

空气微生物：采样方法与注意事项

杭州市疾病预防控制中心

倪晓平

医院空气中的污染物

- 固态（微粒）：直径在 $0.003\mu\text{m} \sim 100\mu\text{m}$;
 - 液态（蒸汽）：直径在 $1\mu\text{m} \sim 9\mu\text{m}$;
 - 气态：直径在 $0.0003\mu\text{m} \sim 0.007\mu\text{m}$;
 - 孢子：内生孢子直径在 $2\mu\text{m} \sim 6\mu\text{m}$;
-

微生物气溶胶特性

一、来源的多相性

土壤、水体、大气、人体、动物、植物是医院内微生物气溶胶的六大来源；尤其是它们相互之间可以进行交换，再释放与空气中，从而使医院的微生物气溶胶问题变得更加复杂。

微生物气溶胶特性

二、种类的多样性

- 1、细菌：结核杆菌、铜绿、军团菌等200余；
 - 2、真菌类：球孢子菌、念珠菌、曲霉等约600余种；
 - 3、病毒类：麻疹、流感病毒、风疹数百种之多；
 - 4、其他：支原体、衣原体、立克次体等。
-

微生物气溶胶特性

三、活力的易变性

微生物气溶胶的活性从它形成的那一瞬间开始就处于不稳定的状态；影响微生物气溶胶存活的因素，有微生物的种类、气溶胶化前的悬浮基质、采样技术及在气溶胶老化过程中的气温、相对湿度、大气中的气体、照射等因素。

微生物气溶胶特性

四、播散的三维性

气溶胶的播散很复杂，受到的影响因素又很多，但在医院的小环境内，主要受气流影响，其次是重力、静电、布朗运动及各种动量等；其结果是室内的污染不断和周围空气混合，并向上下、左右、前后三维空间运动，播散到临近房间及一切可到达的环境。

微生物气溶胶特性

五、沉积的再生性

沉积在环境物表上的尘粒，由于风吹（人员走动）、清扫、震动及各种机械作用，都可使它再扬起，产生再生气溶胶；在一个相对稳定的室内，只要微生物粒子保持活性，沉积→悬浮→沉积→再沉积→再悬浮的播散运动就不会停止。沉积的地方可以是不确定的，如环境物表、人体、甚至是病人黏膜、伤口等处。

微生物气溶胶特性

六、感染的广泛性

微生物气溶胶可以通过黏膜、皮肤损伤、消化道及呼吸道侵入机体，但主要是通过呼吸道感染机体。人类一刻也离不开空气，呼吸道的易感性、人类接触微生物气溶胶的密切性与频繁性都决定着微生物气溶胶感染的广泛性。

微生物气溶胶

- 空气中的浮游细菌，大多是以尘埃为载体，以尘埃中的水分及营养维持生命，除非形成孢子，否则不能单独存在；一般情况下，空气中浮游菌浓度与空气中 $\geq 0.5 \mu\text{m}$ 的尘埃粒子在数量上关系，大约为1:10万，即空气中的尘埃与细菌数呈正比关系。
-

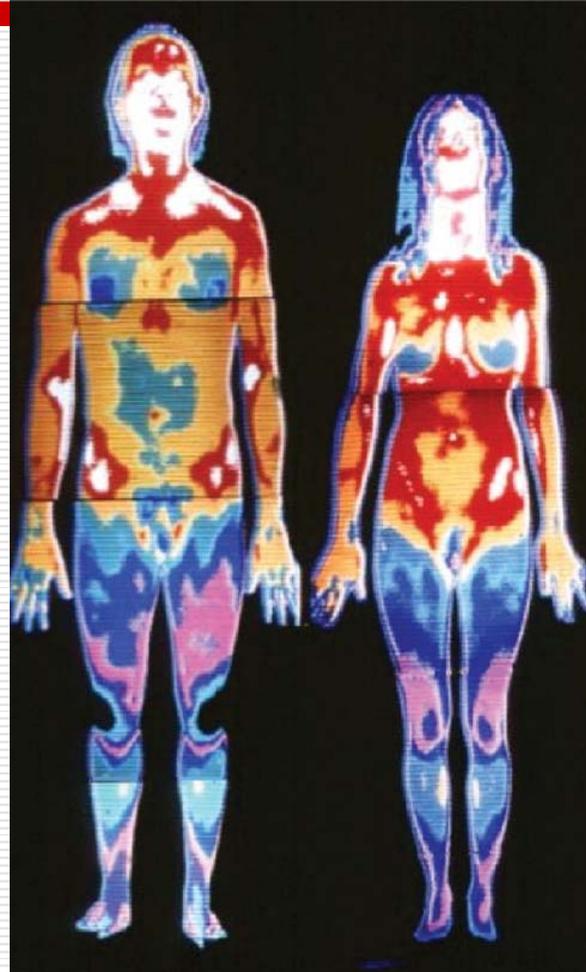
室内气流的自然对流

(the natural convective flow)

