ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р ЕН 12469— 2010

БИОТЕХНОЛОГИЯ. ТЕХНИЧЕСКИЕ ТРЕБОВАНИЯ К БОКСАМ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ

EN 12469:2000
Biotechnology — Performance criteria for microbiological safety cabinets (IDT)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2011

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели и принципы стандартизации в Российской Федерации установлены Федеральным законом от 27 декабря 2002 г. № 184-ФЗ «О техническом регулировании», а правила применения национальных стандартов Российской Федерации — ГОСТ Р 1.0—2004 «Стандартизация в Российской Федерации. Основные положения»

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН Общероссийской общественной организацией «Ассоциация инженеров по контролю микрозагрязнений» (АСИНКОМ) и ЗАО «Ламинарные системы» на основе собственного аутентичного перевода на русский язык европейского регионального стандарта, указанного в пункте 4

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 184 «Обеспечение промышленной чистоты»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 29 декабря 2010 г. № 1144-ст

4 Настоящий стандарт идентичен европейскому региональному стандарту ЕН 12469:2000 «Биотехнология. Технические требования к боксам микробиологической безопасности» (EN 12469:2000 «Biotechnology — Performance criteria for microbiological safety cabinets»).

При применении настоящего стандарта рекомендуется использовать вместо ссылочных международных стандартов соответствующие им национальные стандарты Российской Федерации и межгосударственные стандарты, сведения о которых приведены в дополнительном приложении ДА

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячно издаваемых информационных указателях «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет

© Стандартинформ, 2011

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Содержание

1 Область применения . . . 1
2 Нормативные ссылки . . . 1
3 Термины и определения . . . 1
4 Виды биологической опасности . . . 2
5 Виды исполнения БМБ . . . 2
6 Испытания боксов . . . 4
7 Требования по безопасности . . . 7
8 Маркировка и упаковка . . . 8
9 Документация . . . 8
Приложение А (справочное) Руководство по выбору материалов, конструкции и изготовлению . . . 9
Приложение В (обязательное) Испытание боксов классов I и II на утечку . . . 11
Приложение С (обязательное) Проверка эффективности удержания в рабочем проеме бокса . . . 12
Приложение D (справочное) Метод испытания установленных HEPA фильтров для выявления проскока (утечки) с помощью аэрозоля . . . 19
Приложение Е (обязательное) Контроль эффективности защиты продукта в боксах класса II . . . 20
Приложение F (обязательное) Контроль эффективности защиты от перекрестных загрязнений в боксах класса II . . . 21
Приложение G (справочное) Определение расхода воздуха . . . 22
Приложение Н (справочное) Конструкция БМБ и скорость воздушных потоков в них . . . 24
Приложение J (справочное) Рекомендации по дезинфекции (стерилизации), очистке и фумигации (обработке газом) боксов и фильтров . . . 25
Приложение К (справочное) Техническое обслуживание боксов . . . 27
Приложение ДА (справочное) Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов ссылочным национальным стандартам Российской Федерации (и действующим в этом качестве межгосударственным стандартам) . . . 28
Библиография . . . 29

Введение

Боксы микробиологической безопасности предназначены для уменьшения риска заражения оператора во время работы с опасными или потенциально опасными микроорганизмами. Боксы не защищают оператора от всех видов опасности. Некоторые виды боксов также защищают материалы, с которыми ведутся работы, от загрязнений окружающей среды.

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

БИОТЕХНОЛОГИЯ.

ТЕХНИЧЕСКИЕ ТРЕБОВАНИЯ К БОКСАМ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ

Biotechnology.
Performance criteria for microbiological safety cabinets

Дата введения — 2011—12—01

1 Область применения

Настоящий стандарт содержит основные рекомендации для боксов микробиологической безопасности (БМБ) с учетом норм безопасности и гигиены, устанавливает минимум технических требований к БМБ для работы с микроорганизмами и дает описание процедуры контроля БМБ с учетом защиты оператора и окружающей среды, защиты продукта от перекрестных загрязнений.

Стандарт не устанавливает требований к электрической, химической, радиоактивной и другим видам безопасности, которые даны в [1], [2] и [3].

2 Нормативные ссылки

Настоящий стандарт содержит ссылки на различные документы и публикации, которые находятся в соответствующих местах текста. Для действующих документов к использованию рекомендуется самое позднее издание публикации.

ЕН 1822-1, Высокоэффективные фильтры очистки воздуха EPA, HEPA и ULPA. Часть 1. Классификация, методы испытаний, маркировка (EN 1822-1, High efficiency air filters (EPA, HEPA and ULPA) — Part 1: Classification, performance testing, marking)

ЕН 12296, Биотехнология. Оборудование. Методы контроля эффективности очистки (EN 12296, Biotechnology — Equipment — Guidance on testing procedures for cleanability)

ЕН 12297, Биотехнологии. Оборудование. Руководство по процедуре испытаний для контроля стерилизуемости (EN 12297, Biotechnology — Equipment — Guidance on testing procedures for sterilizability)

ЕН 12298, Биотехнология. Оборудование. Руководство по процедурам испытаний на герметичность (EN 12298, Biotechnology — Equipment — Guidance on testing procedures for leaktightness)

ЕН 13091:1999, Биотехнология. Критерии эксплуатационных характеристик для фильтрующих элементов и фильтров (EN 13091:1999, Biotechnology — Performance criteria for filter elements and filtration assemblies)

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 **фактор защиты рабочего проема (A_{pf})** (aperture protection factor, A_{pf}): Отношение концентрации аэрозоля на внешней стороне рабочего проема к концентрации аэрозоля, диспергированного внутри бокса.

3.2 **перекрестные загрязнения** (cross contamination): Непреднамеренное попадание загрязнений химического или микробиологического характера с одного материала или продукта на другой материал или продукт.

Издание официальное

3.3 **бокс микробиологической безопасности, БМБ** (microbiological safety cabinet, MSC): Вентилируемое ограниченное пространство, предназначенное для обеспечения защиты оператора и окружающей среды от аэрозолей, возникающих вследствие работы с потенциально опасными и опасными микроорганизмами, с помощью удаления воздуха в атмосферу путем фильтрации.

3.4 **БМБ класса I** (MSC class I): БМБ с рабочим проемом, через который оператор может проводить манипуляции внутри бокса. Бокс должен быть сконструирован таким образом, чтобы обеспечить защиту оператора от выброса диспергированных контаминированных частиц, образовавшихся внутри бокса. Это достигается с помощью направленного внутрь бокса через рабочий проем воздушного потока с последующей его фильтрацией и удалением из бокса.

3.5 **БМБ класса II** (MSC class II): БМБ с рабочим проемом, через который оператор может проводить манипуляции внутри бокса. Бокс должен быть сконструирован таким образом, чтобы оператор был защищен, риск загрязнения продукта и перекрестного загрязнения был низок, а удаление возникающих загрязнений обеспечивалось с помощью профильтрованного воздушного потока, циркулирующего внутри бокса, а также с помощью фильтрации удаляемого из бокса воздуха.

Примечание — Обычным способом обеспечения защиты является создание однонаправленного нисходящего ламинарного воздушного потока внутри бокса и воздушной завесы в рабочем проеме.

3.6 **БМБ класса III** (MSC class III): БМБ, в котором рабочая зона полностью изолирована, а оператор отделен от рабочего места физическим барьером (т.е. перчатки механически соединены с боксом). Профильтрованный воздух постоянно поступает в бокс, а удаляемый из БМБ воздух фильтруется для предотвращения попадания микроорганизмов в окружающую среду.

Примечания

1 Соответствующие требования этого стандарта для БМБ класса III следует применять при их изготовлении на основе жестких или гибких конструкционных материалов. Другие данные по конструкционным материалам приведены в [4].

2 Бокс может иметь по крайней мере две последовательные ступени фильтрации, оснащенные высокоэффективными воздушными фильтрами, для удаления воздуха через вытяжную систему бокса в окружающую среду.

3.7 **защита продукта** (product protection): Способность БМБ предотвращать аэрозольное загрязнение продукта из окружающей среды через рабочий проем.

3.8 **эффективность удержания** (retention efficiency): Способность воздушного барьера удерживать микроорганизмы и/или аэрозоль, выражаемая отношением концентраций индикаторного аэрозоля внутри рабочего объема бокса и в окружающей среде.

Примечание — Для БМБ безопасность оператора, среды и продукта достигается различными видами барьеров, такими как корпус, фильтры или соответствующее направление потока. Функцией таких барьеров является предотвращение или минимизация перемещения микроорганизмов/аэрозолей между смежными пространствами, разделенными барьером. В зависимости от цели проводимой работы контролируемым объектом могут служить рабочая зона бокса, воздушный поток, поступающий на фильтр, или окружающая среда лабораторного помещения.

3.9 **рабочая зона** (working place): Часть внутреннего пространства бокса, в которой проводятся операции.

4 Виды биологической опасности

Необходимо учесть возникновение следующих видов биологической опасности:

- проникновение микроорганизмов во время работы, например, через рабочий проем, вытяжной воздуховод, воздуховод или корпус;
- выделение микроорганизмов во время демонтажа или технического обслуживания, например при замене фильтра или частей бокса, вследствие ненадлежащей стерилизации;
- высвобождение микроорганизмов при удалении загрязненного материала из бокса вследствие перекрестного загрязнения или загрязнения от продукта.

5 Виды исполнения БМБ

5.1 Виды исполнения БМБ по герметичности

Виды исполнения боксов по герметичности представлены в таблице 1.

Таблица 1 — Виды исполнения боксов по герметичности

Вид исполнения по герметичности. Индекс герметичности (LI)	Требования к виду исполнения
LI-A	Требования к утечке конкретных микроорганизмов не устанавливаются
LI-B	Утечка[1)] конкретных микроорганизмов проверяется. Величина ее определяется в конкретных условиях
LI-C	Утечка[1)] конкретных микроорганизмов проверяется при определенных условиях. Утечка должна быть ниже предела обнаружения или порогового значения[2)]
[1)] Основана на методе оценки утечки, проведенной в BATNEEC («Наилучшая доступная техника, не вызывающая чрезмерных затрат»)*. [2)] Нормируемое пороговое значение основано на требуемом уровне безопасности и может являться, например, пределом обнаружения в соответствии с BATNEEC.	

5.2 Приспособленность к очистке

Виды исполнения боксов по критерию приспособленности к очистке представлены в таблице 2.

Таблица 2 — Виды исполнения боксов по критерию приспособленности к очистке

Вид исполнения по критерию приспособленности к очистке. Индекс приспособленности к очистке (CI)	Требования к виду исполнения
CI-A	Требования к видимым загрязнениям или чистоте не устанавливаются
CI-B	Приспособленность к очистке[1)] установлена и проверена при определенных условиях или же бокс сконструирован с учетом особых технических требований
CI-C	Приспособленность к очистке[1)] проверяется и оценивается при определенных условиях. Загрязнения должны быть ниже предела обнаружения или порогового значения[2)]
[1)] Основана на методе оценки утечки, проведенной в BATNEEC («Наилучшая доступная техника, не вызывающая чрезмерных затрат»)*. [2)] Нормируемое пороговое значение основано на требуемом уровне безопасности и может быть, например, пределом обнаружения в соответствии с BATNEEC.	

Вид исполнения по критерию приспособленности к очистке для всех классов БМБ должен быть CI-B или выше.

Требования по приспособленности к очистке предъявляются для тех БМБ, в которых:

- наличие загрязнений может поставить под угрозу процесс стерилизации бокса в случае, когда стерилизующий агент может не проникнуть во все части бокса или если в некоторых местах бокса не достигается требуемая температура стерилизации;
- мероприятия по удалению загрязнений являются единственным способом удаления и инактивации микроорганизмов с целью обеспечить безопасность бокса без проведения каких-либо других процедур стерилизации или процессов инактивации.

