

180 °C Heißluftsterilisation – eine international anerkannte und validierte Methode zur Beseitigung mikrobieller Kontaminationen in CO₂-Inkubatoren



Verschiedene Dekontaminationskonzepte für CO₂-Inkubatoren im Vergleich – eine Betrachtung aus Anwendersicht

Daniela Maurer, Dipl. Biochem. Produktmanagement Wissenschaft, BINDER GmbH, Tuttlingen

Einleitung

Kontaminationen mikrobiellen Ursprungs, hervorgerufen durch Bakterien, Bakteriensporen, Viren, Schleimpilze, Hefen oder anderen Mikroorganismen, stellen ein oft kaum kalkulierbares Risiko für Zellkulturexperimente dar. Da die Kontamination nicht notwendigerweise immer mit einem Überwachsen des kultivierten Zelltyps einhergeht, wird sie häufig zu spät erkannt. Subtilere Effekte wie die Veränderung des für humane und Säugertierzellen essentiellen neutralen pH-Wertes von 7,4-7,6 werden durch den Entzug wichtiger Nährstoffe und die Absonderung mikrobieller Stoffwechselprodukte bewirkt; die hervorgerufene Übersäuerung des Kulturmediums führt dann zur Verlangsamung der Proliferation. Veränderungen der Wirtszellmorphologie, sogar genetische Veränderungen wie Chromosomenabberationen und Translokationen werden beispielsweise durch die besonders gefürchteten Mykoplasma-Infektionen hervorgerufen. Ein einziger Keim kann im Extremfall die Arbeit von Wochen und Monaten intensiver Forschungsanstrengungen zu Nichte machen.

Ursachen für den Eintrag von Keimen bzw. die Verschleppung von Kontaminationen gibt es unzählige. Sie reichen von der Verwendung unentdeckt kontaminierter Zelllinien, Medien, Seren oder anderer Reagenzien, Luftkeimen, unzureichend desinfizierten bzw. sterilisierten Laborgeräten bzw. Übertragung durch das Laborpersonal selbst. Da sich die Abwesenheit von Keimen oft nur umständlich und aufwändig nachweisen lässt, müssen Maßnahmen zur Kontaminationskontrolle eingeleitet werden.

Die Bedeutung der Kontaminationskontrolle für das Arbeiten mit Zelllinien und Primärkulturen

Mit den beachtlichen Fortschritten im Bereich sensibler Zellkulturanwendungen wie dem Tissue Engineering oder der regenerativen Zell- und Gewebetherapie haben sich die Anforderungen an CO₂-Inkubatoren gewandelt.

Höchste Maßstäbe werden daher an die Perfektion und Zuverlässigkeit des gesamten Prozessablaufes gestellt, wobei der CO₂-Brutschrank, in dem die natürlichen in vivo Bedingungen für ein optimales Zellwachstum möglichst genau simuliert werden sollen, eine zentrale Rolle einnimmt. Für alle zellbasierten Therapeutika, wie z.B. eine Zellsuspension autologer Chondrozyten, die für eine Reimplantation in einen Patienten bestimmt ist, erweist sich als Problem, dass das Endprodukt, anders als bestimmte Pharmazeutika, selbst nicht sterilisierbar ist. So empfehlen die Richtlinienwerke wie Die Gute Herstellungspraxis (GMP)¹, der Richtlinien-Entwurf für die Gute Zellkulturpraxis (GCCP)² sowie die europäische Zell- und Geweberichtlinie³, u.a. die Verwendung steriler Einmalartikel bzw. die Sterilisierbarkeit wieder verwendeten Equipments bei der Verarbeitung humaner Zellen und Gewebe. Innerhalb einer in vitro Zellkultur müssen sterile Verhältnisse über den gesamten Zeitraum der Kultivierung garantiert werden, sonst besteht nicht nur das Risiko einer Kontaminationsverschleppung, sondern unter Umständen, das einer lebensbedrohlichen Infektion eines Patienten.

