как видно из графика, эффективность улавливания для отверстий, имеющих диаметр, совпадающий с шириной щели, выше. Однако для отверстий характерны два недостатка:

1. Несколько микроорганизмов, осевших непосредственно под отверстием, могут в процессе роста слиться и образовать одну колониобразующую единицу (КОЕ), тогда как при прохождении через щель микроорганизмы рассеиваются более равномерно. Именно число КОЕ является определяющим при измерениях.
2. Движущаяся щель дает нам возможность выявить реальное время улавливания микроорганизмов, тогда как ситовый пробоотборник – нет.

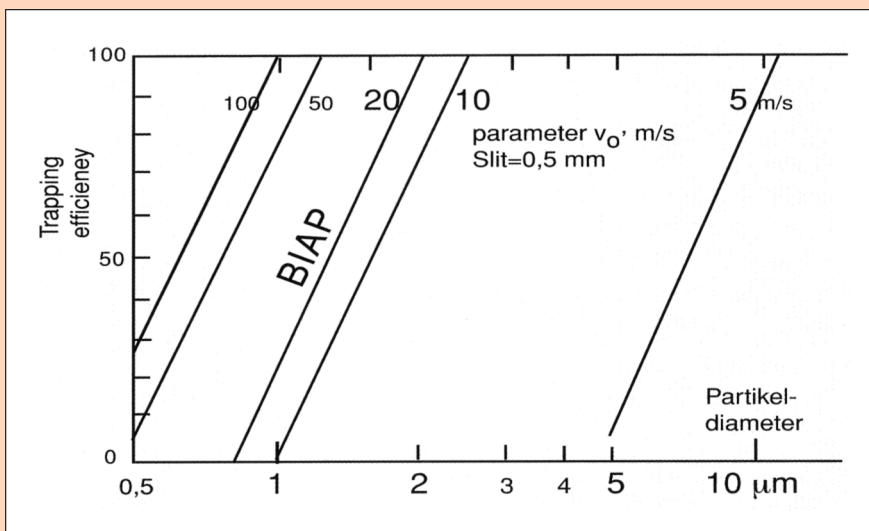


Рис. 1. Корреляция между размерами частиц и эффективностью улавливания при различных скоростях импакции (Из трудов конференции в Лондоне, 1967 г.)

Работа автора статьи по разработке щелевого пробоотборника представляется настолько типичной для того времени, что это оправдывает ее использование в качестве примера.

### Пример разработки пробоотборника биоаэрозолей, характерного для раннего периода исследований

Когда в 1958 году я пришел на работу в шведскую фирму АВ KABI, занимающуюся производством антибиотиков, там часто фиксировались случаи бактериального загрязнения во время процесса ферментации, что приводило к потере сотен килограмм очень дорогого тогда пеницилина. Тем не менее, это рассматривалось как «норма» для такого производства. Уже имея степень магистра в биотехнологии, я попросил предоставить мне оборудование для измерения биоаэрозолей и услышал, что подобного оборудования просто нет. Вскоре от держателя нашей лицензии в США я узнал, что пробоотборники для биоаэрозолей все же существуют. Во время визита в США в 1959 году я изучил образец щелевого пробоотборника и пришел к выводу о его эффективности.

По возвращении в Швецию я разработал подобный прибор, оснащенный тяжелым вакуумным насосом. Использование такого насоса предопределило громоздкость конструкции, вес которой был 30 кг. Однако работал прибор неплохо, и с его помощью удалось выявить и устранить многие источники загрязнений.

Когда в 1961 году я приступил к работе в лаборатории Шведской сахарной компании, там также были проблемы с загрязнениями. Так я создал новый образец, описанный позднее в моей диссертации в 1963 году.

Я опробовал как щели различной ширины, так и различные расстояния между щелью и поверхностью агара. Очень хорошие результаты показал образец с шириной щели 0,5 мм, расстоянием до агара 1 мм, скоростью воздуха в щели 20-40 м/с и скоростью вращения диска в 1 или 1/3 оборота в час. Вскоре этот прибор был усовершенствован; он стал легче и был оснащен встроенным аспирационным вентилятором.

