

©HPA

Ocena wydajności filtracji drobnoustrojów obciążeń aerozolami bakteryjnymi i wirusowymi

Nr Raportu 53-10

Poufne informacji handlowe

Nr ref. HPA	Projekt nr 53-10
Nr ref. klienta	PO 10004533 OP
Raport przygotowany dla	Pana Helmuta Scherera
Prowadzący	Pani Anna Moy
Data wystawienia	14 lipca 2010
Liczba kopii	1
Adresaci	Pan Helmut Scherer (CareFusion), Pan. A. Bennett(HPA), Central Records (dr P. Hammond)

Raport przygotowany przez	Raport zatwierdzony przez
Nazwisko: pani Anna Moy	Nazwisko: Pani Sara Speight
Tytuł: Biomedyk	Tytuł: Starszy Biomedyk

¹ HPA – Health Protection Agency - Agencja Ochrony Zdrowia (Zjednoczonego Królestwa)

Podsumowanie

Wydajność 10 filtrów oddechowych CareFusion MicroGard II (seria: M190-19, nr ref.: 892190) dostarczonych przez firmę CareFusion została zbadana za pomocą aerozoli zawierających mikroorganizmy. Filtry zostały obciążone sporami bakterii *Bacillus atrophaeus* i aerozolami wirusa faga MS-2 pałeczki okrężnicy NCIMB 10108, świeżo wyjętymi z opakowania. Filtry zostały obciążone przy przepływie 750 litrów/min⁻¹

Wyniki podsumowano następująco -

Nr filtra	Obciążenie aerozolem	Prędkość przepływu (l/min)	% Wydajności
F1	<i>Bacillus atrophaeus</i>	750	96,9418
F2	<i>Bacillus atrophaeus</i>	750	98,1556
F3	<i>Bacillus atrophaeus</i>	750	97,0083
F4	<i>Bacillus atrophaeus</i>	750	97,0270
F5	<i>Bacillus atrophaeus</i>	750	96,8368
F1	fag pałeczki okrężnicy MS-2	750	98,3592
F2	fag pałeczki okrężnicy MS-2	750	98,8847
F3	fag pałeczki okrężnicy MS-2	750	98,8123
F4	fag pałeczki okrężnicy MS-2	750	99,4506
F5	fag pałeczki okrężnicy MS-2	750	97,3569

WPROWADZENIE

Zanieczyszczenia aparatury oddechowej podczas wydechu identyfikuje się jako źródła infekcji wewnątrzszpitalnych od 1965 (1). Filtry jednorazowe umieszczone między pacjentem a aparaturą mają zapobiegać takiemu zakażeniu. Agencja Ochrony Zdrowia, Porton Down (HPA) ma możliwość testowania wydajności różnych typów filtrów mikrobiologicznych przy pomocy naszego małego stanowiska badawczego. Stanowisko to wyposażono w urządzenie zaprojektowane przez Hendersona i Druetta (2, 3) do badania eksperymentalnego zakażeń powietrzopochodnych, w którym zawiesina mikroorganizmów w roztworze wodnym jest nebulizowana przy pomocy 3-dyszowego nebulizatora Collison. Generowane aerozole są wstrzykiwane do strumienia powietrza wpływającego do rurki ze stali nierdzewnej. Wydajność filtrów oblicza się poprzez wyznaczenie stężenia powietrzopochodnego żywych mikroorganizmów w górę i w dół filtra przy pomocy odpowiednich technik poboru próbek i metod badań mikrobiologicznych. Filtry mogą zostać obciążone mikroorganizmami na małym stanowisku przy prędkości przepływu do 2000 litrów na minutę.

Wybór szczepów bakteryjnych do obciążenia i testowania tych filtrów opiera się na niepatogennym modelu dostarczającym najwyższe możliwe stężenie obciążenia żywymi mikroorganizmami, co pozwoli na wykonanie w pełni ilościowej oceny filtrów. W celu przeprowadzenia tego badania jako modelu bakteryjnego użyto sporów *Bacillus strophaeus* (badanie pod mikroskopem elektronicznym wykazuje, że użyte spory mają długość od 0,96 µm do 1.25 µm i szerokość od 0.55 do 0.67 µm), ponieważ wykazano, że mogą przetrwać proces rozpylania. Spory zostały dokładnie przepłukane i na koniec zawieszone w wodzie destylowanej przed nebulizacją. Podczas nebulizacji woda jest gwałtownie odparowuje z uformowanych kropli (nawet w wysokiej wilgotności względnej), aby monodispersyjny aerosol żywych sporów (o wskazanej wyżej wielkości) obciążał filtr w tym systemie (4). Wcześniejsza analiza dystrybucji wielkości cząsteczek aerozolu przy pomocy próbnika Andersena (5) wykazała, że ponad 80% cząsteczek zawierających spory *B. atrophaeus* obciążające filtry miało wielkość nie przekraczającą 2,1 mikrona.