Begriffliche Abgrenzung – Desinfektion, Sterilisation, Dekontamination

An dieser Stelle bietet sich ein kurzer Exkurs in die Begrifflichkeiten Sterilisation, Dekontamination und Desinfektion an. Unter Sterilisation versteht man die vollständige Eliminierung bzw. Abwesenheit lebensfähiger Mikroorganismen, unter Desinfektion wird die Eliminierung, respektive die Inaktivierung aller vorhandenen Pathogene verstanden, die oft jedoch nur eine Teilmenge aller vorhandenen Kontaminanten darstellen. Der Begriff Dekontamination hingegen, ist ein unter verschiedenen Aspekten anwendbarer Begriff, der die Entfernung von biologischen oder chemischen oder radioaktiven Kontaminationen beschreibt, jedoch häufig keinen genau quantifizierbaren Rückschluss auf die Effektivität zulässt.

In Bezug auf die Wirkungsweise und den Nachweis der Effektivität von Desinfektions- und Sterilisationsmethoden gibt es weltweit verschiedenste Richtlinien und Standards, die insbesondere in der Pharmaindustrie sowie im klinischen Sektor anzuwenden sind. Die Pharmakopöen spezifizieren grundsätzlich die Autoklaven-Sterilisation, die Heißluftsterilisation sowie die Verwendung von Ethylenoxid und die Sterilfiltration als Methoden zur Sterilisation. Die Eignung einer bestimmten Methode für einen spezifischen Anwendungsfall sollte kritisch hinterfragt werden und erfordert eine Validierung des verwendeten Sterilisationsverfahrens unter Verwendung definierter Testkeime.

Übereinstimmend wird von den verschiedenen nationalen Pharmakopöen⁴ eine 6fache Logreduktion bzw. ein in einer Million Einheiten gefundener lebensfähiger Keim einer effektiven Sterilisation gleichgesetzt. Dies entspricht einer mindestens 99,9999%igen Reduktion der zur Validierung verwendeten Ausgangskeimzahl an Testkeimen.

Die Entwicklung von Dekontaminationskonzepten für CO₂-Inkubatoren

Verschiedene Hersteller von CO₂-Inkubatoren haben sehr unterschiedliche Konzepte zur Vermeidung und Bekämpfung von Kontaminationen entwickelt, wobei das Augenmerk in jüngster Zeit immer stärker auf Prozesssicherheit, Effektivität und Kostenbewusstsein liegt. Die Übertragung der Anforderung der Sterilität auf eine Zellkultur innerhalb eines CO₂-Inkubators stellte dabei eine wesentliche technische Herausforderung dar.

Grundsätzlich sollte die Wahl der geeigneten Dekontaminationsmethode folgende kritische Aspekte berücksichtigen:

- Gute Eignung des Inkubator-Innenkessels für die regelmäßige Sprüh-Wisch-Desinfektion, die übliches Verfahren zur Verringerung der Gesamtkeimzahl, d.h. der mikrobiologischen Belastung des Systems CO₂-Inkubator, darstellt. Leicht zu reinigende Metall- und Glasoberflächen (Inkubatorinnenraum sowie die den Nutzraum abschließende Glastür) ohne Schweißnähte, möglichst ohne Schraubverbindungen bzw. Elemente, die vor Desinfektion ausgebaut werden müssen (Lüfterräder, Abdeckungen von Luftleitungselementen) erlauben hierbei ein zügiges Vorgehen bei notwendiger gleichmäßiger Benetzung aller Innenflächen mit Desinfektionsmittel. Die Reduzierung der Inneneinbauten wie Einschubträgersysteme, Befeuchtungssystemen etc. auf das technisch Notwendige, hilft, die potentielle Kontamination der Innenoberflächen von vornherein zu minimieren.
- Vermeidung von Kondensationen als Brutstätte für Keime im Inkubatorinnenraum
- Sichere Eliminierung potentieller Kontaminationen mittels eines nachweislich effektiven Sterilisationsverfahrens

Ferner sollte das verwendete Zellkultursystem einen Eintrag von Luftkeimen unterbinden, die selbst beim Arbeiten unter Reinraumbedingungen in gewissen Umfang anwesend sind. Hierfür haben sich Zellkulturflaschen, die mit einem Sterilfilter von 0,2 µm ausgestattet sind, bewährt.