Мой коллега, инженер Курт Энгблум (Kurt Engblom) занимался производством этого прибора и обеспечил его маркетинг, продажу и обслуживание в течение 35 лет. В основном прибор использовался в скандинавских странах под торговой маркой BIAP. Сегодня он немного модифицирован и выпускается и продается в Дании (фотография 3).

Принцип движения щели позволяет оценить момент времени, в который

произошло изменение концентрации, и поэтому очень важен. Это дает возможность изучить процесс и определить причину изменения концентрации. Примером подобного исследования может служить выяснение причин инфицирования вакцины от оспы, производимой компанией SBL в Швеции в 1963 году, когда оспа поразила Швецию.

Была проверена работа большого инкубатора, который использовался в процессе производства. Инкубатор был снабжен увлажнителем, в который подавалась хлорированная холодная вода, на первый взгляд, тщательно очищенная. На поверхности чашки Петри из прибора BIAP была зафиксирована картина, показанная на фотографии 4.

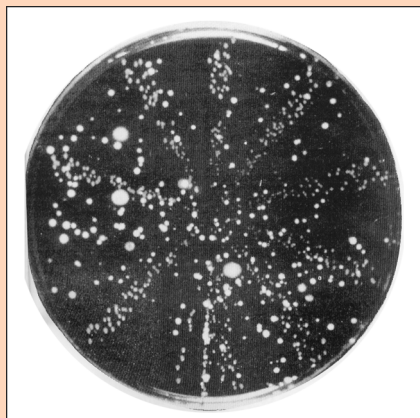


Фото 4. Чашка Петри после инкубации пробы

Причиной появившихся на поверхности «звездных лучей» явился увлажнитель, что было подтверждено анализом времени пробоотбора. После демонтажа увлажнителя и введения еженедельной стерилизации инкубатора инфекция исчезла. В результате проведение измерений многократно окупило себя.

## Ситуация сегодня. Легко купить пробоотборник, но...

Сегодня очень просто купить коммерческий прибор для отбора проб биоаэрозолей. При этом, скорее всего, никто не станет размышлять о длительном периоде разработки основных принципов его работы, о том, почему его конструкция и его характеристики именно таковы как они есть. Оптимальны ли они для существующих потребностей? В чем заключается неизбежный компромисс между достоверностью и качеством, с одной стороны, и компактностью конструкции и легкостью в применении, с другой стороны. Как влияет на это ценовой фактор (стоимость может колебаться в пределах 1000-5000 \$)?

Иногда восторженные соображения по поводу шума, размеров и веса прибора играют большую роль, чем реальная эффективность и надежность. Это очень рискованная политика. Часто потребитель предпочитает компактный прибор без подключения к сети, не задумываясь, будет ли проба иметь достаточный объем для получения надежных результатов? Будет ли прибор обеспечивать те же характеристики через несколько лет эксплуатации? Многие примеры из недавней практики убеждают в том, что так бывает далеко не всегда. Иногда пробоотборники «старого стиля» дают более надежные результаты.

Если прибор приобретается для того, чтобы контролировать выполнение требований GMP для определенных классов чистоты, разумеется, решающее значение имеет надежность результатов измерений, а не портативность прибора.

В табл. 4 перечислены коммерчески доступные сегодня приборы для измерения биоаэрозолей.

## Сравнение некоторых приборов для измерения биоаэрозолей

Сравнительные исследования приборов проводились неоднократно. Результаты некоторых из них были опубликованы, но далеко не все. Ниже мы рассмотрим только некоторые из них. Следует отметить реальную необходимость проведения дальнейших, серьезных научных исследований в этой области.

В 1977 году шведская компания Medical Devices Co провела сравнение между щелевым пробоотборником BIAP и двумя фильтрационными методами с использованием целлюлозных и желатиновых фильтров фирмы «Сарториус». Многократные пробы продемонстрировали не только более высокую эффективность щелевого пробоотборника, но различия между двумя фильтрующими материалами: желатиновые фильтры давали более высокие отсчеты (в КОЕ/м<sup>2</sup>), чем целлюлозные (табл. 5).