- 人体（着衣或裸体）周围气流因皮肤或衣着表面温度高于周围大气，在人体周围形成上升气流。
 - 人体皮肤温度取决于运动、交感神经系统的控制、人体形态学和环境条件。
 - 在周围大气温度 $20^{\circ}\text{C} \sim 25^{\circ}\text{C}$ （室温）的条件下，人体皮肤的平均温度平均为 33°C ，略低于人体的核心温度 4°C 。因此，与环境气温有约 13°C 的温差，从而形成自然对流（the natural convective flow）现象。
-

热成像 Thermal images

- 裸体热成像
- 与邻近温差 1°C
- 最高与最低温差 10°C



暗成像

Schlieren photographs



静止状态下的自然对流气流



自然对流气流对的作用

- 首先，是影响人体热量的丢失；人体处于静止或自由对流中，热量丢失为**30%**；人体处于自然对流气流中，则人体热量丢失的速度显著提高；
 - 其次，来自自身身体或脱卸衣服或周围环境表面的尘埃颗粒物，在自然对流气流的作用下，自然对流气流完全可以提升 ~80 μm 大小的固体或液态颗粒至室内的上层空间。
-

脱卸PPE时的潜在危害

- 当人体处于不断运动中，以及人体体表温度的升高，则极易在周围产生更强大的自然气流，造成脱卸PPE所产生的大量污染物质，以气溶胶形式悬浮于周围环境空气中，抑或随自然对流气流不断上扬，为其自身或周围人员经呼吸道吸入成为可能。



掀开抽水马桶盖可形成气溶胶

American Journal of Infection Control 41 (2013) 254-8



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

American Journal of Infection Control

journal homepage: www.ajicjournal.org



Review article

Lifting the lid on toilet plume aerosol: A literature review with suggestions for future research

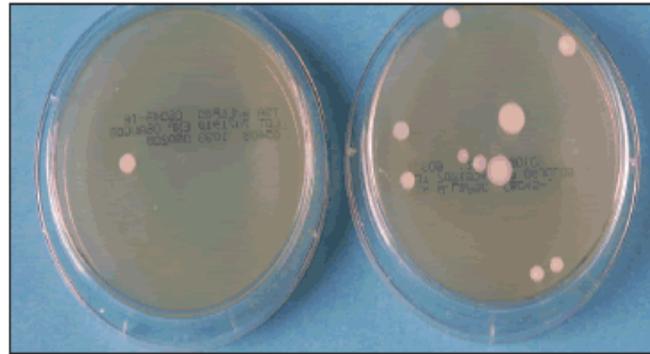
David L. Johnson PhD^{a,*}, Kenneth R. Mead PhD^b, Robert A. Lynch PhD^a, Deborah V.L. Hirst PhD^b

^aDepartment of Occupational and Environmental Health, University of Oklahoma College of Public Health, Oklahoma City, OK

^bDivision of Applied Research and Technology, National Institute for Occupational Safety and Health, Centers for Disease Control and Prevention, Cincinnati, OH

空气中微生物采样分类

- 自然沉降采样
- 机械动力采样



自然沉降法 (sedimentation)

- 用自然沉降法测定微生物气溶胶最简单、最便宜，应用范围相当广，在一定条件下沉降的病毒可以直接收集在某种表面上。例如在相当洁净的环境中空气病毒可直接收集在单层细胞表面上，或在培养基覆盖的细胞表面上进行培养分析。这种方法在噬菌体气溶胶研究中常常使用。
-

-
- 自然沉降法是德国细菌学家Koch早在1881年建立的。它是利用空气微生物粒子的重力作用，在一定的时间内，让所处区域的空气中微生物颗粒逐步沉降到带有培养介质的平皿内的一种采样方法[3]。
-

球形粒子沉降速度

粒子直径 (μm)	沉降末速度 (cm/s)
50	7.5×10^6
40	4.8×10^6
20	1.2×10^2
10	2.9×10^{-1}
6	1.1×10^{-1}
4	5.0×10^{-2}
2	1.3×10^{-2}
1	3.5×10^{-3}
0.6	1.4×10^{-3}