5.3 Приспособленность к стерилизации

Виды исполнения боксов по критерию приспособленности к стерилизации представлены в таблице 3.

---

* Использование BATNEEC не означает, что вложение финансовых затрат снижает степень безопасности. Там, где доступны несколько методов, пользователь может выбрать самые подходящие, обеспечивающие необходимое качество.

Таблица 3 — Виды исполнения боксов по критерию приспособленности к стерилизации

Вид исполнения по критерию приспособленности к стерилизации. Индекс приспособленности к стерилизации (SI)	Требования к виду исполнения
SI-A	БМБ не пригоден или не испытан на возможность удержания конкретных микроорганизмов
SI-B	БМБ может быть использован для удержания конкретных видов жизнеспособных микроорганизмов
SI-C	БМБ может подвергаться стерилизации
Примечание — В данной таблице описан результат процедуры инактивации, а не способ и средства достижения результата.	

Вид исполнения по критерию приспособленности к стерилизации для всех классов БМБ должен быть SI-B или выше.

5.4 Минимальные требования по исполнению боксов в зависимости от класса бокса

В таблице 4 представлены требования по исполнению боксов с учетом требований по герметичности и изоляции микроорганизмов для трех классов БМБ.

Таблица 4 — Минимальные требования по исполнению для трех классов БМБ

Класс бокса	Защита рабочего проема[1)]	Герметичность	Защита продукта	Перекрестные загрязнения
I	≤ 10 КОЕ в пробе[2)] при работе оператора и ≤ 5 КОЕ[3)] или $A_{pf} \geq 1 \cdot 10^5$	LI-C для корпуса	Не применяется	Не применяется
II	≤ 10 КОЕ в пробе при работе[2)] оператора и ≤ 5 КОЕ[3)] или $A_{pf} \geq 1 \cdot 10^5$	LI-C для корпуса	≤ 5 КОЕ в пробе	≤ 2 КОЕ в пробе
III	Не применяется	Падение начального избыточного давления 500 Па во всей замкнутой системе через 30 мин ≤ 10 %	Не предусматривается	Не предусматривается

[1)] Выраженное в A_{pf} или величина микроорганизмов в пробе.
[2)] В рабочей зоне оператора.
[3)] С боковых сторон и во входящем потоке в рабочем проеме (передней панели).

6 Испытания боксов

6.1 Общие положения

БМБ, отвечающие требованиям настоящего стандарта, должны соответствовать видам исполнения, указанным в таблицах 1—3. Соответствие подтверждает изготовитель или потребитель.

Различают три типа испытаний:

- испытание для определения принадлежности бокса к соответствующему классу (I, II, III);
- испытание после монтажа, в том числе при смене места установки бокса, либо при изменении внешних условий;
- испытание в процессе технического обслуживания.

Внешний вид, конструкция и материалы БМБ должны соответствовать требованиям безопасности при работе в боксе. Освещение, уровень звукового давления, вибрация, стабильность параметров, температура, электро- и газоснабжение должны соответствовать требованиям безопасности при работе в боксе. Боксы должны быть оснащены системой непрерывного контроля безопасных условий работы или их нарушения.

Примечание — Руководство по достижению этих условий приведено в приложении А.

6.2 Испытания на герметичность

6.2.1 Основные положения

БМБ должны быть испытаны на герметичность в соответствии с ЕН 12298. Требования к герметичности и удержанию в рабочем проеме даны в таблице 4. Испытания проводятся при характерных условиях процесса. Два основных требования по контролю утечки микроорганизмов из боксов описаны в 6.2.2 и 6.2.3.

Примечание — Метод испытания на утечку корпуса описан в приложении В. Метод испытания на удержание в рабочем проеме описан в приложении С. Может быть использован любой другой метод испытаний, если установлена и подтверждена корреляция с этими методами испытаний.

6.2.2 Испытание на герметичность

6.2.2.1 Требования к герметичности корпуса бокса (классы безопасности I и II)

БМБ должны соответствовать требованиям, указанным в таблице 4. Корпус бокса, в котором загрязненный воздух находится при повышенном давлении и может выйти наружу, должен быть испытан на герметичность. Боксы должны быть исследованы на утечку при повышенном давлении.

6.2.2.2 Требования к герметичности корпуса бокса (класс безопасности III)

Проектируемое рабочее давление в боксе должно быть минимум на 200 Па ниже давления воздуха в лаборатории. БМБ должны соответствовать требованиям, указанным в таблице 4.

6.2.3 Требования к герметичности бокса при разливе жидкости в рабочей камере

БМБ должны иметь соответствующие конструктивные решения, обеспечивающие возможность сбора разлившейся жидкости.

6.2.4 Общие требования к испытаниям

При испытании боксов после монтажа и в процессе регулярного технического обслуживания боксов могут быть использованы прямые или непрямые методики испытания (например, при определении объема поступающего или удаляемого из бокса воздуха).

Примечание 1 — В таблице 5 представлены перечень и методы испытаний для аттестации боксов при трех типах испытаний: на соответствие классу, после монтажа и в процессе регулярного технического обслуживания.

Испытание после монтажа следует проводить в случае, когда боксы были установлены впервые, при изменении установки или при изменении условий окружающей среды. Если в помещении установки бокса изменилась система вентиляции, то проведения повторного испытания в полном объеме не требуется, если пользователь может продемонстрировать, подтвердить и документально удостоверить, что среда и установка боксов соответствуют требованиям изготовителя, т. е. условиям, при которых проводилась проверка бокса на соответствие классу. В этом случае испытанию подлежат фильтры бокса. Требуются также определение объемов потоков воздуха и визуализация воздушных потоков в качестве дополнения к испытанию на удержание в рабочем проеме.

Примечание 2 — Необходимо обратить внимание на соответствующие международные правила, касающиеся испытания при регулярном техническом обслуживании.

6.3 Приспособленность к очистке

БМБ должны быть проверены на возможность обеспечивать их очистку в соответствии с ЕН 12296. Все углы внутри рабочей зоны бокса и другие доступные места, контактирующие с микроорганизмами, должны иметь закругления для проведения очистки. При визуальном контроле поверхностей внутри рабочей зоны бокса без средств увеличения не должно быть обнаружено трещин и других дефектов.

6.4 Приспособленность к стерилизации

БМБ должны быть проверены на возможность их стерилизации в соответствии с ЕН 12297.

Примечание — Приложение J содержит описание метода проведения фумигации боксов.

Таблица 5 — Состав и методы испытаний боксов в зависимости от типа испытаний: на соответствие классу, после монтажа и при техническом обслуживании (для боксов классов I и II)

Тип испытаний	Проверка				
	на удержание в рабочем проеме	на герметичность корпуса	фильтров*	на защиту продукта (только класс II)	на перекрестные загрязнения (только класс II)
Испытания на соответствие классу	- микробиологический метод или метод KI (см. приложение C)	- метод испытания мыльным раствором (см. приложение B)	- метод испытания аэрозолями (см. приложение D)	- микробиологический метод (см. приложение E)	- микробиологический метод (см. приложение F)
Испытания после монтажа	- проверить соблюдение требований изготовителя; - проверить расход установившегося воздушного потока (см. приложения G и H); - проверить движение установившегося воздушного потока (визуально, см. приложение H); - при необходимости провести испытание на удержание в рабочем проеме [микробиологический метод (см. приложение C) или альтернативные методы, такие как KI, светорассеяние]	Не применяется	- метод испытания аэрозолями (см. приложение D); или, если необходимо, - метод испытания микробными аэрозолями*	- проверить соблюдение требований изготовителя; - проверить расход установившегося воздушного потока (см. приложения G и H); - проверить движение установившегося воздушного потока (визуально, см. приложение H); - при необходимости провести испытание на эффективность защиты продукта [микробиологический метод (см. приложение E) или альтернативные методы, такие как методика с применением йодида калия, рассеивание света (после аттестации)]	- проверить соблюдение требований изготовителя
Испытания при техническом обслуживании (см. приложение K)	- проверить соблюдение требований изготовителя; - проверить расход установившегося воздушного потока (см. приложения G и H); - проверить движение установившегося воздушного потока (визуально, см. приложение H)	Не применяется	- то же, что и для испытания после монтажа	- проверить соблюдение требований изготовителя; - проверить расход установившегося воздушного потока (см. приложения G и H); - проверить движение установившегося воздушного потока (визуально, см. приложение H)	- проверить соблюдение требований изготовителя; - проверить расход установившегося воздушного потока (см. приложения G и H); - проверить движение установившегося воздушного потока (визуально, см. приложение H)

* Информация по фильтрам дана в ЕН 13091:1999.

Примечание — Национальные правила могут требовать оценки риска и выдвигать дополнительные требования в особых случаях, например, если используются особо опасные микроорганизмы или существует более высокая степень опасности заражения аэрогенным путем.

7 Требования по безопасности

7.1 Герметизация отверстий

Должна существовать возможность герметизации всех отверстий БМБ классов I, II и III, например, для фумигации и дезинфекции.

Должна быть предусмотрена возможность герметизации входного отверстия бокса в зоне фильтра для БМБ класса III. Герметизация должна позволять проводить испытание бокса давлением.

7.2 Сигнализация опасности

Для БМБ классов I, II и III должны быть предусмотрены звуковые и визуальные индикаторы сигнала опасности.

Примечание 1 — Для этой цели не должен использоваться манометр, показывающий падение давления на фильтре.

Визуальные индикаторы должны быть видны с рабочего места оператора. Индикаторы сигнала опасности должны активироваться, когда параметры воздушных потоков отклоняются от параметров, указанных производителем. Границы порога отклонения должны быть указаны в документации на бокс (см. приложение К). При включении бокса сигналы опасности должны автоматически включаться и быть активны до тех пор, пока не установятся необходимые воздушные потоки.

Примечание 2 — Во время пуска оператор должен иметь возможность при необходимости отключать звуковые сигналы опасности.

Оператор не должен иметь возможности отключать сигналы опасности во время рабочего режима эксплуатации бокса.

7.3 Защита окружающей среды

Каждый бокс должен быть сконструирован таким образом, чтобы воздух, удаляемый из бокса, был очищен высокоэффективными воздушными фильтрами (HEPA фильтрами), соответствующими требованиям ЕН 13091:1999, класса не ниже Н14 по ЕН 1822-1.

Примечания

1 При необходимости бокс может быть сконструирован таким образом, чтобы удаление воздуха из бокса осуществлялось через две ступени фильтрации с HEPA фильтрами. При этом должна быть предусмотрена возможность проверки каждого из фильтров по отдельности.

2 Боксы, выброс отфильтрованного воздуха из которых осуществляется в помещение, где бокс установлен, должны иметь приспособление для организации удаления воздуха с дезинфицирующим газом из помещения, где бокс установлен, при фумигации бокса.

7.4 Система вытяжки и предотвращения возврата воздуха в БМБ

Когда бокс присоединен к внешней системе вытяжки, то должны быть предприняты меры для предотвращения возврата воздушного потока в бокс. Изготовитель должен предусмотреть в выпускной системе бокса технические элементы, обеспечивающие рабочие характеристики бокса, с учетом системы отвода воздуха.

Примечание — Бокс должен быть оборудован визуальными индикаторами (см. приложение К).

7.5 Фильтры для приточного и удаляемого воздуха

В боксах следует применять HEPA фильтры, соответствующие требованиям ЕН 13091:1999, класса Н14 или выше по ЕН 1822-1. Фильтры должны быть установлены надежным образом.

Примечание 1 — Внутренние зоны бокса, по которым проходит загрязненный воздух с повышенным давлением, должны быть окружены воздушными каналами с пониженным давлением воздуха.

Фильтры должны быть смонтированы таким образом, чтобы исключить протекание воздуха, минуя фильтры.

Примечание 2 — Воздуховод, содержащий загрязненный воздух, должен быть максимально коротким, а вытяжной фильтр расположен как можно ближе к рабочей зоне для обеспечения эффективной дезинфекции. Для продления срока службы основного фильтра может быть установлен предварительный фильтр, который должен быть легкодоступен.