Z uwagi na zagrożenie dla zdrowia nie przeprowadza się oceny tych filtrów przy pomocy ludzkich wirusów. Na szczęście fagi RNA mają wielkość podobną do najmniejszych ludzkich wirusów, a efektywność filtrów dla usuwania ludzkich wirusów ze strumieni powietrza można oceniać mierząc penetrację przez filtr rozpylonych fagów pałeczki okrężnicy. Fag MS-2 jest nierozwiniętym fagiem pałeczki okrężnicy o jednonicowym RNA o średnicy 23 nanometry i masie cząsteczkowej $3,6 \times 10^6$ daltonów. Wykazano, że pałeczki okrężnicy MS-2 rozpylone z supernatantu odwirowanego lizatu pozostają zakaźne w testowanych tutaj warunkach (6). Rozpylając tę zawiesinę z nebulizatora Collison, powietrzonośne pałeczki okrężnicy są przenoszone w kropelkach, które są znacznie większe niż cząsteczki zakaźne, składające się głównie z lizatu bakteryjnego i nośnika.

MATERIAŁY I METODY

Organizmy testowe

Bacillus atrophaeus (NCTC 10073)

Spory *B. atrophaeus* (5.00×10^9 jednostek tworzących kolonię (cfu) na ml), które dokładnie wypłukano wodą destylowaną zostały zawieszone w wodzie destylowanej. Zawiesina została przygotowana z partii wcześniej przygotowanych przez Dział Produkcji HPA.

Fag MS-2 (NCIMB 10108)

Żywe fagi MS-2 (NCIMB 10108) pozyskano w Krajowego Zbioru Bakterii Przemysłowych, stacji Torry Research, Aberdeen. Zawiesina masy fagów pałeczki okrężnicy została przygotowana poprzez wprowadzenie 0,1 ml z 10^{11} jednostek określających miano wirusa (pfu) na ml zawiesiny fagów pałeczki okrężnicy do 500 ml pożywki bulionowej zawierającej 1×10^8 *Escherichia coli* (NCIMB 9481) podczas logarytmicznej fazy wzrostu. Zawiesina została napowietrzona poprzez wstrząsanie w temperaturze 37°C. Komórki bakterii rozpadły się w ciągu 30 minut, a zawiesina została odwirowana, aby usunąć szczątki komórek. Supernatant został przeniesiony do świeżej butelki; dodano również 10 kropli chloroformu, aby zabić wszelkie zanieczyszczające bakterie. Tego użyto jako zawiesiny masy MS-2. Stężenie fagów określono w sposób opisany później.

zawiesinę o wysokim mianie MS-2 do obciążenia filtrów przygotowano następująco: Nośnik *E. coli* 9481 został zarażony świeżą płytką TSBA, którą inkubowano w temperaturze $37 \pm 2^\circ\text{C}$ przez 19 - 20 godzin. *E. coli* została przeszczepiona z tej płytki przy pomocy ezy 10 μl do 60 ml sterylnego bulionu tryptonowo-sojowego (TSB) w butelce o pojemności 500 ml. Po dokładnym wymieszaniu butelkę umieszczono w inkubatorze z wytrząsaniem (120 rpm) na 150 minut w temperaturze $37 \pm 2^\circ\text{C}$. Zawiesina fagów pałeczki okrężnicy została przygotowana poprzez wstrzyknięcie 4×10^{11} jednostek określających miano (pfu) zawiesiny pałeczek okrężnicy do butelki o pojemności 500 ml zawierającej 60 ml TSB. Zawiesina została wówczas napowietrzona poprzez wytrząsanie w temperaturze $37 \pm 2^\circ\text{C}$ przez kolejne 3 godziny. Zawiesina została dwukrotnie odwirowana przy 2.000 g każdorazowo przez 20 minut, aby usunąć szczątki komórek. Supernatant został przeniesiony do świeżej butelki. Stężenie fagów określono w sposób opisany poniżej.