В 1982 году доктор Рейнмюллер (табл. 2) представила результаты сравнения эффективности различных методов микробиологического контроля в помещениях – щелевого пробоотбора, фильтрации и центрифугирования. Они подтвердили различную эффективность для этих трех методов.

В 90-х годах ею изучена эффективность некоторых коммерческих образцов пробоотборников, в которых использованы три различных типа импакции, представленные в табл. 6. С помощью этих приборов она проводила измерения микробиологической чистоты воздуха в функционирующем чистом помещении класса ИСО 5 по частицам диаметра  $\geq 0,5$  мкм. Измерения повторялись дважды в различные периоды времени. Источником микроорганизмов являлся работающий человек; примерно поло-

Таблица 4

Некоторые из пробоотборников, представленных на рынке приборов

принцип	торговая марка	производитель	год начала выпуска	примечание
импакция				
ситовые пробоотборники	ANDERSEN	США	1958, 1964	Merck
	SAS	Италия	1970-е	
	MAS SMA	Германия США	1990-е 1980-е	
щелевые пробоотборники	BIAP	Дания	1963, 2000	Новая модель
	Casella	Великобритания	1960-е	
	MG	США	1970-е	
	Reynier Loreco FH 3	США Германия	1970-е 1980-е	
пробоотборники с центрифугированием	RCS	Германия	1970-е / 1990-е	Новая модель
фильтрация				
фильтр	Sartorius Millipore Gelman	Германия США США	1980-е 1980-е 1980-е	Волокнистые и желатиновые

**Таблица 5**

Сравнение эффективности пробоотбора с помощью щелевого пробоотборника и фильтров

Количество КОЕ на м <sup>2</sup>			Сравнительная эффективность, %
Щелевой пробоотборник	Целлюлозный фильтр	Желатиновый фильтр	
384	108		28
327		266	81
266	60		22
327		256	76

**Таблица 6**

Характеристики некоторых пробоотборников, использующих принцип импакции (из диссертации Б. Рейнмюллер, 2001)

торговая марка	производитель	тип импакции	питательная среда	скорость импакции, м/с
ANDERSEN	США	ситовый	90 мм чашка	переменная
BIAP	Дания	щелевой на агар	140 мм чашка	около 20
FH 3	Германия	щелевой на агар	90 мм чашка	35
MAS	Германия	ситовый	90 мм чашка	около 10
RCS Plus	Германия	центрифугирование	полоски с агаром	4
R2S	США	щелевой на агар	90 мм чашка	более 50
SMA	США	ситовый	90 мм чашка	около 1

вину микроорганизмов составляли грибки, а другую половину – бактерии. Объем проб составлял около 0,5м<sup>3</sup>, продолжительность отбора проб колебалась от 10 до 17 минут.

В своих исследованиях Рейнмюллер зафиксировала большие различия в эффективности как между различными приборами так и между различными измерениями, выполненными с помощью одних и тех же приборов (рис. 3).

Из рис. 3 видно, что ни один из приборов не обеспечивает 100% эффективности улавливания. Лучший результат показал шестиступенчатый ситовый пробоотборник Андерсена, зарегистрировавший концентрации 50-90 КОЕ/м<sup>3</sup>.

Ситовый пробоотборник с очень низкой скоростью импакции (SMA) по предварительным оценкам должен был показать низкую эффективность, что и было подтверждено экспериментами. Пробоотборник Андерсена регистри-

рует в 10-15 раз большую величину КОЕ, чем пробоотборник SMA. Щелевой пробоотборник FH3 с высокой скоростью отбора проб и прибор RCS Plus показали в 8-15 раз большую величину КОЕ, чем SMA. А в одном из экспериментов пробоотборник Андерсена зарегистрировал в 2 раза большие значения, чем FH3.

Результаты этих измерений дают ясное представление о том, насколько неадекватны могут быть измерения, выполненные с помощью различных пробоотборников. Такое положение абсолютно неприемлемо, если речь идет о соответствии чистого помещения определенному классу чистоты и соблюдении установленных правил и предписаний.