Лючки для отбора проб при испытании фильтра должны быть расположены так, чтобы мог быть эффективно испытан весь фильтр, места герметизации, прокладки и конструкционные стыки.

Если установлено более одного фильтра, то порты должны позволять проводить проверки каждого фильтра отдельно. Порты должны быть герметичными.

Если боксы снабжены двухступенчатой системой фильтрации, то необходимо обеспечивать возможность проверки каждого фильтра и соответствующих мест по отдельности.

Бокс должен быть испытан с использованием продуманной и хорошо документированной процедуры проверки на герметичность для установленных HEPA фильтров путем контроля утечки со стороны чистой поверхности HEPA фильтров, мест герметизации, прокладок и конструкционных стыков. Соответствующий метод указан в приложении D.

7.6 Объемный расход воздуха и параметры вентиляции (класс III)

Скорость воздушного потока через каждый открытый перчаточный порт только с одной снятой перчаткой должна быть минимум 0,7 м/с. Соответствующий метод указан в приложении G.

Объемный расход воздуха через приточный фильтр должен составлять не менее 0,05 $м^3$/с в расчете на каждый кубический метр объема бокса при установленных перчатках, а давление в боксе должно быть пониженным относительно атмосферного не менее чем на 200 Па. Соответствующий метод измерения воздушного потока указан в приложении G.

7.7 Мониторинг давления в боксе (класс III)

Для обеспечения визуального наблюдения за давлением внутри бокса в бокс должен быть встроен манометр, предназначенный для измерения давления от – 500 Па до + 500 Па.

8 Маркировка и упаковка

Каждый БМБ должен быть промаркирован таким образом, чтобы можно было удостовериться в том, что его исполнение соответствует требованиям настоящего стандарта. Если маркировка бокса или его элемента (например, из-за его размера или назначения) не применяется, то должна быть промаркирована упаковка. Маркировка БМБ должна быть стойкой и четкой и содержать следующую информацию:

a) класс БМБ;

b) наименование и адрес изготовителя;

c) номер и дату издания настоящего стандарта, т.е. ГОСТ Р ЕН 12469—2010;

d) модель и номер по каталогу с указанием серийного номера;

e) электрическое напряжение, частоту и мощность потребляемой энергии;

f) размеры рабочей зоны;

g) год изготовления.

9 Документация

Изготовитель или поставщик должен предоставить документы по эксплуатации, описывающие операционные процедуры, которые позволяют БМБ работать в соответствии с его установленным классом.

Пользователь должен сохранять документацию, которая показывает текущее состояние бокса и его проверку, включая:

a) документ, подтверждающий соответствие бокса настоящему стандарту; протокол испытаний HEPA фильтров на утечку в месте эксплуатации;

b) методику испытаний и применяемое оборудование;

c) инструкцию по монтажу и эксплуатации;

d) инструкцию по техническому обслуживанию и замене фильтров, включая декларацию о необходимости соответствующей дезинфекции (стерилизации) бокса;

e) схему, показывающую направления потоков воздуха в боксе;

f) документ, описывающий границы рабочей зоны и зон (например, рядом с рабочим проемом), которые не защищены;

g) инструкции по дезинфекции и очистке бокса и использованию соответствующих дезинфицирующих средств;

h) документ, описывающий диаметр манжеты перчатки и иные параметры, соответствующие размеру перчаточного порта (для боксов класса биологической защиты III класса).

Приложение А
(справочное)

Руководство по выбору материалов, конструкции и изготовлению

А.1 Высота рабочего проема

Высота рабочего проема (проемов) должна быть 160—250 мм от плоскости рабочей зоны. Вертикальная подъемная рама, если она предусмотрена конструкцией бокса, должна быть сконструирована таким образом, чтобы она не могла упасть и подвергнуть опасности оператора в случае, если подвесная система выйдет из строя. Должна быть предусмотрена система подачи сигнала тревоги или блокирующая система в случае выхода подъемной рамы за пределы нормированной высоты рабочего проема передней панели.

А.2 Освещение

Освещение должно соответствовать условиям безопасной работы внутри бокса. Освещение, измеренное на рабочей поверхности, должно составлять не менее 750 люкс. В боксах микробиологической безопасности ультрафиолетовое облучение (УФ-облучение) использовать не рекомендуется. Однако если требуется, оно должно быть установлено так, чтобы не создавало помех воздушному потоку и эффективности изоляции микроорганизмов в боксе. Для конструкции бокса следует использовать материалы, устойчивые к воздействию УФ-облучения. Для предотвращения прямого воздействия УФ-облучения на оператора во время работы в боксе должна быть предусмотрена электрическая блокировка.

А.3 Шум

Уровень шума в боксе должен быть достаточно низок, чтобы не отвлекать внимание оператора. При проверке уровня шума в соответствии с [5] с помощью измерителя уровня шума его следует располагать на расстоянии 1,0 м от центра рабочего проема или на расстоянии 1,0 м с любой стороны бокса внутри лаборатории. При этом уровень звукового давления А, генерируемого боксом, не должен превышать 65 дБ, в то время как уровень звукового давления А с задней стороны не должен превышать 55 дБ. Если уровень звукового давления с задней стороны превышает 55 дБ, то необходимо принять меры, чтобы уровень звукового давления А бокса не превышал 65 дБ.

Уровень звукового давления А может быть также определен в соответствии с [6]. Измерение проводится в месте расположенной на расстоянии 0,2 м от центра рабочего проема передней панели бокса и 1,0 м от любой плоскости бокса внутри лаборатории. Если измерение проводится с задней стороны, то необходимый уровень звукового давления может быть достигнут путем изменения высоты рабочего проема передней панели (см. А.1). Уровень звукового давления должен быть указан в соответствии с [7] в руководстве по эксплуатации и в предоставленном в распоряжение потребителя техническом описании с погрешностью К = 2 дБ.

А.4 Вибрация

Во время работы бокса при рекомендованной производителем скорости потока воздуха величина смещения в результате вибрации в центре рабочей поверхности в промежутке частот между 20 и 20 000 Гц не должна превышать 0,005 мм амплитуды, определяемой методом RMS (Remote Measurement System — система для дистанционных измерений). Соответствующий метод измерения вибрации указан в [8].

А.5 Устойчивость

БМБ должны соответствовать требованиям [1], [2] и [3] по устойчивости. Боксы должны быть сконструированы для установки на полу или на столе соответствующим и безопасным способом.

А.6 Общие требования к материалам

Материалы, применяемые при конструировании боксов, предназначенных для работы с микроорганизмами, должны быть устойчивыми к коррозии, негорючими и неадсорбирующими.

Примечания

1 Изготовитель должен применять материалы, устойчивые к фумигации и дезинфекции.

2 В качестве материала не следует использовать древесно-стружечную плиту.

Материалы и герметики для стыков должны быть прочными и устойчивыми к воздействию средств очистки и дезинфекции, а также не влиять на рабочий процесс в боксах.

Примечание 3 — Должны удовлетворяться следующие требования.

a) в боксах следует применять синтетический двухкомпонентный быстрополимеризующийся клей, термически устойчивый и с высокой адгезионной способностью или иной соответствующий требованиям, применяемый в соответствии с рекомендациями производителя;

b) в боксах следует применять однокомпонентный герметик, используемый в соответствии с рекомендациями производителя (например, силикон или акрил).

Материалы, применяемые при конструировании БМБ, должны быть стойкими к обработке формальдегидом.

А.7 Стекло и рабочие проемы

Следует использовать ламинированное безопасное стекло или устойчивый к воздействию УФ-облучения безопасный пластик, который обладает необходимой долговечностью на период полного срока службы бокса. Должны быть учтены воздействие внешней и внутренней среды, которому будет подвержено стекло, и способ остекления.

Стекло должно соответствовать [2] и [3]. Должны быть предусмотрены средства для удержания стекла в открытом и безопасном положении для установки оборудования перед началом работы.

Если конструкцией бокса предусмотрена вертикальная подъемная рама, она должна быть сконструирована таким образом, чтобы рама не могла упасть и подвергнуть опасности оператора при выходе из строя подвесной системы.

Примечание — В рабочем положении размеры и углы наклона стекла должны обеспечивать беспрепятственный обзор рабочей зоны, когда оператор сидит по центру бокса.

Система подачи звуковых и визуальных сигналов тревоги должна точно контролировать рабочее положение стекла, что служит гарантией правильной работы бокса.

А.8 Электрическая безопасность

Основные требования по электрической безопасности указаны в [1].

А.9 Безопасная подача газа

БМБ должны соответствовать требованиям безопасной подачи газа, содержащимся в [2] и [3]. Если газ подается внутрь бокса, то вентили подачи должны быть помечены специальным цветом.

Подача горючего газа внутрь бокса должна контролироваться соответствующим вентилем, который может открываться оператором только во время работы бокса и который остается закрытым при всех других условиях.

Примечания

1 Горелки с пьезоэлектрическими системами розжига, генерирующие пламя только при необходимости и управляемые ногой оператора, предпочтительнее горелок Бунзена.

2 Не рекомендуется использовать горелки Бунзена внутри боксов, но при необходимости надо использовать ножной способ управления уровнем пламени для подачи полного пламени только в необходимые моменты, чтобы обеспечить минимальное воздействие на воздушный поток.

В боксах класса защиты III фитинги для горючих газов устанавливать не следует.

А.10 Эргономика

Конструкция должна обеспечивать безопасное техническое обслуживание бокса после его установки. Основные эргономические требования должны быть рассмотрены в соответствии с [23].

А.11 Температура

Через 4 ч непрерывной работы с включенным вентилятором и лампами температура воздуха внутри бокса, измеренная в центре рабочего объема, не должна превышать более чем на 8 °С температуру окружающего воздуха.

Примечание — Эффект плавучести (буйка) благодаря высоким температурам воздуха может нарушить воздушные потоки в боксе и повредить процессу удержания.

А.12 Перчаточные порты боксов и перчатки (класс III)

Перчатки должны соответствовать по размерам и форме перчаточным портам боксов.

Должна иметься возможность переустановки перчаток снаружи бокса таким способом, чтобы старые перчатки могли быть помещены внутрь бокса, а новые — подсоединены при работающем вентиляторе бокса.

Приложение В
(обязательное)

Испытание боксов классов I и II на утечку

В.1 Принцип

Бокс проверяется на утечку путем поддержания внутри бокса избыточного давления и наблюдения за образованием пузырьков мыльной пены, нанесенной на швы, прокладки и стыки.

В.2 Реагенты

Мыльный раствор, состоящий из 25 г/л мягкого мыла, разведенного в теплой дистиллированной воде в чистой обезжиренной емкости.

В.3 Оборудование

Манометр со шкалой от 0 до 500 Па.
Кисточка шириной 12 мм.

В.4 Процесс

Загерметизировать все отверстия бокса необходимыми способом и средствами и создать в боксе давление воздуха 250 Па, измеряемое с помощью манометра.

Нанести мыльный раствор на все швы, прокладки и стыки, используя кисточку. Появление пузырьков будет свидетельствовать о местах утечки воздуха.

В.5 Фиксирование результатов

Зафиксировать результаты наличия или отсутствия пузырьков.

В.6 Отчет об испытании

Включить результат проверки и ссылку на используемый метод (например, приложение В ГОСТ Р ЕН 12469—2010) в документацию, указанную в разделе 9.

Приложение С
(обязательное)

Проверка эффективности удержания в рабочем проеме бокса

С.1 Общие положения

С.1.1 Основные принципы

БМБ испытывается на эффективность удержания в рабочем проеме путем создания внутри бокса спорового аэрозоля либо аэрозоля раствора йодида калия (KI) с последующим подсчетом количества спор или частиц, собранных в определенных точках перед рабочим проемом снаружи бокса.

Введением цилиндра через передний проем имитируется присутствие руки оператора, приводящего к возмущению потока воздуха, входящего в бокс.

