

Sterilisation, Desinfektion und Hygiene

Ziel

- Arbeitssicherheit und Gesundheitsschutz
- Umweltsicherheit
- Produktesicherheit

Sterilität und Hygiene erlauben:

- Kontrolle über Art und Anzahl der Mikroorganismen in Nährmedienvorräten
- während des Produktionsprozesses in Reaktoren und Leitungen
- bei der Produktaufarbeitung und
- bei der Behandlung von Abluft und Abfällen.

Sterilisation ...

bedeutet:

Die Elimination (Abtrennung, Abtötung) aller Mikroorganismen, sowie die Inaktivierung aller Viren, Plasmiden und DNS-Fragmenten, die sich in oder an einem Produkt oder Gegenstand befinden.

Desinfektion (Hygiene) ...

Die gezielte, partielle Verminderung der Keimzahl, vorzugsweise auf Oberflächen (Keimzahlerniedrigung)

Kontamination ...

Produkte oder Gegenstände die nicht steril sind, werden als kontaminiert bezeichnet

Mikroorganismen

- Dieser Begriff beinhaltet gemäss ESV ausser Mikroorganismen im eigentlichen Sinn auch **zelluläre oder nichtzelluläre biologische Agenzien**, die fähig sind, sich zu vermehren oder genetisches Material weiterzugeben.
- Die CEN-Norm 12740 (S. 5) schliesst zusätzlich **biologische Agenzien, die Infektionen, Allergien oder toxische Wirkungen** hervorrufen können mit ein.
- Nach diesen Definitionen gehören z.B. **Viren, Viroide, Parasiten, Zellen aus mehrzelligen pflanzlichen und tierischen Organismen, Prionen, Plasmide** auch unter den Begriff Mikroorganismen.

Inaktivierung / Sterilisation / Desinfektion

Inaktivierung:

- Praktisch vollständige *Zerstörung der biologischen Aktivitäten* von Mikroorganismen und biologischen Agenzien (CEN-Norm 12740).

Sterilisation:

- *Abtötung* praktisch aller Mikroorganismen. Inaktivierung durch Keimzahlreduzierung, so dass höchstens ein lebender Mikroorganismus in 10^6 sterilisierten Einheiten des Endprodukts auftritt.
- Sterilisation bezieht sich auf lebensfähige Organismen, während Inaktivierung auch nichtzelluläre biologische Agenzien einschliesst.

Desinfektion (Hygiene):

- Abtötung oder Inaktivierung von pathogenen Mikroorganismen, so dass keine Gefährdung mehr von ihnen ausgeht. Massnahme zur gezielten Verminderung der Keimzahl, die normalerweise nicht zur Sterilität führt.

Kontamination

- Produkte oder Gegenstände die nicht steril sind, werden als **kontaminiert** bezeichnet

Sterilisationsverfahren

- Thermisch (Flamme, trockene Luft, Sattdampf)
- Chemisch (Oxidationsmittel, Radikale, Alkohol, Formaldehyd etc.,)
- Strahlung (z.B. UV, γ)
- Filtration