Из изложенного необходимо сделать два вывода:

- 1) Необходим стандарт по отбору проб и валидации пробоотборников.

Новый стандарт ISO 14698 должен помочь в решении этой проблемы.

- 2) Валидацию пробоотборников должен проводить производитель или продавец этих приборов, а не покупатель. Характеристики и особенности пробоотборников должны быть тщательно определены; покупатель должен быть проинформирован о них на стадии выбора прибора.

Возможные ответы на эти требования может дать предварительное знакомство с новым стандартом ISO 14698.

### Презентация нового стандарта ISO 14698 по микробиологическому контролю

В 2002 году ожидается утверждение стандарта ISO 14698 «Микробиологический контроль». В нем достаточно подробно обсуждается необходимость анализа микробиологического риска, микробиологического измерения биоаэрозолей, валидации коммерческого оборудования, обучения персонала, работающего в этой области и т. д. Ниже впервые представлен обзор тех частей предстандарта DIS ISO 14698, которые имеют отношение к измерению биоаэрозолей.

Полный текст стандарта ISO 14698 по микробиологическому контролю составляет около 60 страниц; он дает общую информацию по проблеме, не описывает частные случаи применения и не содержит обычных разделов, таких как противопожарная защита и техника безопасности. Стандарт состоит из трех основных частей, две первые из которых являются отдельными стандартами.

**Часть 1: 14698-1 Основные положения** (около 35 страниц, включая 8 приложений).

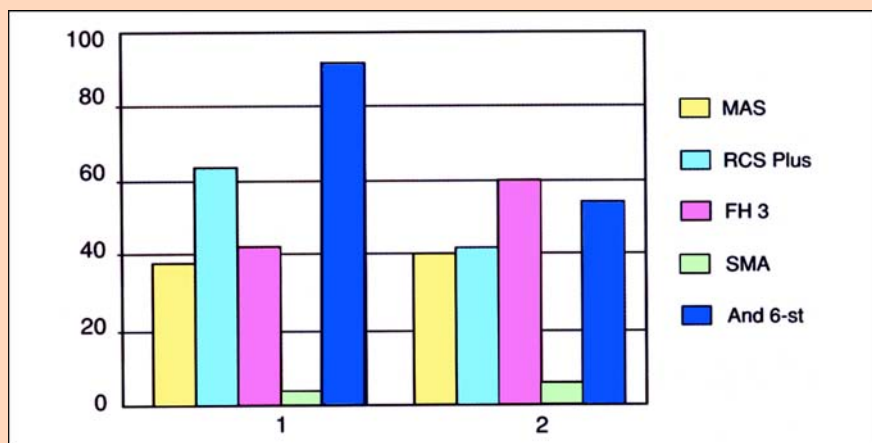


Рис. 3. Концентрация микроорганизмов (КОЕ/м<sup>3</sup>), измеренная приборами различных типов

**Часть 2:** 14698-2 **Оценка и интерпретация данных микробиологического контроля** (около 15 страниц).

**Часть 3: Технический отчет** по контролю эффективности очистки и дезинфекции поверхностей, на которых имелись биозагрязнения или «био-пленки» (bio-films).

## Часть 1. Основные положения

Наиболее важным и обязывающим требованием первой части является необходимость создания «надлежаще оформленной системы» (formal system) для контроля процесса и продукции. «В чистых помещениях и связанных с ними контролируемых средах должна быть разработана, оснащена необходимым оборудованием и установлена надлежащая система контроля биозагрязнений. Она должна оценивать и контролировать факторы, которые могут повлиять на микробиологическое качество процесса и продукта».

Очевидно, что отбор проб биоэрозией является важнейшей частью такой системы контроля.