Испытание проводят в заданной контрольной точке.

С.1.2 Выбор точек отбора проб

Для боксов шириной до 1,5 м должно быть отобрано пять проб одним методом в центре рабочего проема снаружи бокса. Для боксов шириной от 1,5 до 2 м должно быть отобрано пять проб одним методом в центре рабочего проема снаружи бокса, а также отобрано по пять проб одним методом в центре правой и левой половины рабочего проема снаружи бокса. Для боксов большей ширины должно быть отобрано по пять проб одним методом в точках, расположенных в центре каждого метра ширины рабочего проема снаружи бокса.

С.2 Микробиологический метод испытания

С.2.1 Реактивы

Споры *Bacillus subtilis* var. *niger (B.subtilis)*, ATCC[1] 9372, NCTC[2], 10073 или *B. subtilis* var. *Marburg* ATCC 6051.

Стерильный разбавитель готовится следующим образом.

Либо:

a) Раствор конечного разжижающего фосфатного буфера (PBS) (шаг 1).

Растворить 34 г KH_2PO_4 в 500 мл дистиллированной H_2O.

Довести pH до уровня 7,2 ± 0,5 с помощью NaOH при температуре 25 °С.

Довести до 1 л дистиллированной H_2O.

Конечный разбавитель PBS (шаг 2).

Дистиллированная H_2O: 1 л.

Исходный PBS, шаг 1: 125 мл.

Конечный pH: 7,2 ± 0,5.

Автоклавирование при температуре 120 °С в течение 15 мин.

Дополнительно: сульфат магния (50 г $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ на 1 л дистиллированной H_2O): 5 мл,

либо:

b) Дистиллированная H_2O: 1 л.

Довести pH до уровня 7,0 ± 0,1 при температуре 25 °С.

Автоклавирование при температуре 120 °С в течение 15 мин.

Примечание — Формула b) подходит для приготовления разбавителя, когда споровая суспензия готовится для немедленного использования. Если требуется хранение суспензии при температуре 4 °С, то используется формула a).

Суспензия спор *B. subtilis* var. *niger* готовится по методу A или B следующим образом.

Метод А (используя заранее приготовленные споры *B. subtilis*)

С соблюдением асептических условий произвести посев спор в несколько чашек Петри размером 100 × 15 мм с триптическим соевым агаром. Инкубировать в течение (48 ± 2) ч при температуре (37 ± 0,5) °С. Извлечь характерно окрашенные колонии и поместить их в десять стерильных флаконов объемом 220 мл с завинчивающимися крышками, содержащих примерно по 50 мл триптического соевого агара. Инкубировать в течение (48 ± 2) ч при температуре (37 ± 0,5) °С. Добавить по 10 мл PBS в каждый флакон и осторожно смыть бактерии с поверхности агара.

Перенести бактериальную суспензию в количестве приблизительно по 100 мл в стерильные флаконы объемом 150 мл с завинчивающимися крышками. Для освобождения суспензии от остатков клеток провести трехкратную отмывку в фосфатном буфере PBS центрифугированием при 1500 об./мин в течение 10 мин. Снова довести объем суспензии в фосфатном буфере PBS до начального. Нагревать культуру при (65 ± 0,5) °С в течение 15 мин. Определить концентрацию спор с помощью методов стандартных разведений, используя фосфатный буфер PBS и триптический соевый агар. Споры, приготовленные вышеописанным способом, должны дать концентрацию $(2—4) \cdot 10^9$ спор/мл.

---

[1] Американская коллекция стандартных культур, Роквилл, МД, США.

[2] Национальная коллекция стандартных культур, Лондон, Англия.

Инкубировать чашки в течение (48 ± 2) ч при (37 ± 0,5) °С. Разбавить суспензию спор с помощью фосфатного буфера PBS до достижения конечной концентрации спор (5—8)·10^8 спор/мл, если споры используют немедленно. Хранить запас суспензии спор (2—4)·10^9 спор/мл при 4 °С или, разделив на определенное количество для хранения во флаконах с завинчивающимися крышками, при минус 70 °С, делая частые проверки на жизнеспособность преимущественно методом окрашивания спор.

Метод В

Инокулировать порции стерильного триптозного бульона по 250 мл определенным количеством полученных ранее спор *B. subtilis* или ресуспендированных лиофильно высушенных культур, следуя указаниям инструкций ATCC или NCTC. Инкубировать суспензию в соответствующем шейкере в течение (48 ± 2) ч при (37 ± 0,5) °С. Полученную культуру нагревать при (65 ± 0,5) °С в течение 15 мин.

Перенести суспензию во флаконы с завинчивающимися крышками и промыть минимум три раза в стерильной дистиллированной воде с помощью центрифуги при 1500 об./мин в течение 10 мин. Если планируется хранение, при последней промывке использовать фосфатный буфер PBS. Определить концентрацию спор методом стандартных разведений, используя фосфатный буфер PBS и триптический соевый агар. Споры, приготовленные вышеописанным способом, должны дать урожай в среднем в количестве 1,5 10^9 спор/мл.

Инкубировать чашки в течение (48 ± 2) ч при (37 ± 0,5) °С. Если суспензия спор должна быть использована немедленно, разбавить суспензию фосфатным буфером PBS до достижения конечной концентрации спор в количестве (5—8)·10^8 спор/мл. Суспензию разделить на определенное количество и хранить при 4 °С в стерильных флаконах с завинчивающимися пробками или хранить в морозильной камере при минус 70 °С. Перед использованием проверить жизнеспособность спор.

С.2.2 Оборудование

Чашки Петри размером 100 × 15 мм или 150 × 22 мм, содержащие питательный агар, триптический соевый агар или другую подходящую питательную среду без ингибиторов или других добавок.

Шесть стеклянных импинджеров (см. [9]), диаметр капилляров 1,3 мм, объемный расход откалиброван на 12,5 л/мин, содержащий 20 мл стерильного разбавителя.

Два пробоотборника воздуха с расходом (30 ± 3) л/мин[3)].

Жидкостный 6-струйный модифицированный распылитель Коллисон типа MRE (например, модель CN-38 компании BGI Inc., Уолтхэм МА, США[4)]) или другой распылитель, который может быть использован для создания бактериального аэрозоля с подобными характеристиками.

Цилиндр из нержавеющей стали или алюминиевого сплава внешним диаметром 63 мм и с закрытыми торцами. Цилиндр предназначен для имитации нарушения воздушного потока. Длина цилиндра зависит от размера внутреннего пространства бокса. Цилиндр должен упираться одним концом в заднюю стенку бокса, а другой конец должен выступать на расстояние минимум 150 мм в комнату через рабочий проем бокса.

С.2.3 Процесс

Выбрать и откалибровать распылитель, как указано в С.4.

Встряхнуть распылитель, содержащий до 55 мл суспензии спор [(5—8)·10^8 спор/мл *Bacillus subtilis*], и установить его по центру между боковыми стенками рабочего пространства бокса. Для боксов класса I убедиться, что ось струи расположена ниже цилиндра и приблизительно в центре между его нижней поверхностью и рабочей поверхностью бокса. Для боксов класса II убедиться, что ось струи находится наравне с верхней кромкой рабочего проема.

Убедиться, что отверстие распылителя расположено на расстоянии 100 мм за плоскостью рабочего проема и что ось струи параллельна рабочей поверхности и направлена прямо на рабочий проем.

Установить цилиндр в центре бокса. Убедиться, что ось цилиндра расположена на высоте 69 мм выше рабочей поверхности. Расположить вокруг цилиндра четыре импинджера с пробоотборными отверстиями на расстоянии 63 мм от рабочего проема с внешней стороны бокса. Расположить два импинджера таким образом, чтобы оси их пробоотборных отверстий находились на расстоянии 150 мм друг от друга в горизонтальной плоскости, касательной к верхней части цилиндра. Установить оставшиеся два импинджера так, чтобы оси их пробоотборных отверстий были на расстоянии 50 мм друг от друга и лежали в горизонтальной плоскости на 20 мм ниже цилиндра. В качестве контрольной проверки установить чашку с агаром под центром цилиндра и убедиться в том, что она стоит на расстоянии 10 мм выше или ниже передней приточной решетки для уменьшения препятствия воздушному потоку.

[3)] Щелевые пробоотборники воздуха со скоростью воздуха в щели (60 ± 10) м/с. Расстояние между нижним краем отверстия и поверхностью агаровой среды не должно более чем в 3—6 раз превышать расстояние между верхним и нижним краями щели. Для каждого вида испытания требуются два пробоотборника щелевого вида.

[4)] Модель распылителя CN-38 является примером подходящего оборудования, имеющегося в продаже. Эта информация дается для удобства пользователей настоящего стандарта и не является подтверждением соответствия этой продукции требованиям CEN (Европейского комитета по стандартизации).

Установить два пробоотборника щелевого типа так, чтобы горизонтальная поверхность воздушного всасывающего отверстия находилась на высоте рабочей поверхности, а вертикальные оси всасывающих отверстий — на расстоянии 150 мм спереди бокса и на расстоянии 200 мм от каждой внутренней стороны боковой стенки. Установить два импинджера так, чтобы плоскость всасывающих отверстий располагалась горизонтально на расстоянии 350 мм над рабочей поверхностью бокса, вертикальные оси — на расстоянии 50 мм с внешней стороны спереди бокса и 150 мм с каждой стороны центральной линии.

Включить бокс и дать ему работать до тех пор, пока не установятся рабочие условия, минимум 30 мин до начала любого испытания.

Продолжительность испытания должна составлять 30 мин. Испытание проводится следующим образом:

- время 0: включить щелевые пробоотборники;
- время 5 мин: включить распылитель;
- время 6 мин. включить импинджеры;
- время 11 мин: выключить импинджеры;
- время 11,5 мин: выключить распылитель;
- время 30 мин: выключить щелевые пробоотборники.

Профильтровать собранную жидкость со всех импинджеров через мембранный фильтр диаметром 47 мм с размером пор 0,22 мкм, вынуть фильтр асептическим способом и поместить в соответствующую среду. Чашки с фильтрами и чашки из пробоотборников должны быть инкубированы при 37 °С. Проверить их через 24—48 ч и, если реакция отрицательная, проинкубировать еще раз и проверить через 44—48 ч.

Примечание — Для исследовательских целей собранная жидкость должна быть профильтрована отдельно из каждого импинджера для получения информации по выбранным областям внутреннего пространства бокса.

Контрольная проба должна быть положительной. Проба считается положительной, если она содержит более 300 КОЕ *B. subtilis*.

С.2.4 Подсчет

Количество распыленной жидкости определяют взвешиванием распылителя перед включением и по окончании испытания. При известной концентрации спор подсчитать количество распыленных спор N, КОЕ, следующим способом:

$$N = c\,(m_1 - m_2),$$

где c — концентрация суспензии спор, КОЕ/г;

m_1 — масса распылителя с суспензией спор, г, перед началом испытания;

m_2 — масса распылителя с суспензией спор, г, после испытания.

Подсчитать количество КОЕ *B. subtilis*, полученных из шести импинджеров, и количество КОЕ *B. subtilis*, полученных из двух пробоотборников воздуха.

С.2.5 Оформление результатов

Оформить результаты в виде количества распыленных спор N и количества полученных КОЕ.

С.2.6 Отчет об испытании

Включить результат испытания и ссылку на используемый метод (например, приложение С ГОСТ Р ЕН 12469—2010) в документацию, указанную в разделе 9.

С.3 Метод испытания с применением йодида калия (KI)

С.3.1 Введение

Индекс переноса (см. [11]), определенный по окончании испытания в заданной точке, рассчитывается по выражению $n/(N \cdot x \cdot s)$, где N — количество распыленных частиц аэрозоля, n — количество частиц в пробе по завершении процесса отбора при скорости пробоотбора s. В помещении с турбулентным режимом вентиляции, приводящим к полному перемешиванию во всем пространстве, индекс переноса равен $1/V$ (см. [12]), где V — объемная скорость вентиляции с учетом потерь за счет седиментации. Размерность индекса переноса – время/объем.