环境表面可见霉斑空气中充满孢子



显微镜下的霉菌孢子



霉菌孢子核的释放



沉降法的不足之处

- 小粒子受地心引力影响小，很难在短时间内采集到，特别是对呼吸道感染有重要意义的病原体大小在 $1\mu\text{m} \sim 5\mu\text{m}$ ，在空气中沉降速度慢、悬浮时间长，沉降法对其捕获率低；
 - 容易受外界气流与操作人员的干扰；
 - 我国原较普遍使用奥姆斯基公式将平板上长出的菌落数，换算成一定体积空气中的微生物含量。
-

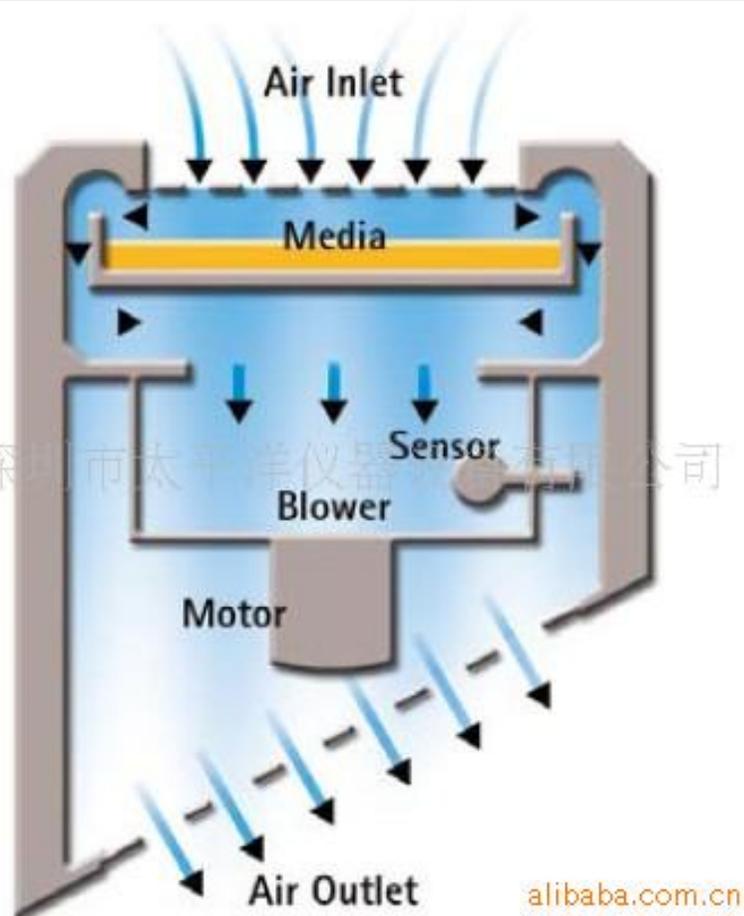
撞击法 (impacton)

- 气溶胶粒子在获得足够的惯性后脱离气流时能够撞击在收集分离表面上。这一原理的采样器有：瀑布式撞击式采样器、安德森生物采样器等。国内的有JWL和SS-1，NHK也属于此类。这类采样器的设计都是用抽气泵把气溶胶吸入带有气体的喷嘴且在喷嘴对面置有撞击界面。
-

-
- 瀑布式采样器有多个逐级变小的喷嘴，故称多级撞击式采样器以便收集的粒子也逐级变小。喷嘴气流加速度和撞击距离是决定捕获粒子大小范围的主要参数。一般裂隙生物采样器把气溶胶粒子收集在一个慢速转动琼脂表面上。**Andersen**发明的多级筛孔式撞击式生物采样器由国际空气生物学会确定为空气微生物生物粒子的标准采样器。
-