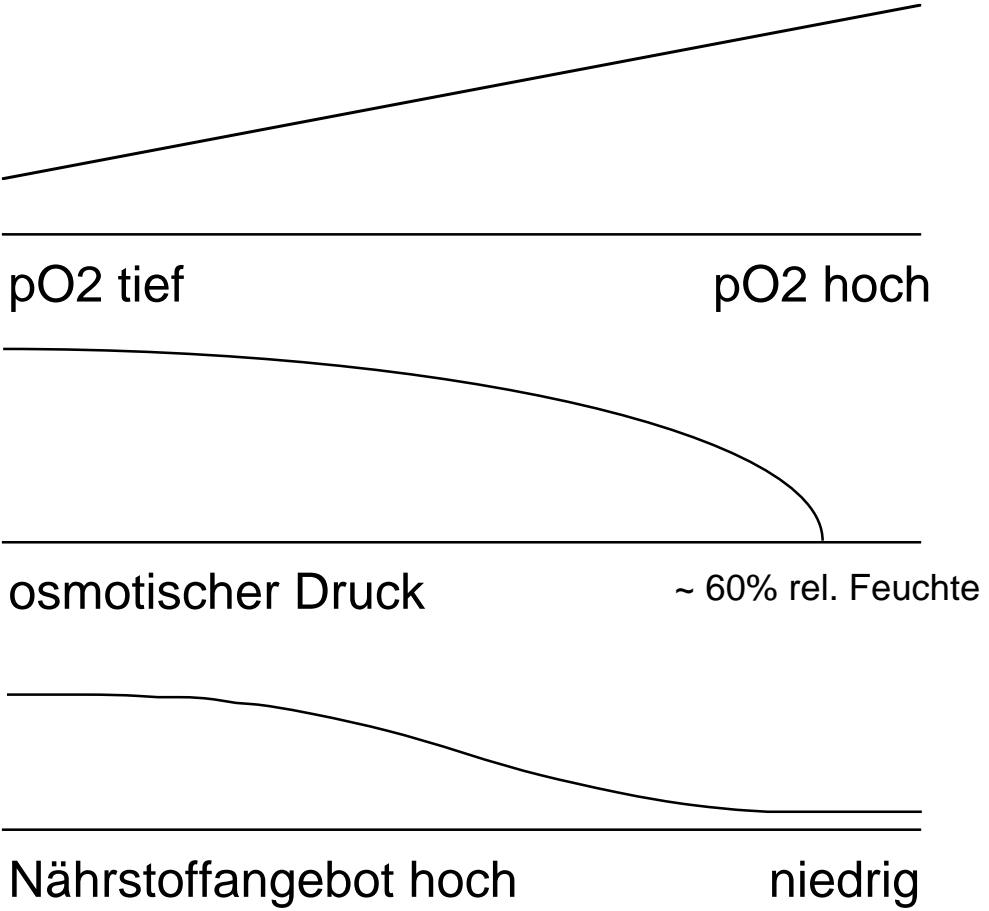
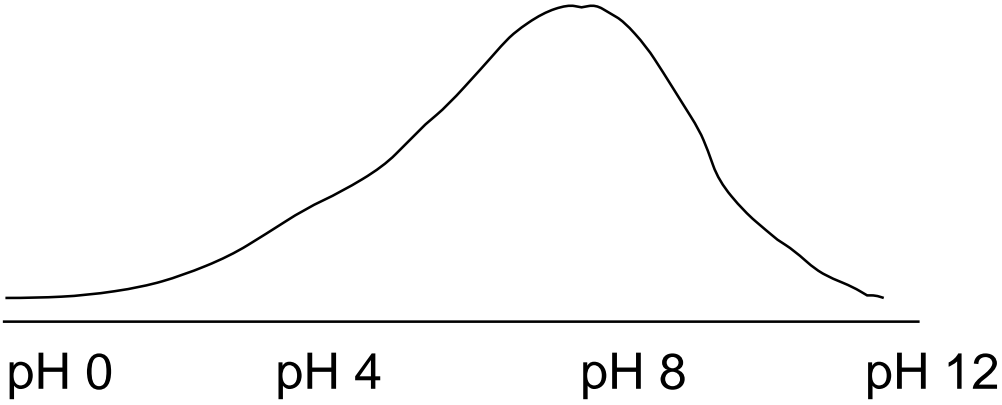
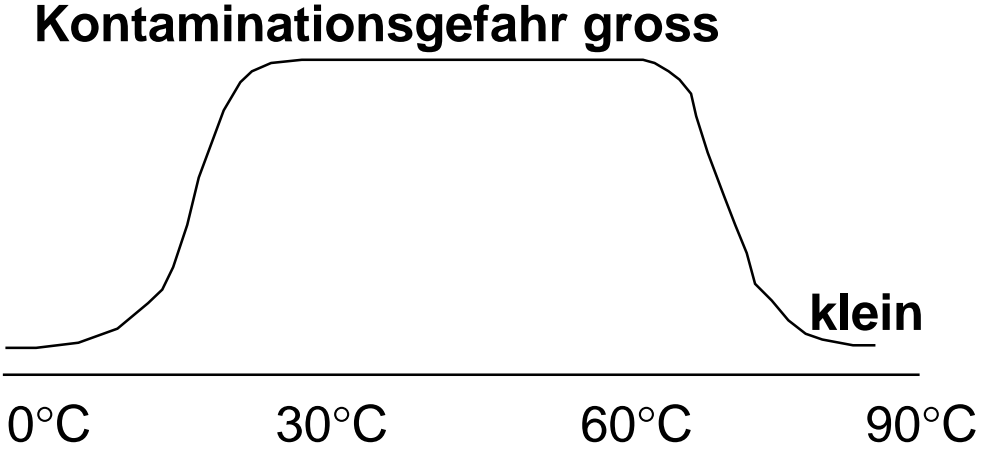
 Merke:

- Es gibt kein universelles Sterilisationsverfahren. Die Wahl des Verfahrens richtet sich nach:
- Den Eigenschaften des Sterilisationsgutes (z.B. Temperaturbeständigkeit)
- Art und Umfang der mikrobiellen Kontamination

Desinfektionsverfahren

- Thermisch (Pasteurisation, UHT-Verfahren, Kochen)
- Chemisch (Alkohol, Formaldehyd, quarternäre Ammoniumsalze etc.)
- Filtration

Kontaminationen werden gefördert durch:



Hitzesterilisation: Feuchte Hitze

Das Ergebnis einer Sterilisation im Autoklaven wird wesentlich beeinflusst durch folgende Faktoren:

- die Art der Mikroorganismen und ihre physiologischen Zustände (ihre Hitzeresistenz)
- die Ausgangskeimzahl
- den angestrebten Endzustand
- die Umgebungsbedingungen (z.B. pH-Wert des Mediums, Einschliessung der Keime in schützende Schmutz- und Fetthüllen)
- Dampfsättigung (Restluftanteil)
- Temperatur
- Behandlungszeit

Beispiele von Hitzeresistenz

Resistenz- stufe	Organismus	Temperatur (°C)	Zeit (min.)
I	Pathogene Streptokokken, Listerien, Polioviren	61,5	30
II	die meisten vegetativen Bakterien, Hefen, Schimmelpilze, alle Viren ausser Hepatitis-B	80	30
III	Hepatitis-B-Viren, die meisten Pilzsporen	100	5 - 30
IV	<i>Bacillus anthracis</i> -Sporen	105	5
V	<i>Bacillus stearothermophilus</i> -Sporen	121	15
VI	Prionen	132	60

Dampfsterilisation im Autoklav

Feucht: gesättigter, gespannter Dampf 121°C 1 bar 130°C 2 bar

Entweder das ganze System (Reaktor samt Zu- und Wegführungen)

oder in einem Autoklaven (Bauteile, Instrumente, Flüssigkeiten bis ca. 20 L)

Abtötung durch Denaturierung von Proteinen und Hitzezerstörung von Nukleinsäuren

Abtötung ist ein dynamischer Prozess:

$$N_t = N_0 e^{-kt}$$

N, Zahl der Mikroorganismen

t, Behandlungszeit

k, thermische Abtötungskonstante (abhängig von Bakterienart und Milieu)