Соотношение индексов переноса в двух ситуациях (снаружи бокса и внутри бокса) называется фактором защиты A_{pf} и является безразмерной величиной. Для условий снаружи бокса объемная скорость вентиляции комнаты V принимается 10 м^3/мин. При этом фактор защиты A_{pf} равен $(N \cdot x \cdot s)/(10n)$ при значении скорости пробоотбора s, выраженной в м^3/мин, или $(N \cdot x \cdot s)/(10^4 n)$, если значение s выражено в дм^3/мин. В идеале не должно быть утечки опасных аэрозолей из бокса. Поэтому значение n должно быть равно 0, а фактор защиты должен быть бесконечным. Однако ни один бокс с открытым проемом не дает полную защиту, а минимальная величина A_{pf}, которая может быть определена, зависит от чувствительности метода, например от объема пробы, от количества частиц в единице объема распыляемого аэрозоля N, от скорости пробоотбора s и наименьшего количества частиц в пробе, которое можно отличить от фонового загрязнения.

Для практического применения при испытаниях значения величин должны быть: N — не менее $3 \cdot 10^8$, s — не менее 20 дм^3/мин и n — не более 4, что ведет к минимально допустимому значению A_{pf} — не менее $1{,}5 \cdot 10^5$.

С.3.2 Реагенты

Йодид калия концентрацией 15 г/л, растворенный в абсолютном этаноле либо в промышленном метиловом спирте с содержанием воды не более чем 5 % по объему.

Хлорид палладия концентрацией 1,0 г/л, растворенный в соляной кислоте концентрацией 0,1 моль/л.

С.3.3 Оборудование

С.3.3.1 Блок аэрозольного генератора, состоящий из диска диаметром 38 мм, вращающегося со скоростью (28000 ± 500) об/мин, и сопла для подачи раствора йодида калия (С.3.2) на вращающийся диск. Расстояние между концом сопла и вращающимся диском устанавливают равным 0,1 мм. Блок также включает лабораторную подставку для удержания аэрозольного генератора над рабочей поверхностью, если это необходимо.

С.3.3.2 Пробоотборники воздуха, работающие на центростремительном принципе со скоростью пробоотбора через всасывающее отверстие 100 дм^3/мин, и конус, через который проходит 3 % этого воздуха (см. [13]).

Примечания

1 Поток воздуха через пробоотборники может создаваться центробежным вентилятором, подсоединенным к пробоотборникам фиксированной трубкой.

2 Частицы, будучи тяжелее воздуха, следуют по прямому пути через конус и осаждаются на мембранном фильтре, размещенном в основании конуса, в то время как воздух движется по внешней стороне конуса.

С.3.3.3 Металлический цилиндр диаметром 60—65 мм с гладкой поверхностью и закрытый с одной стороны, установленный на опоре.

С.3.3.4 Чашки Петри диаметром 55 мм.

С.3.3.5 Мембранный фильтр диаметром 25 мм и размером пор 3 мкм.

С.3.4 Подготовка испытаний

Подготовить две чашки Петри до начала испытаний. Одну из них наполовину заполнить раствором хлорида палладия, другую наполовину заполнить водой и закрыть каждую чашку крышкой. Подготовить два листа бумаги для просушки фильтрующих мембран.

Установить цилиндр в центре между боковыми стенками рабочего пространства бокса таким образом, чтобы один конец цилиндра располагался внутри бокса, а нижний край цилиндра был на высоте 65—75 мм от поверхности рабочего стола. Используя уровень, установить цилиндр горизонтально. Цилиндр должен выдаваться в лабораторию минимум на 250 мм от плоскости рабочего проема.

Установить четыре воздушных пробоотборника в рабочем проеме бокса таким образом, чтобы воздухозаборные отверстия находились на расстоянии 150—160 мм от плоскости рабочего проема. Добиться, чтобы уровень воздухозаборных отверстий двух пробоотборников находился на высоте верхнего края цилиндра и на расстоянии 150 мм с каждой стороны осевой линии рабочего проема, а также чтобы уровень воздухозаборных отверстий двух других пробоотборников совпадал с нижним краем окна (поднимающегося стекла) и был на расстоянии 155 мм с каждой стороны осевой линии рабочего проема.

Для боксов класса I установить аэрозольный генератор в центре бокса под цилиндром так, чтобы край диска располагался на расстоянии 100 мм от плоскости рабочего проема внутри бокса.

Для боксов класса II установить аэрозольный генератор на лабораторную подставку в центре бокса так, чтобы центр диска был прямо над центром цилиндра, а край диска располагался на расстоянии 100 мм от плоскости рабочего проема внутри бокса. Установить высоту генератора таким образом, чтобы диск был на уровне верхнего края переднего проема.

Примечание — Расположения аэрозольного генератора различны для боксов классов I и II для того, чтобы появилась возможность проведения испытания в самых уязвимых частях воздушной завесы рабочего проема.

В каждый пробоотборник уложить мембранный фильтр. В соответствии с инструкциями производителя установить перепады давления для каждого пробоотборника в целях установления скорости пробоотбора, равной 100 дм^3/мин.

С.3.5 Процесс испытания

Включить бокс и дать ему поработать до тех пор, пока не установятся рабочие условия.

Включить пробоотборник и вращающийся диск. Подождать 15 с, затем подать раствор йодида калия в количестве 20 мл в центр вращающегося диска. При этом начнется процесс образования аэрозоля. Выключить пробоотборники воздуха через 15 с после прекращения процесса аэрозолизации. Подождать, пока всасывающий насос полностью не остановится, а затем извлечь мембранные фильтры.

Поочередно поместить мембранные фильтры из каждого пробоотборника в чашку Петри, содержащую раствор хлорида палладия, вверх той поверхностью, которая подвергалась воздействию потока воздуха. Отметить, из какого пробоотборника был удален мембранный фильтр.

В течение 30—45 с мембранный фильтр пропитается хлоридом палладия, и частицы йодида калия станут заметными в виде коричневых пятен. Вынуть мембранный фильтр и погрузить его в чашку Петри с дистиллированной водой на 3—4 с, затем поместить его на чистую бумагу для просушки. Повторить эту процедуру с мембранными фильтрами из других пробоотборников. Чашки Петри накрыть крышками.

Примечания

1 Во избежание загрязнения необходимо убедиться, что пинцеты, используемые для помещения мембраны в раствор хлорида палладия, не используются для загрузки пробоотборников воздуха.

2 Раствор йодида калия, используемый для испытаний, является легковоспламеняющимся веществом и вызывает коррозию необработанной стали. Бокс после испытаний должен быть тщательно очищен мокрым тампоном. Вращающийся диск должен быть очищен с особой осторожностью.

Проверить каждый фильтр с помощью 10-кратной лупы и подсчитать количество коричневых пятен на мембранном фильтре.

Примечание 3 — Если количество пятен превышает 50—100, необходимо использовать масштабную сетку с лупой и подсчитать количество пятен внутри одной клетки и затем умножить его на количество клеток.

С.3.6 Вычисление фактора защиты A_{pf} и оформление результатов испытаний

Подсчитать количество диспергированных частиц йодида калия N, используя следующее уравнение:

$$N = 3{,}1 \cdot x \cdot 10^7 \ x \cdot M,$$

где M — объем раствора йодида калия, распыленного аэрозольным генератором, мл;

$3{,}1 \cdot x \cdot 10^7$ — коэффициент, учитывающий размер аэрозольной частицы, скорость пробоотбора и скорость вращения диска.

Затем вычислить значение фактора защиты проема A_{pf} отдельно для каждого мембранного фильтра, используя следующее уравнение:

$$A_{pf} = N \cdot V/10^4 \cdot n,$$

где V — скорость пробоотбора, дм^3/мин;

n — количество пятен на мембранном фильтре.

Примечания

1 В данном случае M = 20 мл и V = 100 дм^3/мин (см. С.3.3.2).

2 Используя вышеприведенное уравнение, значения M и V, данные в примечании 1, и принимая фактор защиты $A_{pf} = 1{,}0 \cdot 10^5$, получаем количество пятен на мембранном фильтре, равное 62.

3 В случае если на мембранном фильтре было одно пятно, то фактор защиты A_{pf} будет равен $6{,}2 \cdot 10^6$. Если на мембранном фильтре не было пятен, то это будет означать, что фактор защиты был выше, чем вышеуказанный, и должен быть записан как $A_{pf} > 6{,}2 \cdot 10^6$.

С.3.7 Определение фона

Установить два пробоотборника воздуха с вложенными мембранными фильтрами перед боксами на расстоянии 150 мм с каждой стороны центральной линии рабочего проема и на расстоянии 100 мм от поверхности рабочего проема. Включить всасывающий вентилятор пробоотборника на 10 мин, не включая при этом аэрозольный генератор.

Удалить мембранные фильтры, провести процедуру обработки и подсчет пятен в соответствии с С.3.5.

Примечания

1 При определении фона в лаборатории, где в течение 24 ч не проводилось никаких испытаний, на обработанных мембранах не должны быть обнаружены никакие коричневые пятна.

2 Если испытания по определению A_{pf} были проведены недавно (или где они показали значительную утечку аэрозоля), рекомендуется проводить определение фона перед дальнейшими испытаниями в боксе. Наличие более пяти пятен на одном из мембранных фильтров после 10-минутного испытания следует рассматривать как основание для отсрочки дальнейших испытаний боксов до тех пор, пока фон не будет отсутствовать.

С.3.8 Отчет об испытании

Результат испытания и ссылку на используемый метод (например, приложение С ГОСТ Р ЕН 12469—2010) включить в документацию, указанную в разделе 9.

С.4 Выбор распылителя и его калибровка для микробиологического метода

С.4.1 Критерии выбора

Распылитель считается пригодным, если он:

a) распыляет в воздухе (1—8) 10^8 спор *Bacillus subtilis*, например, var. *niger* за 5 мин;

b) распыляет (94 ± 6) % одиночных споровых клеток;

c) скорость распыления споровых аэрозолей (0,51 ± 0,05) м/с.

Примечания

1 Испытание, проведенное First *et. al.* (см. [10]), показало, что 6-струйный распылитель Коллисон из нержавеющей стали распыляет бактериальный споровый аэрозоль в соответствии с требованиями С.2.3, если выполняются следующие условия:

- распылитель оснащен стеклянной колбой диаметром 50 мм, высотой 90 мм и горизонтальным выпускным отводом внутренним диаметром 23 мм в верхней части распылителя;
- распылитель работает при давлении 140 кПа (1,4 бар);
- в колбе находится 55 мл суспензии спор с концентрацией $(5—8) \cdot 10^8$/мл;
- дно 6-струйной головки распылителя на 18 мм выше дна колбы;

- на внутренней стороне стеклянной колбы образуются шесть дорожек, созданных воздушными струями (должны быть исследованы размер и очертания контуров, чтобы убедиться, что выпускные отверстия не засорены и не деформированы).

2 6-струйный распылитель Коллисон не нужно подвергать повторному испытанию перед использованием.

С.4.2 Калибровка

С.4.2.1 Общие положения

Калибровку распылителя в лаборатории, где его будут использовать, проводят перед первым использованием и периодически в дальнейшем.

С.4.2.2 Реагенты

Суспензия *Bacillus subtilis*, например, var. *niger* (5—8)· 10^8 спор в миллилитре.

С.4.2.3 Оборудование для калибровки распылителя

Распылитель, подлежащий калибровке.

Один импинджер.

Таймер.