Filtry

Firma CareFusion dostarczyła do testów 10 filtrów oddechowych MicroGard II (partia: M190-19, nr ref: 892190). Ich wydajność została określona w odniesieniu do filtracji aerozoli bakteryjnych i wirusowych zawierających spory *B. atrophaeus* i fagi pałeczek okrężnicy MS-2 przepływających z prędkością 750 litrów/minutę.

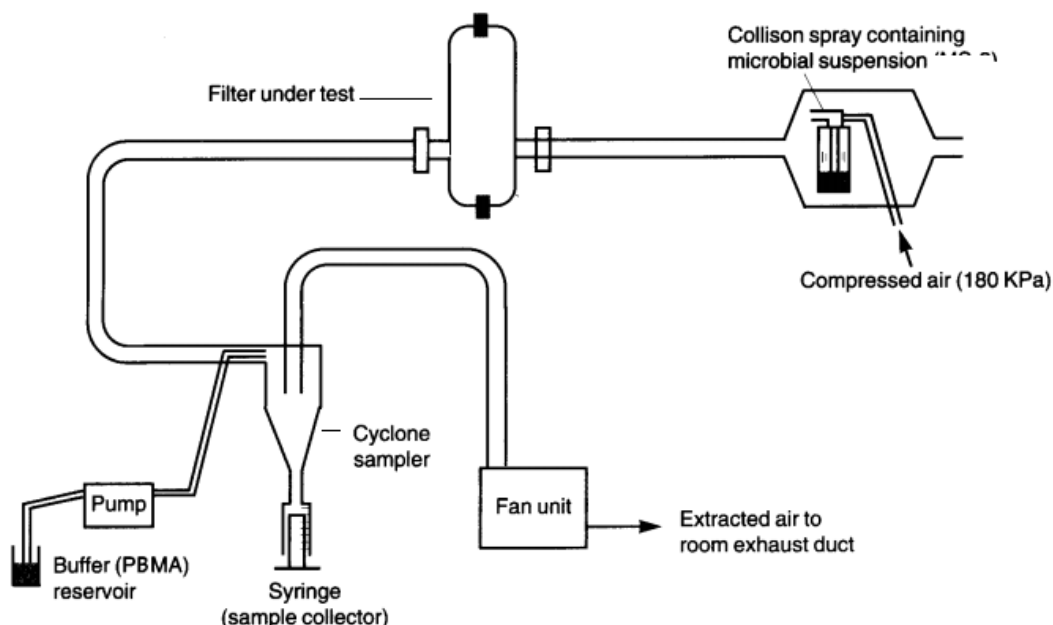
Obciążenie filtrów w małym stanowisku badawczym przy prędkości 750 litrów/minutę przepływu aerozoli zawierających cząsteczki bakteryjne i wirusowe

Małe stanowisko badawcze (Rys. 1) zaprojektowano tak, aby dostarczyć wysokie obciążenie sporami *B. atrophaeus* i fagami pałeczki okrężnicy MS-2 w aerozolu płynącym z prędkością 750 litrów/minutę.

Urządzenie składało się z następujących części podstawowych:

- jednego 3-dyszowego nebulizatora Collison (8), zawierającego albo 30 ml zawiesiny *B. atrophaeus* zawierającej $5,00 \times 10^9$ cfu na ml w wodzie destylowanej albo 30 ml fagów pałeczki okrężnicy MS-2 zawierającej $3,55 \times 10^{11}$ pfu na ml w 50% (v/v) roztworze pożywki. Nebulizator Collison użyto w celu nebulizacji zawartości przy ciśnieniu 180 KPa do strumienia powietrza w dyszy nebulizatora.