Die folgenden Dekontaminationsverfahren sind heute auf dem Markt vertreten:

- Heißluft-Desinfektion bei Temperaturen zwischen 120 °C und 140 °C, mit unterschiedlichen Einwirkzeiten und Zykluslängen (z.T. kombiniert mit HEPA-Filterssystemen), die gemäß den Pharmakopöen siehe Abb. 1 keine normengerechte Heißluft-Sterilisation darstellen. Für ein Heißluftverfahren bei 140°C trockener Hitze wurde für *B. subtilis* var. Niger Sporen ATCC #9372 eine 6fach log Reduktion gezeigt⁵.
- Desinfektion unter Verwendung von feuchtem Dampf bei 90°C, die nachweislich thermoresistentere Keime nicht zu entfernen vermag⁶.
- Kombinierte feuchte Hitze 95°C/145°C Heißluft-Dekontaminationsroutinen in Kombination mit HEPA-Filtern, für die keine Studie in Bezug auf die Effektivität vorliegt; der regelmäßige Austausch der Filter nach Durchlaufen der Dekontaminationsroutine ist unerlässlich.
- HEPA-Filter-Systeme unterschiedlicher Porenweite, z.B. 0,3 µm, die eine Partikelreduktion innerhalb der Brutschrankatmosphäre bewirken⁷, jedoch einer regelmäßigen Wartung bedürfen.
- Kupferausgekleidete Innenkessel (aus Vollkupfer), wobei durch Oxidation bakterizid wirkende Kupferionen, die als Zellgift auf die Atmungskette des bakteriellen Metabolismus wirken, freigesetzt werden. Diese Wirkung ist seit Jahrhunderten bekannt und wissenschaftlich belegt. Sie ist jedoch nicht auf alle Bakteriengattungen, bzw. auf Bakterien- und Pilzsporen und auch nicht auf Viren übertragbar und kann daher nur einen begrenzten Schutz bieten. Daneben sind die freigesetzten Kupferionen auch für den Menschen toxisch. Ferner geht die Wirkung mit einer Verfärbung aller Inkubatorflächen aus Kupfer einher. Die Effektivität von Kupferedelstahllegierungen bzw. von Edelstahl mit gewissem Kupferanteil auf ausgewählte Testkeime wurde in Versuchsreihen gezeigt⁸, beläuft sich jedoch auf Reduktionsfaktoren zwischen 99,847% bis maximal 99,998%, und erfüllt damit nicht die Anforderungen an Sterilität (siehe oben); streng genommen ist für eine Desinfektion ebenfalls eine Reduktion der Ausgangskeimzahl von 99,999% nachzuweisen.
- UV-Entkeimung durch Verwendung nichtozonogener UVC-Strahlung bei 253,7 nm Wellenlänge. Die mutagene Wirkung von UV-Strahlen ist belegt; jedoch ist die Wirksamkeit direkt abhängig von der direkten Bestrahlung, da die Eindringtiefe minimal ist, und daher nur zur Behandlung von Oberflächen geeignet. Besonders zur Wasserentkeimung ist der Einsatz von UV-Entkeimungsstrahlern bekannt. Für die Behandlung von Wasser in Befeuchtungssystemen in CO₂-Inkubatoren weist⁸ eine Effektivität nach; jedoch erscheint eine zusätzliche UV-Behandlung bei regelmäßigem Austausch und Verwendung sterilen, destillierten Wassers zur Befüllung der Wasserschale (Handlungsempfehlungen der Hersteller zw. 1-2 Mal pro Woche) nicht notwendig. Darüber hinaus erscheint der mutagene Effekt auf Luftkeime vernachlässigbar, da die Verweilzeit im Bereich des UV-Strahlers relativ gering ist. Wallhäußer et. al.⁴ weisen auf eine abnehmende Wirkung der UV-Strahlung bei relativen Luftfeuchtwerten > 80% R.H. hin.
- Heißluftsterilisation bei Temperaturen ≥160°C, also trockener Hitze und der in den Pharmakopöen definierten Expositionszeiten (siehe Abb. 1). Für verschiedene Heißluftsterilisationsprogramme wurde der Nachweis einer erfolgreichen Sterilisation nach USP vorgeschriebener Testkeime nachgewiesen⁶.