Воронкообразный держатель мембранного фильтра размером 47 мм с силиконовыми резиновыми крышками с двух сторон держателя, вулканизированными при комнатной температуре (RTV). В крышках имеются отверстия для вставки выпускного конца распылителя в утолщенный торец держателя и импинджера в другой торец держателя. Крышка, в отверстие которой вставляется импинджер, должна плотно прилегать к импинджеру. Крышка, в отверстие которой вставляется распылитель, не должна плотно прилегать к распылителю для того, чтобы импинджер работал при атмосферном давлении, а не в замкнутой системе.

Расходомер.

Датчик давления.

Мембранный фильтр аэрозольного типа диаметром 37 мм в кассете с открытой поверхностью.

С.4.2.4 Процедура калибровки

Измерить размеры выходного отверстия распылителя и подсчитать площадь поперечного сечения, выраженную $м^2$.

Вычислить величину воздушного потока, проходящего через распылитель, в л/мин, при которой достигается необходимая скорость воздушного потока, проходящего через распылитель, в м/с.

Добавить рекомендованный производителем объем суспензии спор в распылитель.

Установить выпускное отверстие распылителя в резиновую крышку с широкой стороны держателя фильтра. Вставить воздухозаборную трубку пробоотборника в держатель фильтра через вторую резиновую крышку. Убедиться, что прилегание со стороны импинджера плотное.

Примечание — Существуют два вида импинджеров (по типу химического корпуса): импинджер с наконечником, погруженным в жидкость на 4 мм от дна колбы, пропускающий 6 л/мин при давлении 56 кПа (0,56 бар) или выше (стеклянный импинджер ACE № 7541), и импинджер с наконечником выше уровня поверхности воды, пропускающий 12,5 л/мин при давлении 56 кПа (0,56 бар) и выше, известный под названием AGI-30 (стеклянный импинджер ACE № 7540). Может быть использован любой из этих импинджеров. Если расход воздуха распылителя составляет не 6 л/мин или 12,5 л/мин, выбрать импинджер, который работает при более высоких расходах воздуха и пропускает через щель между крышкой и вставленным в держатель распылителем количество воздуха, равное разнице двух воздушных потоков, проходящих через распылитель и импинджер. Если распылитель и импинджер работают при одинаковых расходах воздуха, то рекомендуется плотная подгонка с обоих концов держателя.

Подсоединить шланг к манометру, состыкованному с расходомером, а затем к распылителю.

Включить одновременно распылитель и импинджер, работающий в соответствии с инструкциями производителя. Установить скорость потока воздуха, проходящего через распылитель, равную 0,51 м/с, рассчитав ее по диаметру струи при расходе воздуха 12,5 л/мин для 6-струйного распылителя. Оставить работать распылитель в течение 5 мин (используя таймер) и импинджер на 5 мин 15 с.

Перенести собранную импинджером жидкость, соблюдая правила асептики, в стерильный градуированный цилиндр объемом 500 мл. Ополоснуть колбу, импинджер и бутыль стерильной водой для обеспечения сбора всех спор, слить всю воду после полоскания в градуированный цилиндр.

Измерить и записать объем жидкости в градуированном цилиндре. Перелить всю жидкость в стерильную колбу, в которой находится магнитная мешалка, и осторожно перемешать.

Отобрать из жидкости пять одинаковых проб и определить в них концентрацию спор.

Выполнить отбор проб из содержащего споры аэрозоля с помощью мембранного фильтра, установленного в предусмотренном месте. После завершения отбора пробы окрасить мембранный фильтр соответствующим красителем. Подсчитать количество отложений, содержащих одну спору или более в соответствующих областях, под микроскопом.

С.4.2.5 Подсчет и оформление результатов

Количество спор, уловленных в течение 5 мин, = (фактор разведения)· (среднее количество КОЕ на 5 чашках).

Скорость воздуха, выходящего из распылителя, равна объему воздуха, измеренному в л/мин = 1,67 · 10^{-3} $м^3$/с, поделенному на площадь выпускного отверстия распылителя в $м^2$ (см. также С.4.2.6).

Подсчитать процент одиночных спор во всей пробе аэрозоля.

С.4.2.6 Альтернативный способ определения скорости воздуха распылителя

Скорость воздуха, выходящего из распылителя, может быть измерена в центре отверстия с помощью термоанемометра. Распылитель должен быть включен без жидкости. Максимальная скорость воздуха — в центре отверстия, минимальная — по бокам из-за трения молекул воздуха о стенки. Этот факт может быть принят во внимание в уравнениях для расчета объемного расхода воздуха

$$V = \pi \quad (R - r)^2 \cdot v$$

и может быть подсчитана средняя скорость потока

$$\overline{v} = V/\pi R^2,$$

где V — объем расхода воздуха, $м^3/с$;

R — внутренний радиус выпускного отверстия, м;

r — поправочный коэффициент ($1{,}1 \cdot 10^{-3}$), м, для компенсации потери из-за трения;

v — скорость, измеренная в центре выпускного отверстия, м/с;

$\overline{v}$ — расчетная средняя скорость в выпускном отверстии распылителя, м/с.

Приложение D
(справочное)

Метод испытания установленных HEPA фильтров для выявления проскока (утечки) с помощью аэрозоля

D.1 Принцип

Систему HEPA фильтров, применяемую в боксах микробиологической безопасности, испытывают на проскок (утечку) путем распыления аэрозоля со стороны потока воздуха, поступающего на фильтр, и определения концентрации аэрозоля со стороны выходящего потока.

D.2 Реагенты

Аэрозоль, используемый для распыления аэрозольным генератором.

D.3 Оборудование

Аэрозольный генератор, пригодный для проведения испытания на проскок (утечку) HEPA фильтров с помощью индикаторного аэрозоля.

Измерительные приборы для определения концентрации аэрозоля в потоке перед фильтром и после него, способные обнаружить не менее пяти логарифмов концентрации.

Подходящими измерительными приборами являются:

a) дискретный счетчик частиц с системой разбавления для обнаружения локального проникновения частиц размером более 0,3 мкм в количестве 0,01 % или менее; или

b) аэрозольный фотометр с верхним измерительным порогом от 10 до 100 мкг/л и диапазоном покрытия не менее пяти логарифмов концентрации.

D.4 Процесс

Включить бокс и начать генерирование аэрозоля в соответствующем месте со стороны потока, поступающего на HEPA фильтры, швы и конструкционные соединения, которые подвергаются испытанию. Убедиться, что концентрация аэрозоля постоянна со стороны поступающего на поверхность HEPA фильтра потока воздуха.

Измерить среднюю концентрацию аэрозоля в поступающем на фильтр потоке воздуха.

Просканировать пробоотборником слегка перекрывающими полосами всю поверхность HEPA фильтра со стороны его чистой поверхности. Отобрать пробу по периметру фильтра в месте его соединения с рамкой крепления фильтра.

Определить скорость сканирования поверхности, время отбора пробы и фактическое количество частиц, которые можно характеризовать как утечку.

D.5 Оформление результата

Рассчитать результат в виде концентрации аэрозоля перед фильтром, после фильтра и соотношение концентраций в процентах.

Если используют дискретный счетчик частиц, то локальный проскок через HEPA фильтр при 0,005 %-ном интегральном проникновении должен быть не более чем 0,05 % (см. [14], [15], [16]).

Если используют аэрозольный фотометр, то локальный проскок через HEPA фильтр должен быть не более чем 0,01 % (см. [15], [16], [17]).

D.6 Отчет об испытании

Включить результат испытания и ссылку на используемый метод (например, приложение D ГОСТ Р ЕН 12469—2010) в документацию, указанную в разделе 9.

Приложение Е
(обязательное)

Контроль эффективности защиты продукта в боксах класса II

Е.1 Принцип

Способность бокса по защите продукта проверяется путем определения уровня загрязнения чашек с питательными средами, расположенными на рабочей поверхности бокса, с помощью аэрозоля суспензии споровых культур, распыляемой снаружи бокса.

Введением цилиндра через рабочий проем имитируется присутствие руки оператора, приводящее к возмущению потока воздуха, входящего в бокс.

Испытание проводится в заданной контрольной точке.

Е.2 Реагенты

Суспензия из спор непатогенных бактерий, например *Bacillus subtilis* var. *globigii* (ссылка NTCN 10073), в стерильной дистиллированной воде.

Чашки Петри диаметром 90 мм, содержащие питательный агар или триптический соевый агар.

Е.3 Оборудование

Распылитель, способный генерировать, как минимум, 10^7 спор/мин со скоростью распыления, соразмерной скорости поступающего в бокс через рабочий проем воздуха, и использующий метод Хино и Сэто (см. [18]). Скорость распыления не должна превышать скорость поступающего в бокс через рабочий проем воздуха.

Примечание — Можно рекомендовать распылители Коллисон (см. [20]).

Металлический цилиндр диаметром 60—65 мм с гладкой поверхностью и закрытый с одного торца, расположенный на регулируемой подставке.

Е.4 Процесс

Откалибровать распылитель, как указано в С.4.2.

Установить на рабочую поверхность бокса открытые чашки с агаром, а цилиндр в середине ее. Расположить ось горизонтальной струи распылителя, содержащего 55 мл суспензии спор [(5—8)·10^6 *Bacillus subtilis*/мл], на уровне верхнего края рабочего проема и в центре между двумя стенками бокса. Отверстие распылителя расположить на расстоянии 100 мм с наружной стороны проема. Ось струи располагается параллельно рабочей поверхности и направлена в сторону открытого рабочего проема бокса.

Установить цилиндр внешним диаметром 65 мм в центре бокса таким образом, чтобы один торец упирался в заднюю стенку бокса, а другой выступал на расстояние около 150 мм в комнату через рабочий проем бокса, ось цилиндра должна быть расположена на высоте 70 мм над рабочей поверхностью бокса.

Установить чашку с агаром под центр цилиндра и закрепить ее на расстоянии 10 мм выше или ниже передней всасывающей решетки для уменьшения препятствия воздушному потоку.

Включить бокс и оставить его работать, пока не будут достигнуты нормальные рабочие условия, т. е. минимум в течение 30 мин до начала испытания.

Взвесить распылитель и включить его в работу на 5 мин. После 5-минутной работы распылителя чашки с агаром закрыть крышками и взвесить распылитель снова.

Испытания повторить трижды.

Инкубировать чашки при 37 °С и проверить их затем через 24—28 ч. Если результат будет отрицательным, продолжить инкубирование и проверить снова через 44—48 ч.

Контрольные чашки должны быть с положительным результатом. Результат считается положительным, если чашка содержит более 300 КОЕ *Bacillus subtilis*.

Е.5 Подсчет и оформление результатов

Подсчитать и выразить результат в количестве распыленных спор *N*, как описано в С.2.4.

Вычислить суммарное количество КОЕ, находящихся на поверхности агара на всех чашках.

Е.6 Отчет об испытании

Включить результат тестирования и ссылку на используемый метод (например, приложение Е ГОСТ Р ЕН 12469—2010) в документацию, указанную в разделе 9.

Приложение F
(обязательное)

Контроль эффективности защиты от перекрестных загрязнений в боксах класса II

F.1 Принцип

Способность боксов микробиологической безопасности по предотвращению перекрестных загрязнений оценивается уровнем загрязнения чашек с агаром, расположенных на рабочей поверхности бокса, при распылении аэрозоля суспензии микробиологических спор внутри бокса.

Примечание — Линия, по которой ламинарный нисходящий поток раздваивается и где он частично направляется в переднюю приемную решетку, а частично в заднюю решетку, не всегда проходит по центру внутренней боковой стенки. Поэтому эта линия разделения должна быть установлена экспериментально в целях правильного расположения распылителя. Место расположения распылителя может быть легко установлено путем визуализации потока дымом (см. [18]).

Введением цилиндра через рабочий проем имитируется присутствие руки оператора, приводящее к возмущению потока воздуха, входящего в бокс.

Испытание проводится в заданной контрольной точке.

F.2 Реагенты

Споровая суспензия, состоящая из спор непатогенных бактерий, например *Bacillus subtilis* var. *globigii* (ссылка NTCN 10073) в стерильной дистиллированной воде.