$$\ln \frac{N_t}{N_0} = -kt$$

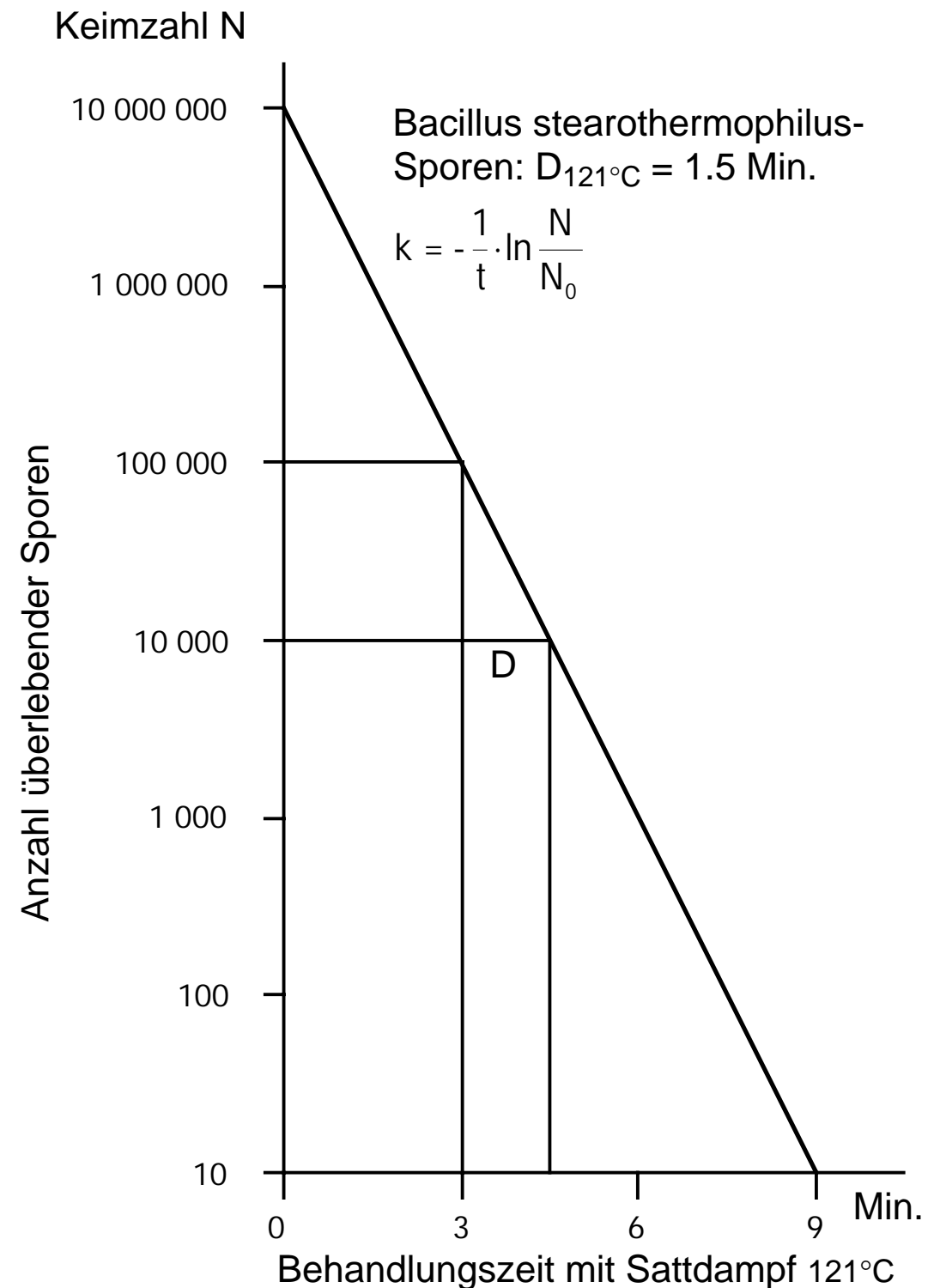
D-Wert

D-Wert:

Die Zeit, welche bei einer festgelegten Temperatur die Keimzahl um einen Faktor 10 verringert, wird als D-Wert (Dezimalreduktionswert oder Destruktionswert) bezeichnet. Der D-Wert für einen bestimmten Organismus in einem bestimmten physiologischen Zustand kann experimentell ermittelt werden. Wenn die Anzahl der überlebenden Organismen bei einer konstanten Temperatur gegen die Behandlungszeit aufgetragen wird, ergibt sich eine exponentielle Abtötungskurve. Daraus lässt sich der D-Wert ablesen. Die D-Werte werden auch von weiteren Umgebungsparametern wie pH, Schmutz, Luftanteil in der Probe stark beeinflusst.

N_0 : (maximale) Ausgangskeimzahl

N : zulässige Endkeimzahl



Wahrscheinlichkeit für Sterilität

$$P = \left(1 - 10^{-\frac{t}{D}}\right)^{N_0}$$

Beispiel: $N_0 = 10^6$

$D_{121} = 1 \text{ Min.}$

6 Min.: $P = \left(1 - 10^{-6}\right)^{10^6} = 0.37$

8 Min.: $P = \left(1 - 10^{-8}\right)^{10^6} = 0.99$

Parameter für Effektivität: F-Wert

Erforderlicher Zeitraum in Minuten, um bei einer bestimmten Temperatur (bei den Hitzesterilisationsverfahren) oder sonstigen genau definierten Bedingungen alle Mikroorganismen abzutöten. Neben der Ausgangskeimzahl wird zusätzlich eine Überlebenswahrscheinlichkeit, z.B. 10^{-6} berücksichtigt.

Beispiel:

Ausgangskeimzahl 10^6 pro Behälter
Endkeimzahl 10^{-6} pro Behälter

$$F = (\log N_0 - \log N_t)D$$

$\log N_0 - \log N_t = n$, Anzahl 10er Potenzen

$$F = 12 \cdot 1.5 \text{ Min.} = 18 \text{ Min.}$$

für *Bacillus stearothermophilus* mit einem $D_{121} = 1.5 \text{ Min.}$

Schlussfolgerung

☞ Vor der Sterilisation:

Reduktion der Zahl der Mikroorganismen (Keimzahlverminderung) und Vermeidung von grösseren Kontaminationen durch:

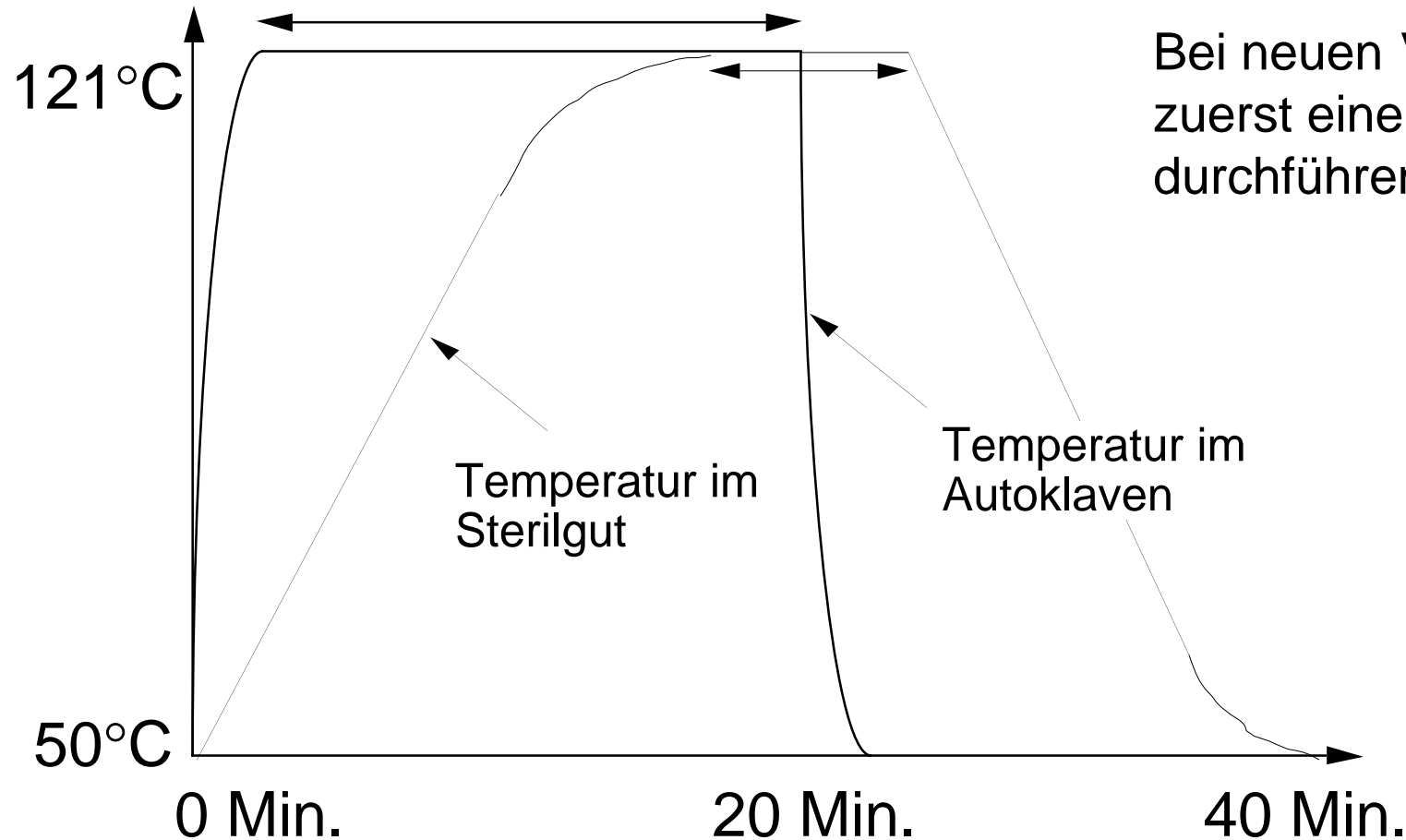
- Reinigung (z.B. Seife und Wasser)
- Evtl. Desinfektion
- Sauberes Arbeiten (allgemeine Hygiene, Gute mikrobiologische Laborpraxis)

☞ Dadurch wird die Überlebenswahrscheinlichkeit von Mikroorganismen stark reduziert.

☞ Bedenke: Die Herstellung von Sattedampf braucht viel Energie.

Sterilisationszeiten: Sattedampf

- Laborstandard: 121°C bei 1 bar, 15 bis 30 Min.
- Dieser Standard ist geeignet für Instrumente und kleinere Flüssigkeitsvolumen
- ☞ Bei grösseren Massen Aufwärm- und Abkühlzeit berücksichtigen:









Sterilisationszeiten: Sattedampf (Forts.)