Internationale Standards in Bezug auf die Heißluftsterilisation

Standard	Temperatur	Haltezeit Sterilisation
US Pharmacopoeia	170 °C	120 min
European Pharmacopoeia	160 °C minimum	120 min minimum
American Dental Association	160 °C	120 min
ANSI/AAMI ST63-D	≥160 °C	Keine genaue Angabe
ANSI/AAMI ST50	160 °C	120 min
DIN 58947	180 °C	30 min
Pharmacopoeia Nordica	180 °C	30 min
Hygiene Verordnung Robert Koch Institut	160 °C 180 °C	200 min oder 30 min
Japanese Pharmacopoeia	160°C-170°C oder 170°C-180°C oder 180°C-190°C	120 min oder 60 min oder 30 min
British Pharmacopoeia	160 °C minimum	60 min minimum

Abb. 1 Internationale Standards in Bezug auf die Heißluftsterilisation

Grundsätzlich gilt, dass die Haltezeit der Einwirkzeit auf das zu behandelnde Gut, d.h. im Fall des CO₂-Inkubators auf die Innenoberflächen, entspricht. Die Zyklusdauer errechnet sich aus den zuzüglichen Zeiten zum Aufheizen und Abkühlen des Systems.

In aktuellen Publikationen wurde der Aspekt der Gesamtdauer der Dekontaminationsroutine sowie die Notwendigkeit einer kontinuierlichen Dekontamination besonders in den Vordergrund gerückt; bei der kritischen Betrachtung sollten die tatsächliche Prozessdauer sowie die anfallenden Kosten für die Nachrüstung von wartungsintensiven Komponenten des Dekontaminationsverfahrens, wie zum Beispiel die Ersatz von HEPA-Filtern sowie der Tausch von UV-Lampen sowie die eventuell anfallenden Kosten für eine nachgelagert empfohlene manuelle Sprüh-Wisch-Desinfektion nicht außer Acht gelassen werden. An dieser Stelle sei ausdrücklich darauf hingewiesen, dass die genannten Verfahren - mit Ausnahme der Heißluftsterilisation bei Temperaturen ≥160 °C und der notwendigen Expositionszeit – keine normgerechten Verfahren im Sinne der Pharmakopöen sowie der unter Abb. 1 gelisteten Richtlinienwerke darstellen.

Einfachheit in der Handhabung verschiedene Dekontaminationskonzepte - Prozesssicherheit, Effektivität und Kostenbewusstsein

Die Eignung dieser Verfahren zur normengerechten Sterilisation sowie im Hinblick auf die Prozesssicherheit, Effektivität und Kostenbewusstsein soll im Nachfolgenden einmal gegenüber gestellt werden.

- Die Verwendung von feuchtem Heißdampf in Form einer 90°C feuchten Hitze Desinfektion: hierbei wird der Vorteil ausgenutzt, das mit einer vergleichsweise geringen Menge an Wasser ein großes Volumen Keimabtötenden Wasserdampfes erzeugt werden kann; dieses Verfahren ist hinsichtlich der Effektivität mit einer Autoklaven-Sterilisation bei 121°C gespanntem Wasserdampf jedoch nicht vergleichbar. Nachweislich konnte die ungenügende Wirkung auf temperaturresistentere Sporen der Gattungen *Bacillus subtilis* und *Bacillus stearothermophilus* gezeigt werden ^{6,9}.

Eine Zyklusdauer von mindestens 25 Stunden sowie die anschließende Rekalibrierung des CO₂-Sensorsystems sind teilweise erforderlich. Das beim Abkühlen des feuchten Wasserdampfes entstehende Kondensat birgt das potentielle Risiko der Rekontamination der behandelten Edelstahl-Innenoberflächen. Eine nachträgliche Sprüh-Wisch-Desinfektion mit einem geeigneten Desinfektionsmittel sowie der Verwendung von sterilen Tüchern legt der Hersteller nahe.