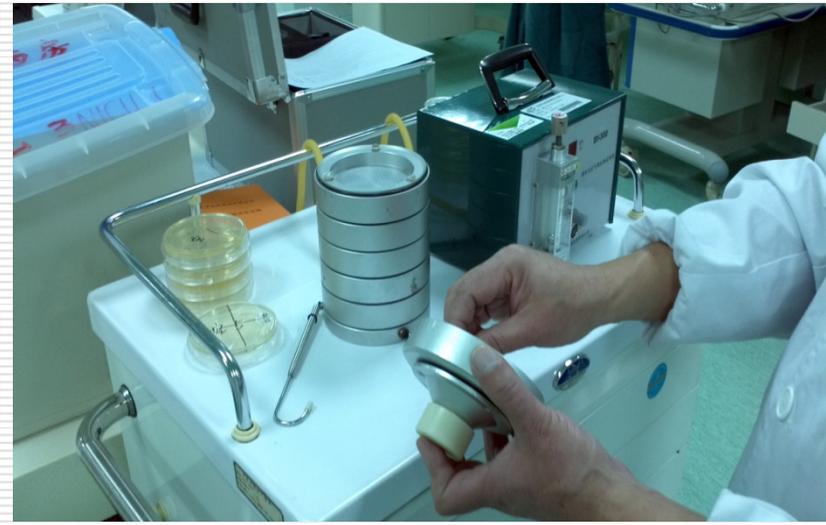
-
- Andersen和裂隙采样器由于容量低其灵敏度不够，采样时间过长影响微生物的存活，所以May建议使用大容量撞击式采样器如Casella ($0.7\text{m}^3/\text{min}$) 和Pagoda采样器 ($1.0\text{m}^3/\text{min}$)。
-

撞击法空气采样示意图





Andersen六级 筛孔式撞击式采样器



-
- Andersen采样器是美国Andersen氏研制并于1958年报道的一种6级筛板式空气微生物采样器，它由6个带有微细孔眼的金属撞击圆盘组成，盘下放置盛有培养基的平皿（该平皿不能转动），每个圆盘由400个环形排列小孔，由上到下孔径逐级减小。
-

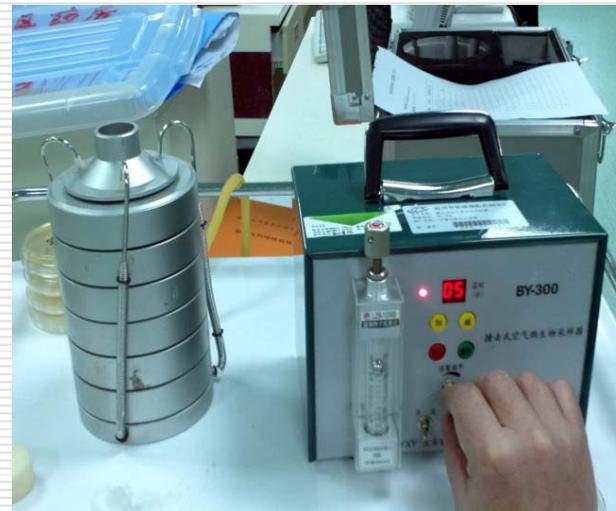
各级孔径变化

表 1 6 级 Andersen 采样器各级的孔径流速和捕获粒子范围

级数	孔径 (mm)	流速/秒 (呎)	捕获粒子范围 (μm)
1	1.18	3.54	>7.0
2	0.91	5.89	4.7—7.0
3	0.71	9.74	3.3—4.7
4	0.53	17.31	2.1—3.3
5	0.34	41.92	1.1—2.1
6	0.25	76.40	0.65—1.1

Andersen采样器特点

- ❑ 采样粒谱范围广，一般在 $0.2 \sim 20\mu\text{m}$ 。
- ❑ 采样效率高，对呼吸道最易沉着的粒子大小逃逸少。
- ❑ 微生物存活率高。
- ❑ 敏感性高。
- ❑ 操作简便



Andersen采样器不足

- ❑ 存在细胞壁损伤现象，粒子从采集面滑脱和粒子被打碎等所致的采样结果误差；
 - ❑ 每次采样的手续复杂；
 - ❑ 所需营养琼脂平板比较多。
-

离心法（centrifugation）

- 它基于离心撞击原理。当采样器通电后，借助涡壳内的叶轮高速旋转，能把至少40cm距离以内被检验的带菌空气吸进采样器。空气同轴地进入涡壳，气流形成一个锥形体。随着叶轮的旋转，空气中的带菌粒子由于离心力作用，加速冲击到含有琼脂培养基的专用塑料基条上，然后，在叶轮和涡壳作用下，空气改变方向，呈环状螺旋的离开涡壳排往外部。采样后的带菌琼脂基条从涡壳内取出，经过恒温、定时培养，形成菌落，最后进行菌落计数。
-

气旋法 (cyclone scrubbing)