RYSUNEK 1 MAŁE STANOWISKO BADAWCZE DO TESTOWANIA FILTRÓW Z AEROZOLAMI MIKROBIOLOGICZNYMI



- Rurka dyszy ze stali nierdzewnej o długości 90 cm i średnicy 5 cm pozwalająca na mieszanie i kondycjonowanie aerozoli wygenerowanych z nebulizatora Collison.
- Odpowiednie sterylne złącza rur i uszczelki umożliwiające wsunięcie testowanego filtra do systemu.
- Jeden próbnik Cyclone (9) (wyprodukowany przez The Hampshire Glass Company, Southampton) przesuwą próbkowane powietrze przez pompkę próżniową. Powietrze zawierające aerozole mikrobiologiczne jest odsysane przez system z prędkością 750 litrów na minutę. Jako cieczy zbierającej użyto sterylne bufora fosfatowego zawierającego manucol i środek przeciwpieniący (PBMA) i wprowadzono ją do wlotu Cyclone z prędkością około 1 ml na minutę przy pomocy pompki perystaltycznej. Cząsteczki w parze wodnej zostały umieszczone na ściankach Cyclone przez siłę odśrodkową i zostały zebrane przez wirującą ciecz, która na końcu okresu obciążania została wycofana z systemu przy pomocy strzykawki. Dla każdego filtra zmierzono objętość płynu zbierającego zebranego w Cyclone.

Filtry zakładano w urządzeniu jeden po drugim i uruchamiano nebulizator Collison. Powietrze było próbkowane w Cyclone przez 5 minut. Ciecz zbierająca została usunięta z urządzeń próbkujących i poddana testom na obecność sporów lub MS-2 w sposób opisany poniżej. Stężenie obciążenia zostało określone dzięki uruchomieniu systemu z usuniętymi filtrami.

Badanie cieczy zbierającej *B.atrophaeus*

Ciecz zbierająca z urządzeń próbkujących połączonych z rurką nebulizatora (czyli bez filtra) zostało odpowiednio rozcieńczona w PBMA i umieszczona (0,1 ml) na duplikatach płytek tryptonowo-sojowo-agarowych (TSA). Płytki TSA zostały zainkubowane w temperaturze 37°C przez 18 godzin i zliczono wszystkie pomarańczowe kolonie. Odpowiednio rozcieńczone zawiesiny (0,1 ml) cieczy zbierającej z każdego próbnika umieszczonego za filtrem zostały również rozprowadzone na duplikatach płytek TSA i płytki te zainkubowano w temperaturze 37°C przez 18 godzin i zliczono wyróżniające się pomarańczowe kolonie.

Assay of MS-2 coliphage in various suspensions and collecting fluids

Nowa płytka TSA została obciążona *Escherichia coli* NCIMB 9481 z płytki magazynującej, którą wcześniej przechowywano w temperaturze $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Tę płytkę inkubowano w temperaturze $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ przez 19-20 godzin. *E. coli* 9481 została przeszczepiona poprzez przeniesienie za pomocą ezy 10 μl z płytki do 10 ml sterylnego bulionu w szklanej butelce uniwersalnej. Po zmieszaniu uniwersalna butelka została zainkubowana w temperaturze $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ przez 260 minut przed użyciem. W międzyczasie zamknięte butelki zawierające objętość 3 ml odpowiedniego agaru powierzchniowego były ogrzewane przez przynajmniej 90 minut do temperatury przynajmniej 90 do 100°C , a później przechowywane w temperaturze $60 \pm 2^{\circ}\text{C}$ do momentu wykorzystania. Wówczas te butelki schłodzono do temperatury 45°C przed użyciem. Prawidłowo rozcieńczona zawiesina MS-2 w PBMA (100 μl) została dodana do odpowiedniego agaru powierzchniowego, a następnie natychmiast dodano 3 krople zawiesiny *E. coli* 9481 przy pomocy pipety Pasteura 50 D (20 μl na kople). Po zmieszaniu natychmiast ją rozlano na płytce TSA. Pobrano duplikaty próbek (wybrane rozcieńczenie powinno wystarczyć na 30 do 100 jednostek określających miano wirusa (pfu) na płytkę). Płytki były inkubowane w temperaturze $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ przez noc. Zliczono czyste łysinki.

Określanie wydajności filtra

Wydajność filtra wyraża się następująco:

- Wydajność procentowa. Definiuje się ją następująco:

cfu lub pfu zebrane bez założonego filtra - cfu lub pfu zebrane z założonym filtrem $\times 100$

cfu lub pfu zebrane bez założonego filtra

WYNIKI

Wyniki obciążenia filtrów aerozolem z cząsteczkami bakteryjnymi i wirusowymi z prędkością 750 litrów/minutę przedstawiono odpowiednio w Tabeli 1 i 2.