- Der Verwendung von HEPA-Filtern zur Reduzierung der Partikelkonzentration in Reinräumen und Sicherheitswerkbänken ist ein anerkanntes und belegbar effektives Verfahren. Die Anwendung von HEPA-Filtern zur Kontaminationskontrolle in CO₂-Inkubatoren bedingt jedoch folgende Umstände:
 - o Die Inkubatorluft wird durch die mittels eines Lüfterrades erzeugte Sogwirkung durch einen HEPA-Filter mit definierten Abscheidegrad gesaugt, mit geeigneten Filtern wird eine dabei eine Reduktion der Partikelbelastung der Inkubatorluft erreicht.
 - o Diese forcierte Luftströmung ist in einigen CO₂-Inkubatoren gleichzeitig für das Erreichen einer homogenen Temperaturverteilung und/oder einer Homogenisierung nach der CO₂-Konzentration innerhalb des Brutschrankes notwendig.
 - o HEPA-Filter enthalten jedoch noch lebensfähige Keime und machen einen regelmäßigen Austausch der Filter unerlässlich. Zur unbedenklichen Entsorgung der Filter erscheint ein Totautoklavieren sinnvoll.
 - o Besonders in Modellen mit einer kombinierten Dekontaminationsroutine bei trockener oder feuchter Hitze und zusätzlichem HEPA-Filter ist ein routinemäßiger Austausch vor Durchführung der Dekontamination unerlässlich. Damit können bei sich bei regelmäßiger Anwendung erhebliche Kosten summieren.
 - o Beim Hantieren mit offenen Zellkulturgefäßen, z.B. beim Passagieren zwischen Kulturflaschen ist das Arbeiten in einer partikelreduzierten Arbeitsumgebung, wie einer Sicherheitswerkbank unerlässlich, um den Eintrag von Keimen in die Kultur zu verhindern.
 - o Die Partikelreduktion innerhalb der Brutschrank-Atmosphäre selbst, mag das Risiko einer Kontamination offener Kultursysteme, wie z.B. von Petrischalen minimieren, jedoch:
 - o Zellkulturgefäße höherer Qualität werden mit bereits integriertem Sterilfilter im Schraubdeckel angeboten, damit wird ein Einschleppen von Keimen aus der Inkubatoratmosphäre effektiv unterbunden bzw. eine Crosskontamination zwischen einzelnen Zellkulturgefäßen konsequent vermieden. Innerhalb des Zellkulturgefäßes selbst müssen sterile Verhältnisse herrschen. Die Notwendigkeit einer Partikelreduktion der CO₂-Inkubatoratmosphäre selbst erscheint in diesem Fall obsolet.
- Die Anwendung von UV-Entkeimung in Kombination mit einer Kupfer-Edelstahllegierung wurde in⁸ beschrieben. Der Hersteller empfiehlt zur intensiven Entkeimung aller Innenflächen bei Bedarf eine 24stündige UV-Direkt-Bestrahlung, bei der ein vorheriger Ausbau des Einschubträgersystems sowie der Komponenten des Luftleitsystems inklusive Lüfterrad notwendig wird. Parallel sollen alle Inneneinbauten autoklaviert werden; Nach erfolgter UV-Entkeimung sollen alle Innenoberflächen zusätzlich nochmals mit 70%igem Isopropylalkohol sowie sterilem Lappen desinfiziert werden. Gegenüber Heißluftsterilisationsverfahren, die bei begrenzter Außerbetriebnahme des Gerätes (üblich sind über Nacht Zyklen) routinemäßig durchführbar sind, erscheint dieses Verfahren vergleichsweise mit hohem Kosten-

und Personal-Aufwand verbunden. Trotz relativ langer Lebensdauer der UV-Beleuchtungseinrichtung (Herstellerangabe 1000h) werden bei regelmäßiger Anwendung beträchtliche Kosten für Ersatzlampen anfallen.

Das BINDER Konzept zur Minimierung von Oberflächenkontaminationen und effektiver Eliminierung von Kontamination

In den CO₂-Inkubatoren der Serie CB und C150 hat BINDER ein Konzept implementiert, das eine routinemäßige Desinfektion oder Auto-Sterilisation, erlaubt. Durch den konsequenten Verzicht auf kostenintensive Ersatzteile wie Filter, UV-Lampen oder ähnlichem wird eine bedarfsorientierte und regelmäßige Anwendung erleichtert. Es beinhaltet die folgenden Komponenten.