- 把气溶胶流以直角切线方向引入采样器冲击一种连续的液态膜形成薄雾，且使粒子借助离心力和冲洗撞击在容器壁上。该液态膜呈螺旋运动到一个贮存器中，通过容器的轻微吸力收集气溶胶样品。这些容器包括玻璃、塑料、不锈钢制品。空气采样流量可达0.9立方英尺/min，液体流量1-4ml/min。由蠕动泵或螺旋活塞泵供应冲洗液。资料证明，气旋冲洗的采样收集效率比较高。
-

-
- 用于枯草芽孢杆菌黑色变种气溶胶采样的效率是**AGI-30**采样器的**63%-133%**，且受其结构、粒子大小和收集液的影响，用**0.06% Tween 80**可以提高其回收率，但对粘质沙雷菌气溶胶的回收率无提高作用，可以用常规方法对其进行消毒。
-

冲击法（impingement）

- 冲击原理采样对微生物的作用比培养基表面采样激烈。它用于微生物气溶胶浓度测量而不是测定其粒子浓度，也是一种极为方便的方法。
-

□ 全玻璃液体冲击式采样器是一种简单、成本低、易于消毒处理的采样器，世界空气生物学会把**AGI-30**型推荐为标准采样器。它可以高速冲击（**0.0125 m³/min**），也可以低速冲击。为了减少收集到的液体中微生物的死亡和再气溶胶化，又发展了低速和水洗式采样器，如微型、多孔气泡切线采样器，是一种前置冲击器，可与**AGI**配合使用，多级液体冲击器也用于微生物气溶胶浓度和粒度的测定。

过滤法 (filtration)

- 虽然悬液中的微生物可以用过滤器过滤后进行分析或处理，但对病毒气溶胶的过滤采样效率，受到更多的复杂因素影响，诸如粒子大小，电荷和滤材性能等。以往有些工作用棉花、可溶性明胶和分子虑膜等对细菌气溶胶进行研究获得了一些成果，但是对病毒气溶胶研究不适宜大量长时间的采样，因为气流的吹击、干燥等作用能使病毒很快衰亡。
-

-
- **Wallis**对用分子滤膜采集病毒气溶胶有新的报道。他们用pH3.5的甘油缓冲液湿润滤膜（孔径0.45 μm）后进行空气采样（100L/min），用800ml pH10的甘油缓冲液洗下病毒后，将其pH值调到3.5，再加氯化铝（0.0005mol/L），以0.25 μm微孔滤膜过滤。最后用6ml甘油缓冲液（pH10）将滤膜上的病毒洗下定量分析。作者用此法成功地测量了空气中脊髓灰质炎病毒的浓度。
-

静电沉降法 (electrostatic precepitation)

- 即将气溶胶粒子静电沉降在湿表面上。这一原理已应用于大容量空气采样器，其空气流量为1-10 m³/min。现有两型：Littion Moder M LVAS和LEAP,均为美国生产，都是为检测低浓度空气病毒而设计的。
-

自然沉降与Bourdillon

地点与对象	Bourdillon/自然沉降
拥挤病房细菌总数	5.5/1
乙型溶血性链球菌	11/1
采用肉汤喷雾的白色葡萄球菌	300/1 ~ 500/1
采用蒸馏水喷雾的白色葡萄球菌	1000/1 ~ 5000/1
平均	854/1

From: 于玺华 《现代空气微生物学》

按采样方式不同分类

- 可分成 I 类和 II 类两类：
 - I 类采样器是将微生物直接采到固体培养基上，如**Andersen**采样器
 - II 类采样器是将微生物先采到液体或其他介质上，再转种到培养基或细胞上显示，如**Porton**采样器
-

各类采样器的利弊

- 空气微生物采样器最基本的要求是采到的微生物是保证有活力的，并能在培养基上尽快增殖的。
 - 按上述要求，I类采样器比II类有利；自然沉降法、旋风式、离心采样器适合于大粒子的采样。
-

-
- RCS离心式采集的粒谱更广
 - 滤膜采样器收集效率高，但阻力也大
 - 静电沉降采样器可把0.1 ~ 5 μm 粒子都采集到，但因有电可释放臭氧，使微生物受损
 - 大流量固体撞击式采样器易使固体干涸，损伤粒子的活性；但又可采集到小流量采样器采不到的微量微生物
-

单级Andersen

- 单级Andersen空气微生物采样器用于测定空气中真菌浓度，操作简便，尤其评价空气中真菌浓度在 $10 \sim 300\text{cfu}/\text{m}^3$ 时，更为适合。
-