Из содержания остальных разделов необходимо выделить следующие положения:

3. Термины и определения. В этом разделе определяются понятия двух уровней риска: – «уровень тревоги» (alert level) и «уровень действия» (action level). При микробиологических измерениях результаты часто не бывают однозначно интерпретируемыми, поэтому трудно провести четкую границу между различными состояниями системы. Чтобы преодолеть эту трудность, вместо одной величины предложили ввести две: одна из них предлагает не только продолжить, но и усилить наблюдения, а другая – предпринять немедленные действия.
4. Принципы контроля биозагрязнений. Кроме создания «надлежаще оформленной системы» контроля, в этом разделе подчеркнута важность серии измерений, поскольку отдельно взятые результаты не являются достаточным доказательством, в то время как ряд последовательно измеренных величин уже на ранней стадии может выявить тенденцию к уменьшению или увеличению значений контролируемого параметра.
5. Раздел, посвященный созданию системы контроля, имеет следующие подразделы:
  - 5.1 Основные требования.
  - 5.2 Мониторинг биозагрязнений.
  - 5.3 Пробоотбор (Пробоотборные устройства; 14 параметров контроля; план отбора проб, разработка плана отбора проб; периодичность пробоотбора и др.).
  - 5.4 Процесс отбора проб.

5.5 Культивирование проб.

5.6 Оценка результатов измерений.

Часть 1 содержит несколько информационных приложений (A-G). Далее рассмотрены три из них – приложения A, B и G:

### Приложение А: Руководство по измерению биозагрязнений воздушной среды (3 стр.)

A. 3.2 – Выбор пробоотборника:

Скорость пробоотбора, его продолжительность и тип используемого прибора могут оказать сильное влияние на жизнеспособность микроорганизмов в пробе. Поскольку в продаже находится большое число пробоотборников различных типов, при выборе прибора следует учитывать, как минимум, следующие факторы:

- a) тип и размеры отбираемых из воздуха жизнеспособных микроорганизмов;
- b) чувствительность жизнеспособных микроорганизмов к процедуре пробоотбора;
- c) предполагаемое значение концентрации жизнеспособных микроорганизмов;
- d) способность прибора регистрировать высокие или низкие уровни биозагрязнений;
- e) соответствие питательной среды;
- f) время и продолжительность пробоотбора;
- g) условия в окружающей среде, где будет осуществляться пробоотбор;
- h) внешние условия окружающей среды в точке пробоотбора;
- i) характеристики пробоотборного устройства, в том числе:

1. объемная скорость пробоотбора при измерении низких концентраций жизнеспособных микроорганизмов в воздухе;
2. скорость частиц при импакции и линейная скорость воздушного потока;
3. правильность процедуры пробоотбора и ее эффективность;
4. удобство при перемещении (вес, размер) и в применении (простота операций; наличие вспомогательного оборудования; зависимость от источников вакуума, воды, электричества и др.);
5. простота очистки, дезинфекции или стерилизации;
6. возможные конструктивные особенности, которые могут увеличивать значения измеряемых концентраций жизнеспособных микроорганизмов (сброс воздуха из прибора не должен загрязнять среду, из которой производится пробоотбор; должна быть исключена повторная аспирация воздуха).

### Приложение В: Руководство по валидации пробоотборника воздуха (3 стр.)

Этот раздел посвящен процедуре испытания пробоотборника с помощью

специальных тестовых микроорганизмов, находящихся в аэрозольной форме. Описан порядок выполнения теста, интерпретации полученных результатов и их взаимосвязи с характеристиками пробоотборника.

Выполнение подобных тестовых измерений требует специальных знаний, понимания особенностей процесса тестирования, специального оборудования и приспособлений. Поэтому чрезвычайно важно, чтобы производитель или продавец пробоотборных устройств мог предоставить покупателю надежные данные об их свойствах и эффективности в разных условиях, полученные в результатах проведенных серьезных исследований. Абсолютно недопустимы декларации рекламного характера.

### Приложение Г: Руководство по обучению

В этом разделе указывается на то, что важной составляющей управления качеством является «разработка постоянной, спланированной и соответствующей теме программы обучения всего персонала, работающего с системой микробиологического контроля, созданной в соответствии с этой частью стандарта ISO 14698. Весь персонал, включая работников субподрядных организаций, должен быть соответствующим образом обучен обеспечивать получение последовательных, надежных и воспроизводимых результатов, а также обслуживанию системы».

Особенное внимание следует уделить обучению персонала, осуществляющего микробиологический мониторинг и лабораторные измерения.