- Leicht zu reinigender, lüfterloser und nahtlos tiefgezogener Innenkessel mit integriertem Einschubträgersystem und dadurch minimierter Oberflächenkontamination – bei 27% geringerer Kontaminationsfläche
- Kondensationsfreiheit, auch bei hoher gesättigter Luftfeuchte sowie der Einsatz mechanisch polierter Edelstahlfächen ohne Schweißnähte verhindert das Einnisten von Luftkeimen
- Normengerechte und nachweislich effektive⁶ 180 °C Auto-Heißluftsterilisationsroutine, die jederzeit bequem über Nacht durchführbar ist, und dabei internationalen Richtlinien in Bezug auf die Heißluftsterilisation genügt.

Der vorliegende Text versucht im Vergleich verschiedener Dekontaminationskonzepte für CO₂-Inkubatoren den Versuch der Betrachtung aus Anwendersicht. Gemäß seiner individuellen Ansprüche wird der jeweilige Zellkulturspezialist, für sich die Entscheidung für und wider das Konzept des Einen oder Anderen Herstellers von CO₂-Inkubatoren treffen.

Referenzen zu internationalen Richtlinien:

- US Pharmacopoeia www.usp.com
- Pharmacopoeia Europea 1997 5.1.1
- American Dental Association www.ada.org
- Association for the Advancement of Medical Instrumentation (AAMI) www.aami.org
- German Institute for Standardization (DIN) www2.din.de
- Pharmacopoeia Nordica Online Reference via www.dekker.com
- Federal Law Gazette 22, No. 10, performing sterilization, Appendix to sub-paragraph 7.1 of the Guideline for the identification, prevention and control of infection in hospitals, Ordinance for the prevention of infectious disease (Hygiene Directive)], Robert-Koch-Institut, 2003
- Japanese Pharmacopoeia www.jpdb.nihs.go.jp/jp14e
- British Pharmacopoeia Commission Methods of Sterilization. London, UK: Appendix X VIII, 2003

¹ Leitfaden für die Gute Herstellungspraxis, EU-GMP Leitfaden ISBN-10: 3-934971-24-5 Maas & Peither GMP-Verlag

² S. Coecke et. al. Guidance on Good Cell Culture Practice, A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture (GCCP), ATLA 33, 261-287, 2005

³ EU-Richtlinie zur Zell- und Gewebespende: Europäische Kommission 29/03/2005: Zur Festlegung von Qualitätsstandards für die Spende, Beschaffung, Testung, Verarbeitung, Konservierung, Lagerung und Verteilung von menschlichen Zellen und Geweben

⁴ K.H. Wallhäußer Praxis der Sterilisation, Desinfektion – Konservierung, Keimidentifizierung – Betriebshygiene, 5. Auflage, 1995

⁵ J.Dalamasso, APEX Laboratories, Effective Heat Sterilization in CO₂-Incubators , Vol. 4, No. 3, Thermo Electron Corporation's Heat Sterilization White Paper, 2003

-
- ⁶ P. Distler, 180°C Hot air sterilization: a safe method against microbiological contamination in CO₂-incubators Lab Asia, November 2003, p. 11
- ⁷ A. Campbell, D. Figel, Importance of Class 100 Air in a CO₂-Incubator, Vol. 4, No. 1, Thermo Electron Corporation's Class 100 Air White Paper, 2003
- ⁸ H. Basujima, D. Mistry, Technical Development Report, Sanyo Electric Biomedical Co., Ltd. A Comparative Analysis of Ultra-violet Light Decontamination versus High-Heat Sterilization in the Cell Culture CO₂-Incubator, with the Use of Copper-Enriched Steel Construction to Achieve Background Contamination Control™, 2007
- ⁹ Bio safety Investigation Unit, CAMR, Efficacy of a CO₂-incubator heat disinfection cycle on dried microbes, 1998