注意事项

- 一般认为采集细菌等大的活性粒子。**RCS、LWC-1和Andersen**采样器首选
 - 采集病毒类**LVS**最适合
 - 高湿度时禁用静电采样器
 - 野外不能用大动力的
 - 医院应使用低噪声的
 - 洁净环境过滤式比较适合
-

-
- 在空气微生物采样时特别要注意采样器的撞击距离、物理参数、粒子大小范围、气溶胶浓度、风向、风速、采样因子的生物学特征及采样器的效率和适应范围。
-

沉降法

- 采样高度：距地面垂直高度**80 - 150cm**；
 - 室内面积 $\leq 30\text{m}^2$ ，在对角线上设里、中、外**3**点。里、外两点位置各距墙**1m**；
 - 室内面积 $> 30\text{m}^2$ ，设东、西、南、北、中**5**点。其中东、西、南、北**4**点均距墙**1m**。采样时，将直径为**90mm**普通营养琼脂平板置采样点，打开平皿盖，暴露一定时间后送检培养（II类、III类、IV类环境均暴露时间为**5min**，但结果评判不一）。
-

沉降法

- 洁净房间：洁净房间在空态或静态条件下，根据房间的不同清洁级别进行布点，操作按照**GB50333**《医院洁净手术部建筑技术规范》。采样时，将直径为**90mm**普通营养琼脂平板置采样点，打开平皿盖，暴露**30min**后送检培养。
 - 沉降法结果计算按平均每皿的菌落数报告：**CFU/(皿·暴露时间)**
-

质控关键点

打开平皿盖时，动作要轻，将平皿盖斜置于平皿上。采样完毕后需轻轻合上平皿盖。打开和合上平皿盖时手和身体均不能掠过或位于含营养琼脂平皿上空，非洁净技术处理的空气，采样前，关闭门、窗，在无人走动。

打开平皿：由内而外；合上平皿：由外而内。



空气细菌菌落监测



空气细菌菌落监测

空气净化卫生要求WS/T 368-2012

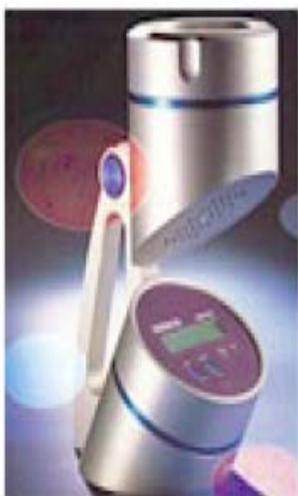
- 新建与改建符合GB 50333-2013
不同洁净级别： $\text{cfu}/(30\text{min}\cdot 9\text{cm}^2)$
 - 非洁净区域的移植、产房、导管室、新生儿、烧伤、ICU、血液细菌菌落总数：
 $\leq 4\text{cfu}/(15\text{min}\cdot 9\text{cm}^2)$
 - 儿科、母婴、妇产科检查、人流、治疗室、注射室、换药室、输血科、CSSD、血透、急诊室、化验室、普通病房、感染科门诊及其病房血液细菌菌落总数：
 $\leq 4\text{cfu}/(5\text{min}\cdot 9\text{cm}^2)$
-

浮游菌测定法

- 可采用撞击式空气微生物采样器或其他经验证的空气采样器。
 - 检测时将采样器置于室内中央0.8m - 1.5m高度，按采样器使用说明书操作，每次采样时间不应超过30min。房间面积大于10m²的，每增加10m²增设一个采样点。设置好采样时间和空气流量，使用直径为90mm含普通营养琼脂平板，采样后合上皿盖送检。
-