TABELA 1 TESY INTEGRALNOŚCI FILTRA OBCIĄŻONEGO *B. ATROPHAEUS*

Data	lipiec 2010	Mikroorganizm obciążenia	<i>Bacillus atrophaeus</i>
Prowadzący	A. Moy	Ciecz zawiesiny	woda destylowana
Urządzenie testowe	Małe stanowisko badawcze	Stężenie	5.00×10^9 cfu/ml
Nebulizator	3-dyszowy Collison		

Testowane filtry:	5 x filtr oddechowy CareFusion MicroGard II, partia: M190-19 nr ref.: 892190
-------------------	--

Czas próbkowania	5	min. przy	750	litrów/min.	Próbnik	całkowicie szklany impinger
------------------	---	-----------	-----	-------------	---------	-----------------------------

Ciecz zbierająca	PBMA	Objętość	Zmienna	ml
------------------	------	----------	---------	----

Filtr	Obciążenie (cfu)	Zebrane za filtrem (cfu)	% Wydajności
F1	$1,0450 \times 10^9$	$3,1958 \times 10^7$	96,9418
F2	$1,3266 \times 10^9$	$2,4468 \times 10^7$	98,1556
F3	$8,9100 \times 10^8$	$2,6656 \times 10^7$	97,0083
F4	$9,0090 \times 10^8$	$2,6784 \times 10^7$	97,0270
F5	$9,2070 \times 10^8$	$2,9124 \times 10^7$	96,8368

cfu - jednostki tworzące kolonię

TABELA 2 TESY INTEGRALNOŚCI FILTRA OBCIĄŻONEGO *FAGAMI PAŁECZKI OKRĘŻNICY MS-2*

Data	lipiec 2010	Mikroorganizm obciążenia	<i>fag pałeczki okrężnicy MS-2</i>
Prowadzący	A. Moy	Ciecz zawiesiny	50%-owy bulion pożywki
Urządzenie testowe	Małe stanowisko badawcze	Stężenie	$3,55 \times 10^{11}$ pfu/ml
Nebulizator	3-dyszowy Collison		

Testowane filtry:	5 x filtr oddechowy CareFusion MicroGard II, partia: M190-19 nr ref.: 892190
-------------------	--

Czas próbkowania	5	min. przy	750	litrów/min.	Próbnik	Cyclone
------------------	---	-----------	-----	-------------	---------	---------

Ciecz zbierająca	PBMA	Objętość	Zmienna	ml
------------------	------	----------	---------	----

Filtr	Obciążenie (cfu)	Zebrane za filtrem (cfu)	% Wydajności
F1	$2,2144 \times 10^9$	$3,7976 \times 10^7$	98,3592
F2	$2,1303 \times 10^9$	$2,3760 \times 10^7$	98,8847
F3	$2,5248 \times 10^9$	$2,9988 \times 10^7$	98,8123
F4	$2,6826 \times 10^9$	$1,4738 \times 10^7$	99,4506
F5	$1,4465 \times 10^9$	$3,8232 \times 10^7$	97,3569

pfu – plaque forming unit

PIŚMIENNICTWO

1. PHILLIP, I., and SPENCER, G. (1965). Pseudomonas aeruginosa cross-infection due to contaminated respiratory apparatus. Lancet ii, 1365-1367.

2. HENDERSON, D. W. (1952). An apparatus for the study of airborne infections. J. Hyg. Camb. 50, 53-67.
3. DRUETT, H. A. (1969). A mobile form of the Henderson apparatus. J.Hyg. Camb. 67, 437-448.
4. HINDS, W. C. (1982). Properties, behaviour and measurement of airborne particles. In "Aerosol Technology". Published by John Wiley & Sons, New York.
5. ANDERSEN, A. A. (1958). New sampler for the collection, sizing and enumeration of viable particles. J.Bacteriol. 76, 471-484.
6. DUBOVI, E. J. and AKERS, T. G. (1970). Airborne stability of tailless bacterial viruses S-13 and MS-2. Appl. Microbiol. 19, 624-628.
7. SHARP, R. J., SCAWEN, M. D. and ATKINSON, A. (1989). Fermentation and downstream processing of Bacillus. In "Bacillus". Edited by C. R. Harwood, Plenum Publishing Corporation.
8. MAY, K. R. (1973). The Collison nebulizer. Description, performance and application. Aerosol Sci. 4, 235-243.
9. DECKER, H.M., BUCHANAN, L.M., FRISQUE, D.E., FULLER, M.E. and DAHLAGEN, C.M. (1969). Advances in large volume air sampling. Contamination Control, August 13-17