Чашки Петри диаметром 90 мм, содержащие питательный агар или триптический соевый агар.

F.3 Оборудование

Распылитель, способный генерировать, как минимум, 10^7 спор/мин со скоростью распыления, соразмерной скорости поступающего в бокс через рабочий проем воздуха, и использующий метод Хино и Сэто (см. [18]). Скорость распыления не должна превышать скорость поступающего в бокс через рабочий проем воздуха.

Примечание — Рекомендуются распылители Коллисон (см. [20]).

F.4 Процесс

F.4.1 Откалибровать распылитель, как указано в С.4.2.

F.4.2 Взвесить распылитель, содержащий 55 мл суспензии спор [$(5—8) \cdot 10^4$ *Bacillus subtilis* спор/мл], и установить его так, чтобы горизонтальная ось распылителя располагалась на расстоянии 75—125 мм над рабочей поверхностью, задняя сторона распылителя была прижата к левой внутренней стенке в точке, где нисходящий поток воздуха раздваивается (тест с дымом). Ось струи располагается параллельно рабочей поверхности и направлена к противоположной боковой стенке.

F.4.3 Включить бокс и оставить его работать до тех пор, пока не будут достигнуты нормальные рабочие условия, т. е. минимум в течение 30 мин до начала испытания.

F.4.4 Установить открытые чашки Петри с агаром на рабочую поверхность. Установить два ряда контрольных чашек вдоль центральной линии под выпускным отверстием распылителя. Установить один ряд чашек так, чтобы их центры находились на линии, идущей от передней стенки к задней на расстоянии 355 мм от боковой стенки, которая подвергается испытанию. Установить минимум еще один ряд чашек за рядом, расположенным на расстоянии 355 мм, если возможно, установить два ряда чашек.

F.4.5 Включить в работу распылитель. Через 5 мин выключить распылитель, но работу бокса продолжать в течение 15 мин. Взвесить распылитель.

F.4.6 Бокс должен работать во время установки крышек на открытые чашки с агаром. Инкубировать чашки при 37 °С и проверить их через 24—28 ч. Если результат будет отрицательным, то продолжить инкубирование и проверить через 44—48 ч.

F.4.7 Повторить процедуру, описанную в F.4.3—F.4.6, установив распылитель у правой внутренней стенки.

F.4.8 Испытания выполнить трижды с левой и правой стороны бокса.

F.4.9 Чашки с агаром, расположенные на расстоянии 355 мм от боковой стенки, будут содержать КОЕ *B.subtilis* и могут быть использованы в качестве контрольных.

F.5 Подсчет и оформление результатов

Подсчитать и выразить результат в количестве распыленных спор *N*, как описано в С.2.4.

Подсчитать общее количество КОЕ, обнаруженных на чашках с агаром, расположенных на расстоянии, большем чем 355 мм.

F.6 Отчет об испытании

Включить результат испытания и ссылку на используемый метод (например, приложение F ГОСТ Р ЕН 12469—2010) в документацию, указанную в разделе 9.

Приложение G
(справочное)

Определение расхода воздуха

G.1 Принцип

Величина расхода воздуха измеряется с помощью анемометра умножением скорости потока на площадь поперечного сечения либо с помощью измерительного прибора, способного измерить объем потока воздуха в воздуховоде.

Испытание проводится в заданной контрольной точке.

G.2 Оборудование

Анемометр с подходящим диапазоном и чувствительностью.

Примечание — Анемометры следует подвергать поверке регулярно в соответствии с рекомендациями производителя.

Измерительный прибор, пригодный для измерения расхода воздуха в воздуховоде вытяжной системы.

G.3 Процесс

G.3.1 БМБ класса I

Включить бокс. С помощью анемометра в плоскости рабочего проема измерить скорость воздуха за период минимум 1 мин при каждом измерении минимум в пяти точках, в том числе в геометрическом центре рабочего проема и в каждом из его четырех углов. Располагать анемометр на расстоянии 50—55 мм от правого, левого, нижнего и верхнего края рабочего проема.

G.3.2 БМБ класса II

G.3.2.1 Нисходящий поток

Включить бокс. С помощью анемометра внутри бокса сделать замеры скорости воздуха в горизонтальной плоскости на расстоянии 50—100 мм над верхним краем рабочего проема. Сделать измерения за период минимум 1 мин при каждом измерении минимум в восьми точках, в том числе в четырех точках, расположенных на линии, удаленной на расстояние 1/4 глубины рабочего пространства от задней стенки, и в четырех точках на линии, удаленной на то же расстояние от рабочего проема. Убедиться, что измерения сделаны вдоль этих линий на расстоянии 1/8 и 3/8 от ширины рабочего пространства бокса с правой и левой его стороны.

G.3.2.2 Выходящий поток

Включить бокс. Измерить среднюю скорость потока воздуха внутри вытяжного воздуховода соответствующим измерительным прибором.

Умножить среднюю скорость, полученную в вытяжном воздуховоде, на площадь его поперечного сечения, чтобы получить величину расхода воздуха, выходящего из бокса. Разделить полученный расход воздуха на площадь поперечного сечения рабочего проема, чтобы получить среднюю скорость потока воздуха, входящего через рабочий проем бокса.

Примечание — Метод измерения расхода воздуха в круглом воздуховоде дан в BS 848-1:1997, пункт 23 (см. [21]).

G.3.3 БМБ класса III

G.3.3.1 Входящий поток через открытый перчаточный порт

Включить бокс. С помощью анемометра, установленного в центре одного открытого перчаточного порта, определить значение скорости воздуха за период минимум 1 мин. Повторить эту процедуру в центре другого открытого перчаточного порта.

G.3.3.2 Поток воздуха через впускной фильтр

Включить бокс. Измерить среднее значение скорости воздушного потока внутри вытяжного воздуховода с помощью измерительного прибора.

Умножить среднюю скорость на площадь поперечного сечения вытяжного воздуховода, чтобы получить величину расхода выходящего из бокса воздуха, равного расходу входящего потока через впускной фильтр.

Примечания

1 Метод измерения расхода воздуха в вытяжном воздуховоде указан в BS 848-1, пункт 23 (см. [21]).

2 Может быть полезным проводить измерение перед впускным фильтром. Несмотря на то что это не дает точных значений воздушного потока, это дает основание пользователю для заключения о необходимости замены фильтра при достижении им предельного срока его эксплуатации.

G.4 Оформление результатов

Выразить результаты в виде среднего значения расхода воздуха или средней скорости воздушного потока либо путем умножения средней скорости воздуха на площадь поперечного сечения, либо с помощью записи показаний измерительного прибора.

Среднее значение расхода воздуха выражается в $м^3/с$.

Средняя скорость воздушного потока выражается в м/с.

G.5 Отчет об испытании

Включить результат тестирования и ссылку на используемый метод (например, приложение G ГОСТ Р ЕН 12469—2010) в документацию, указанную в разделе 9.

Приложение Н
(справочное)

Конструкция БМБ и скорость воздушных потоков в них

Н.1 Общие положения

В таблице Н.1 указаны скорости воздушных потоков для трех классов боксов.

Таблица Н.1 — Скорости воздушных потоков для трех классов боксов

Класс	Средняя скорость входящего воздуха для обеспечения защиты оператора	Средняя скорость нисходящего потока воздуха для обеспечения защиты продукта
I	> 0,7 м/с — 1,0 м/с	Не применяется
II	≥ 0,4 м/с	0,25 м/с — 0,50 м/с
III	≥ 0,7 м/с с одной снятой перчаткой	Не применяется

Н.2 БМБ класса I

Направление воздушного потока, визуализированное с помощью теста с дымом или другого визуального теста, например с использованием водяного тумана, должно быть направлено внутрь через всю площадь рабочего проема (см. [22]).

Если испытание проведено в соответствии с приложением G с использованием анемометра, то полученные скорости во всех точках должны соответствовать таблице Н.1 в рабочих условиях.

Примечания

1 Для типового испытания применяют неиспользованные фильтры.

2 Скорость потока воздуха более 1 м/с может привести к созданию неприемлемой турбулентности потока.

Н.3 БМБ класса II

Н.3.1 Общие положения

Конструкция бокса не должна создавать препятствий для входящего через рабочий проем воздушного потока.

Границы рабочей зоны на рабочей поверхности бокса должны быть обозначены надлежащим способом.

В области движения воздуха в рабочей зоне бокса не должно быть выступающих частей или полостей, которые могут привести к загрязнению.

Направление воздушного потока, как показывают тесты с дымом и другие визуальные тесты, например с использованием водяного тумана, должно быть внутрь через всю площадь рабочего проема, а также нисходящим без излишней турбулентности над всей рабочей поверхностью (см. [22]).

Н.3.2 Нисходящий поток

Если испытание проведено в соответствии с методом, указанным в приложении G, с использованием анемометра, то средняя скорость нисходящего потока должна соответствовать требованиям, указанным в таблице Н.1 при рабочих условиях. Индивидуальные измерения не должны отличаться от среднего значения более чем на 20 %.

Н.3.3 Входящий поток

Если испытание проведено в соответствии с методом, указанным в приложении G, с использованием анемометра, то средняя скорость входящего через рабочий проем воздушного потока должна соответствовать требованиям, указанным в таблице Н.1 при рабочих условиях. Результат каждого вычисления не должен отличаться от среднего значения результата более чем на 20 %.

Н.3.4 Включение/выключение БМБ

Бокс должен быть включен или выключен с помощью специальных инструментов (например, ключа или магнитной карточки). Вентиляторы, которые выключаются из-за прекращения подачи электроэнергии, должны автоматически включаться, если подача электроэнергии возобновлена.

Приложение J
(справочное)

Рекомендации по дезинфекции (стерилизации), очистке и фумигации (обработке газом) боксов и фильтров

J.1 Дезинфекция (стерилизация) и очистка

Все боксы микробиологической безопасности должны содержаться в чистоте и не должны быть загружены ненужным оборудованием. Внутреннее пространство должно быть вымыто с использованием дезинфицирующих средств. Для дезинфекции поверхностей боксов могут быть использованы фенолы, четвертичные аммониевые основания и альдегиды. Пользователи хлорных соединений должны помнить об их коррозионных свойствах. Спиртсодержащие соединения следует использовать с осторожностью из-за риска их воспламенения. Во время очистки боксов необходимо надевать поливинилхлоридные или резиновые перчатки, обеспечивающие необходимую защиту рук и запястий. Перчатки могут быть продезинфицированы для повторного применения.

Примечания

1 В случае, когда фумигация может оказаться неэффективной, должен быть в наличии бокс, в конструкции которого предусмотрен элемент, позволяющий безопасно удалять содержимое бокса для соответствующей обработки, например сжиганием.

2 При выборе дезинфицирующих средств необходимо учитывать требования по обеспечению здоровья персонала.

J.2 Фумигация (обработка газом)

БМБ должны быть подвергнуты фумигации в следующих случаях:

a) перед любым мероприятием по техническому обслуживанию бокса, когда необходим доступ к потенциально загрязненным частям (включая замену фильтра и предварительного фильтра, если их использовали при работе с опасными микроорганизмами);

b) перед испытанием фильтров на проскок;

c) после разлива, во время которого недоступные поверхности бокса могли быть загрязнены.

Примечание 1 — В некоторых случаях фумигация необходима при смене вида работ.

Фумигация должна проводиться ответственным лицом, обладающим необходимыми знаниями этой процедуры и с соблюдением соответствующих предосторожностей. Должно быть вывешено предупреждение о том, что проводится фумигация бокса.

Дезинфекцию (стерилизацию) всего бокса, включая фильтры, вентилятор и рабочие поверхности, чаще всего проводят парами формальдегида. Также могут быть использованы альтернативные вещества, например пероксид водорода. В некоторых случаях это недопустимо, и следует выполнять требования соответствующих норм.