单级Andersen监测步骤



1



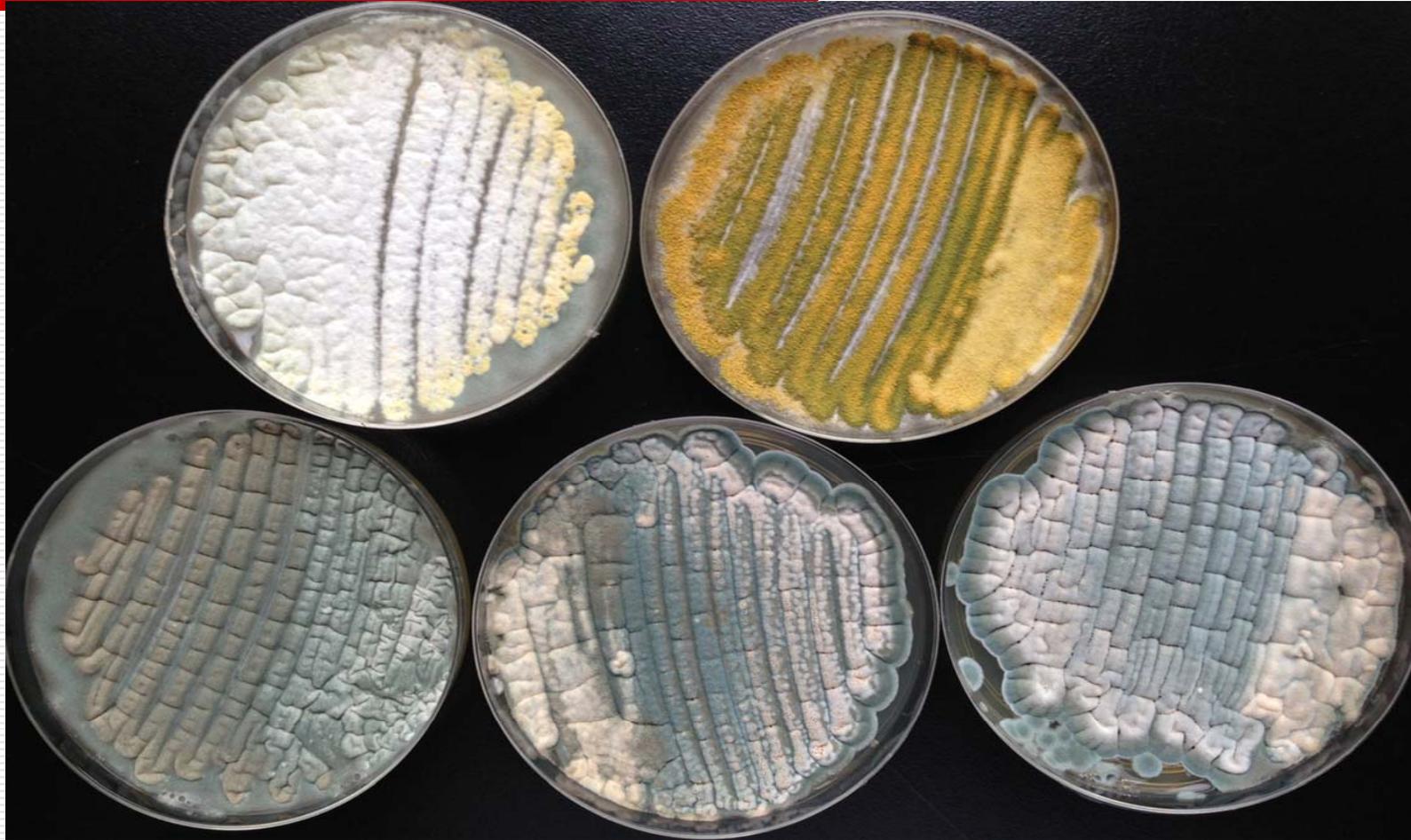
2



3



4



评价报告--各类环境空气卫生标准

环境类别		空气平均菌落数 ^[1]	
		cfu/皿	cfu/m ³
I 类环境	采用空气洁净技术的诊疗场所，分洁净手术部和其他洁净场所	平板暴露法 空气采样器法 根据监测房间洁净度级别的不同，评价标准 具体参照GB50333执行	
II 类环境	非洁净手术部（室）；产房；导管室；血液病病区、烧伤病区等保护性隔离病区；重症监护病区；新生儿室等	≤ 4.0 (15min ^[2])	
III 类环境	母婴同室；消毒供应中心的检查包装灭菌区和无菌物品存放区；血液透析中心（室）；其他普通住院病区等	≤ 4.0 (5min)	
IV 类环境	普通门（急）诊及其检查、治疗（注射、换药等）室；感染性疾病科门诊和病区	≤ 4.0 (5min)	

1、cfu/皿为平板暴露法，cfu/m³为空气采样器法。

2、消毒效果考核标准评价标准：《消毒技术规范》

3、消毒质量考核标准（评价标准：GB15982-2012《医院消毒卫生标准》）

4、类环境评价标准参照：~~GB50333-2013《医院洁净手术部建筑技术规范》~~

GB15982-2012《医院消毒卫生标准》

浮游菌测定法（撞击式空气微生物采样）

□ 空气细菌菌落数（CFU/m³）
= $N/FT \times 1000$

F为每个采样点采样时的采气流速（L/min）

T为每个采样点采样时的采样时间（min）

N为各平皿平均菌落数（CFU/皿）

浮游菌测定合格率：≤ 150 CFU/m³

-
- 现场试验环境条件变化较多，无法测定准确的自然菌沉降率，故只按消亡率验证消毒综合效果。消亡率按下式计算：

消亡率 ≥ 90% 为合格

$$\text{消亡率} = \frac{\text{消毒前样本平均菌落数} - \text{消毒后样本平均菌落数}}{\text{消毒前样本平均菌落数}} \times 100\%$$