В программе обучения должны быть рассмотрены следующие аспекты:

- a) список документов и ссылок на материалы, которые будут использоваться в период обучения;
- b) описание и определение целей обучения и методов для их достижения;
- c) подробное описание каждого этапа каждой процедуры для ясного понимания требований при выполнении этих работ;
- d) результаты измерений, если это требуется;
- e) расписание занятий (как при их проведении на предприятии, так и в любом ином месте);
- f) описание процедуры оценки эффективности обучения.

Кроме этого, должен быть разработан «самоучитель», содержащий вопросы (не менее семи, среди которых анализ риска) для самостоятельной проверки знаний.

## Заключение

Как показано выше, разработка методов отбора проб продолжается уже несколько десятилетий – но проблемы



все еще остаются. Невозможно просто приобрести один прибор, который решит все проблемы получения надежных результатов измерений. Существующие коммерческие пробоотборники обладают сильно отличающимися характеристиками и, соответственно, дают различные результаты, а торгующие компании не дают их полного описания. Для измерений в чистых помещениях высокого класса требуются проанализировать большой объем воздуха, тогда как в менее чистых помещениях можно использовать пробоотборники с небольшим объемом пробы. Для измерения концентрации одиночных спор и для измерения концентрации кожных чешуек, выделяемых людьми, требуются различные типы пробоотборных устройств.

Большой разброс в характеристиках коммерчески доступных приборов отмечался неоднократно; примеры подобных

различий описаны выше. Вероятно, последние сравнительные результаты были получены доктором Рейнмюллер.

Как неоднократно указывал автор статьи и многие другие специалисты, при разработке новых конструкций пробоотборных устройств слишком много внимания уделялось попыткам создания малогабаритного и легкого прибора, удобного в обращении – но при этом были забыты некоторые важные физические факторы, была проигнорирована потребность в настраиваемом приборе. Понимание проблем, которые возникают при тестировании пробоотборников, помогает преодолеть их, поэтому так важно проводить соответствующие исследования и организовывать обучение. Данные о характеристиках приборов и возможных проблемах при их использовании должны предоставляться компанией-производителем.

Представленный выше стандарт ISO 14698, появление которого ожидается в 2002 году, может улучшить ситуацию. В стандарте изложены требования по созданию системы микробиологического контроля, по определению характеристик приборов (их валидации), выделены наиболее важные вопросы, относящиеся к обеспечению надежности измерений, что позволит улучшить ситуацию на рынке.

Работа по созданию документа ISO 14698 была очень напряженной и потребовала около 11 лет. Решение проблем – это сложное дело. Одновременно со стандартом ISO появится европейский стандарт CEN. Оба эти стандарта должны были появиться раньше, ведь уже давно доказано, что микробиологические загрязнения представляют собой реальную опасность и продолжают оставаться причиной болезни и смерти в очень многих сферах деятельности современного общества.

## **Журнал «Чистые помещения и технологические среды» и коллеги из АСИНКОМ XXI**

**поздравляют коллектив НПП «Промавтоматика»  
с юбилеем**

**10 лет в сфере создания  
автоматизированных систем контроля и управления  
комплексами чистых помещений**



Научно-производственное предприятие «Промавтоматика» разрабатывает и внедряет автоматизированные системы контроля и управления обеспечением микроклимата чистых производственных помещений на базе современной микропроцессорной техники и предоставляет полный набор инженерных услуг:

- ♦ разработку проектной документации;
- ♦ разработку прикладного программного обеспечения системы под объект Заказчика, генерацию мнемосхем и печатных документов;
- ♦ комплектацию системы (датчики, контроллеры, промышленные компьютеры, исполнительные механизмы и т.д.);
- ♦ проведение монтажных и пусконаладочных работ;
- ♦ обучение эксплуатационного персонала;
- ♦ гарантийное и сервисное обслуживание.

Наш адрес: **142600, г. Орехово-Зуево Московской области  
ул. Красноармейская, д. 2а, оф.35**

Тел/факс: **8-(24)-12-55-05** (для Москвы и Московской области)  
**8-(0964)-12-55-05** (для других городов)

E-mail: **prioritet@ozcom.ru**