Предостережение! Пары формальдегида являются взрывоопасными при объемной концентрации 7,75 % в сухом воздухе; точка воспламенения формальдегида равна 430 °С. Необходимо учитывать требования норм по безопасности.

В объеме бокса должна быть создана постоянная концентрация паров формальдегида минимум 50 мг/м^3.

Пары формальдегида могут создаваться:

- путем испарения формалина (объемная концентрация ~ 36 % в воде).

Примечание 2 — Должно испаряться 60 мл формалина плюс 60 мл воды на 1 м^3 объема бокса;

- путем разложения параформальдегида (параформа) нагревом при обеспечении необходимой влажности.

Формальдегид имеет плохие проникающие свойства, и его эффективность зависит от температуры и влажности. Он является наиболее эффективным при температуре выше 20 °С и относительной влажности 65 %. Применение чрезмерного количества может выразиться в отложении полимерного осадка внутри бокса и привести к загрязнению фильтра.

Бокс должен быть герметично закрыт перед началом проведения фумигации. Необходимо убедиться, что формальдегид не проникнет в лабораторию или другие помещения. Фумигацию удобнее проводить ночью. Может применяться короткий период обработки в случае подтверждения его результатов соответствующими биологическими тестами, но он не должен составлять менее 4 ч.

Порядок фумигации бокса и фильтра должен гарантировать инактивацию микроорганизмов, прошедших через фильтр, за счет надлежащей обработки выходной стороны фильтра (по направлению движения потока воздуха) и соответствующего воздуховода. Для этого процесса требуется более 6 ч.

Для обеспечения необходимых результатов фумигации после образования паров формальдегида должна быть предпринята следующая процедура в случае, если отсутствуют специальные рекомендации производителя:

1) после того как около половины формалина испарится, необходимо включить вентиляторы бокса на 10—15 с, чтобы формальдегид достиг всех областей бокса;

2) после того как испарение завершилось, необходимо включить вентиляторы бокса на 10—15 с.

Даже после такой обработки HEPA фильтры могут считаться только «безопасными при обращении с ними в соответствующей защитной одежде», но не стерильными и должны быть автоклавированы или сожжены после удаления. После фумигации бокс должен быть разгерметизирован, а вентилятор бокса включен на период времени, достаточный для удаления остаточных паров формальдегида перед использованием бокса или проведением технического обслуживания.

Для боксов, которые осуществляют рециркуляцию воздуха через помещение, используемая система фумигации должна обеспечивать условия, при которых персонал не будет подвергаться опасности выше допустимого нормативными документами уровня, например, с помощью использования дистанционно размещенных контрольных систем бокса или с помощью временного воздуховода, выведенного наружу. В случае возникновения опасности работникам должны предоставляться средства защиты органов дыхания, пригодные для защиты от формальдегида.

Приложение К
(справочное)

Техническое обслуживание боксов

К.1 Общие положения

Периодические технические испытания следует проводить в боксах классов безопасности I, II и III через установленные промежутки времени или с периодичностью, указанной в соответствующих нормативных документах.

Все оборудование, используемое для таких испытаний, должно быть сертифицировано и периодически откалибровано. Дата последней калибровки должна быть зафиксирована и легкодоступна для визуализации.

Испытания должны подтвердить, что обратный клапан, если он применен, функционирует нормально и не загрязнен (определяется визуально).

К.2 БМБ класса I

Все внутренние и внешние поверхности боксов должны быть тщательно осмотрены на предмет отсутствия повреждений, трещин или других дефектов поверхности.

Там, где применяется система вытяжных воздуховодов, она должна быть тщательно осмотрена на предмет отсутствия в ней повреждений, трещин или других дефектов. Система вытяжных воздуховодов должна быть промаркирована.

Если этого требует спецификация производителя, должны быть осмотрены, проверены и откалиброваны индикаторы воздушного потока и датчики сигналов тревоги.

К.3 БМБ класса II

Все внутренние и внешние поверхности боксов должны быть тщательно осмотрены на предмет отсутствия повреждений, трещин или других дефектов поверхности.

Там, где применяется система вытяжных воздуховодов, она должна быть тщательно осмотрена на предмет отсутствия в ней повреждений, трещин или других дефектов. Система вытяжных воздуховодов должна быть промаркирована.

Индикаторы сигналов тревоги должны быть проверены в соответствии со спецификациями производителя. Если требуется калибровка систем подачи сигналов тревоги, то изготовитель должен указать периодичность проведения этой калибровки для предотвращения отключения системы подачи сигналов тревоги за пределами пороговых значений параметров.

Скорость нисходящего потока в рабочей зоне бокса должна быть измерена методом, указанным в приложении G, в соответствии с инструкциями производителя и таблицей Н.1.

Предварительный фильтр, если он применяется, должен быть заменен до начала процедуры измерения скорости воздушного потока.

В боксе, имеющем два вытяжных фильтра, каждый фильтр должен быть испытан независимо.

К.4 БМБ класса III

Все внутренние и внешние поверхности боксов должны быть тщательно осмотрены на предмет отсутствия повреждений, трещин или других дефектов поверхности.

Манометр должен быть проверен и при необходимости перенастроен в соответствии со спецификацией производителя.

Там, где применяется система вытяжных воздуховодов, она должна быть тщательно осмотрена на предмет отсутствия в ней повреждений, трещин или других дефектов и промаркирована.

Индикаторы сигналов тревоги должны быть проверены в соответствии со спецификациями производителя. Если требуется калибровка систем подачи сигналов тревоги, то изготовитель должен указать периодичность проведения этой калибровки для предотвращения отключения системы подачи сигналов тревоги за пределами пороговых значений параметров.

Фильтры и целостность системы герметизации должны быть проверены на проникновение масляного аэрозоля в соответствии с приложением D, а результаты контроля эффективности приточного и вытяжного фильтров должны соответствовать требованиям 7.5. Скорость воздушного потока, проходящего через открытый перчаточный порт, должна быть измерена в соответствии с приложением G и составлять не менее 0,7 м/с.

Воздушный поток, проходящий через приточный фильтр, когда перчатки присоединены, а бокс находится при пониженном давлении минимум 200 Па, должен быть измерен в соответствии с приложением G и должен составлять не менее 3 $м^3$/мин на каждый кубический метр объема бокса. Предварительный фильтр, если он применяется, должен быть заменен до начала процедуры измерения скорости воздушного потока.

Рабочее давление в боксе должно быть проверено и должно составлять не менее –200 Па (по отношению к лаборатории).

Приложение ДА
(справочное)

Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов ссылочным национальным стандартам Российской Федерации (и действующим в этом качестве межгосударственным стандартам)

Таблица ДА.1

Обозначение ссылочного международного стандарта	Степень соответствия	Обозначение и наименование соответствующего национального стандарта
ЕН 1822-1	IDT	ГОСТ Р ЕН 1822-1—2010 «Высокоэффективные фильтры очистки воздуха EPA, HEPA и ULPA. Часть 1. Классификация, методы испытаний, маркировка»
ЕН 12296	IDT	ГОСТ Р ЕН 12296—2009 «Биотехнология. Оборудование. Методы контроля эффективности очистки»
ЕН 12297	—	*
ЕН 12298	—	*
ЕН 13091:1999	—	*

* Соответствующий национальный стандарт отсутствует. До его утверждения рекомендуется использовать перевод на русский язык данного международного стандарта. Перевод данного международного стандарта находится в Федеральном информационном фонде технических регламентов и стандартов.

Примечание — В настоящей таблице использовано следующее условное обозначение степени соответствия стандартов:

- IDT — идентичные стандарты.

Библиография

[1] EN 61010-1: Safety requirements for electrical equipment for measurement, control and laboratory use — Part 1: General requirements

[2] EN 292-1: Safety of machinery. Basic concepts, general principles for design — Part 1: Basic terminology, methodology

[3] EN 292-2 Safety of machinery. Basic concepts, general principles for design — Part 2: Technical principles and specifications

[4] EN 12741 Biotechnology. Laboratories for research, development and analysis. Guidance for biotechnology laboratory operations

[5] EN ISO 3744 Acoustics. Determination of sound power levels of noise sources using sound pressure. Engineering method in an essentially free field over a reflecting plane (ISO 3744:1994)

[6] ISO 11201 Acoustics. Noise emitted by machinery and equipment. Measurement of emission sound pressure levels at a work station and at other specified positions. Engineering method in an essentially free field over a reflecting plane

[7] ISO 4871 Acoustics. Declaration and verification of noise emission values of machinery and equipment

[8] ISO 5349 Mechanical vibration. Guidelines for the measurement and the assessment of human exposure to hand-transmitted vibration

[9] May, K. R. and Harper, G. J. The efficiency of various liquid impinger samplers in aerosols. British Journal of Industrial Medicine. 1957, 14, 287—297

[10] First, M. W., Stuart, D., Webb, T. Report of NSF Standard Number 49. Ad Hoc Task Group to Recommend Revisions to Appendix C, November 5, 1986

[11] Foord, N. and Lidwell, O. M. Airborne infection in a fully air conditioned hospital. II. Transfer of airborne particles between rooms resulting from the movement of air from one room to another. Journal of Hygiene, Cambridge, 1975, 75, 31—44

[12] Lidwell, O. M. The evaluation of ventilation. Journal of Hygiene, Cambridge, 1960, 58, 297—305

[13] Bourdillon, R. B., Lidwell, O. M. and Thomas, J. C. Journal of Hygiene, Cambridge, 1941, 41, 197—224

[14] VDI 2083 Part 3. Entwurf. Contamination control. Measuring technique for clean air rooms. February 1993

[15] IES-RP-CC006.2 Testing Cleanrooms. Institute of Environmental Sciences. Mount Prospect, Illinois 60056, 1993

[16] ISO/CD 14644-3 Cleanrooms and associated controlled environments. Part 3: Metrology and test methods

[17] EUROVENT 4/8 In situ leakage test of high efficiency filters in clean spaces. European Committee of Air Handling and Air Conditioning Equipment

[18] Hino, S., and Sato, H. Collison. 6-jet nebulizer: choice for the certification test of Class II biological safety cabinet. Japanese Journal of Experimental Medicine. 1984, 54 (1), 29—38

[19] Redecker F., Hünert R., Rohnen M. and Hänsch L. Funktionsprüfung von HOSCH-Filtern in Laminar-Flow-Anlagen. Pharm. Ind. 1987, 49, 96—97

[20] May, K. R. The Collison nebulizer: description, performance and application. Journal of Aerosol Science. 1973, 4, 235—243

[21] BS 848-1:1997 Fans for general purposes — Part 1: Performance testing using standardized airways

[22] Kennedy, D. A. Water fog as a medium for visualization of airflows. Annals of Occupational Hygiene. 1987, 31, 255—259

[23] prEN ISO 14738:1997 Safety of machinery. Anthropometric requirements for design of workstations at machinery (ISO/DIS 14738:1997)

[24] Clark R. P., Elliott C. J. and Lister P. A. A comparison of methods to measure operator protection factors in open-fronted microbiological safety cabinets. Journal of Applied Bacteriology. 1981. 51, 461—473

[25] Clark R. P. and Goff M. R. The potassium iodide method for determining protection factors in open-fronted microbiological safety cabinets. Journal of Applied Bacteriology. 1981. 51, 439—460

УДК 658.513:006.354 ОКС 07.080 Т58
07.100.01
13.040.35

Ключевые слова: биотехнология, бокс микробиологический безопасности, герметичность, рабочий проем

Редактор *А.Д. Чайка*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *Е.Д. Дульнева*
Компьютерная верстка *И.А. Налейкиной*

Сдано в набор 10.08.2011. Подписано в печать 01.09.2011. Формат 60 × 84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 4,18. Уч.-изд. л. 3,26. Тираж 139 экз. Зак. 817.

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru
Набрано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» на ПЭВМ.
Отпечатано в филиале ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» — тип. «Московский печатник»,
117418 Москва, Нахимовский проспект, 31, к. 2.