空气消毒效果监测注意事项

- 对照组的设置，自然消亡率；
 - 空气中消毒剂对平皿中细菌生长的因素；
 - 循环风空气消毒器，空气中尘埃粒子数，或尘埃质量的减少
-

某型空气消毒净化器

- 1、进风口
- 2、过滤网
- 3、过滤器
- 4、风机
- 5、消声器
- 6、出风口
- 7、加热器
- 8、反射板

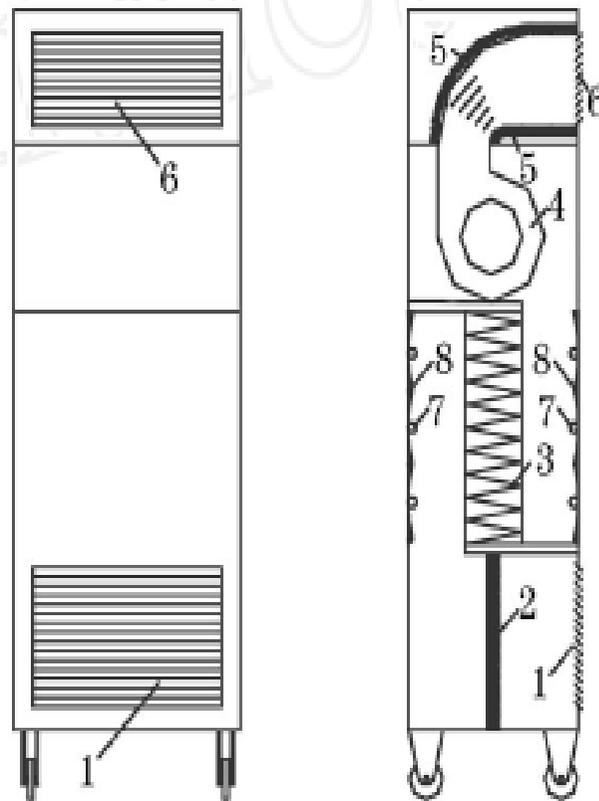


图 1 空气净化消毒器结构图

非培养技术的空气监测

- PCR方法由于特异性强、操作简便、快速，尤其是最新发展的定量PCR的方法不仅灵敏度高、检测快速，还可以实现对DNA或RNA的绝对定量分析；
 - 此外，DNA芯片技术、变性梯度凝胶电泳(DGGE)、末端限制性酶切片段长度多态性分析(T-RFLP)等技术也在空气微生物研究中得到了应用。
-

□ 聚合酶链式反应 (PCR) 对特定核苷酸片段进行指数级的扩增。在扩增反应结束后，可以通过凝胶电泳的方法对扩增产物进行定性分析，也可以通过放射性核素掺入标记后的光密度扫描来进行定量分析。

■ Sawyer 首先采用 PCR 检测技术对医院空气样本中的水痘-带状疱疹病毒进行监测

(Sawyer MH, et al, J Infect Dis 1994, 169: 91-94)

□ 实时荧光定量PCR 是通过对PCR扩增反应中每一个循环产物荧光信号的实时检测从而实现对起始模板定量及定性分析。

■ Haugland首次用实时荧光定量PCR (qPCR) 检测了人工发生真菌 *Stachybotry chartarum* 的气溶胶, 检测值与直接镜检和已知浓度值相符, 证明QPCR可以快速定量空气中某种微生物气溶胶的浓度。

(Haugland RA, et al, Mol Cell Probes 1999, 13: 329-340.)

-
- Zhai用普通PCR检测实验室发生的*Francisella tularensis* 无毒株气溶胶。

(Zhai JH, et Al, J. Aerobiologia, 1997, 13: 7-10) .

- 肖文君等用RT-PCR检测非典定点医院空气样本，并从样本中分离到一株SARS病毒。

(肖文君等，中华流行病学杂志，2004, 25(10):
882-885.)

- 国内有关检测空气微生物的非培养技术的应用报道减少。
-

谢谢!