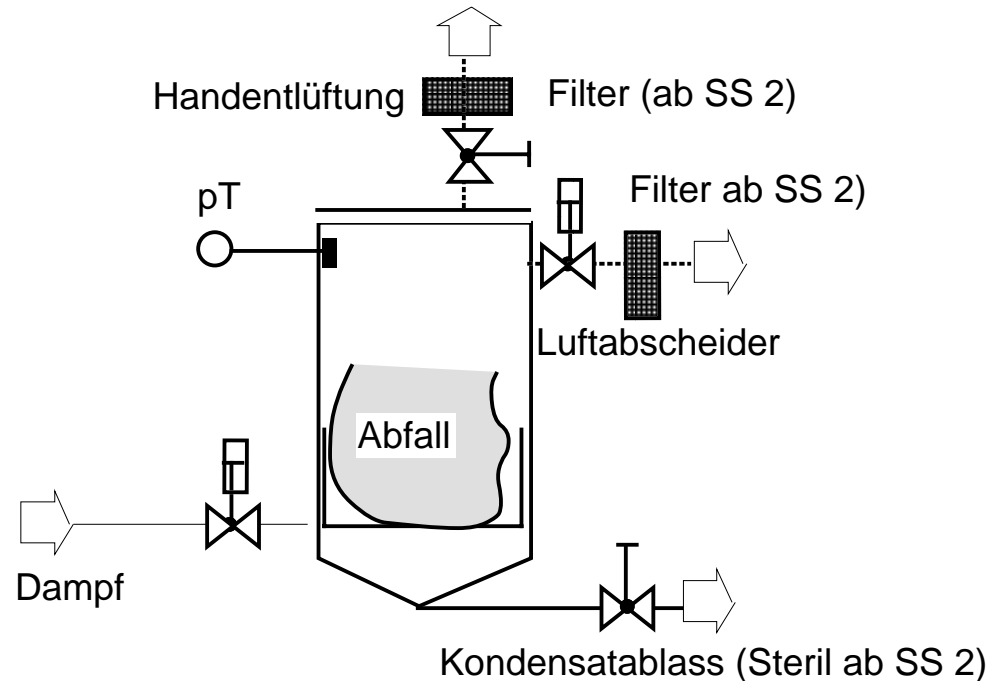
Beispiele für Sterilisationszeiten im Autoklaven bei 121 - 123°C bei nicht gerührten wässrigen Lösungen: Richtwerte für Gefäße:

Gefäße	Volumen	Expositionszeit (Min.)
Reagenzgläser	20 ml	12 - 14
Erlenmeyer-Kolben	50 ml	12 - 14
Erlenmeyer-Kolben	200 ml	12 - 15
Erlenmeyer-Kolben	1000 ml	20 - 25
Erlenmeyer-Kolben	2000 ml	30 - 35
Flasche	9000 ml	50 - 55

Autoklaven: Beispiele (1)

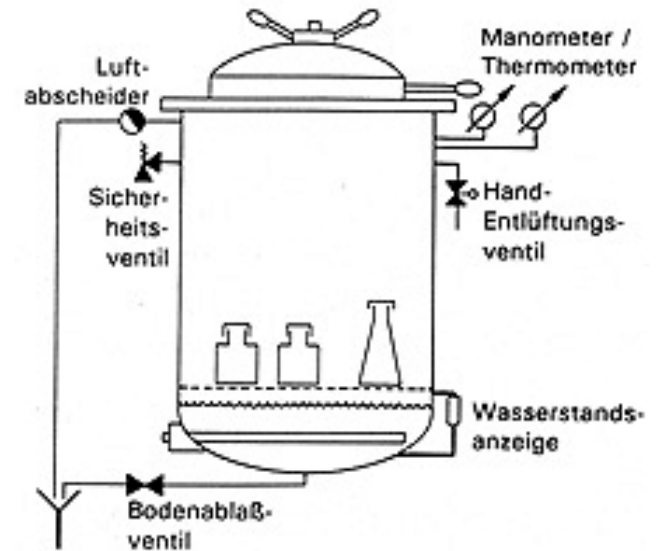
-  Handventil
-  Geschaltetes Ventil
-  Druck, Temperatur
-  Luftfilter (ab Klasse 2)
-  Motor
-  Pumpe

Standautoklav Stand der Technik



Prinzipschema eines Standautoklaven mit Dampf aus Dampferzeuger. Geeignet für die Risikoklassen 1 bis 3. Wesentliche Punkte: a) Das Totvolumen beim Kondensatablass muss entweder möglichst klein sein, oder das Kondensat muss separat und kontrolliert sterilisierbar sein (ab Klasse 3). b) Entlüftungsleitungen müssen über einen Filter geleitet werden (ab Klasse 3). c) Die Befüllung darf nicht zu kompakt sein

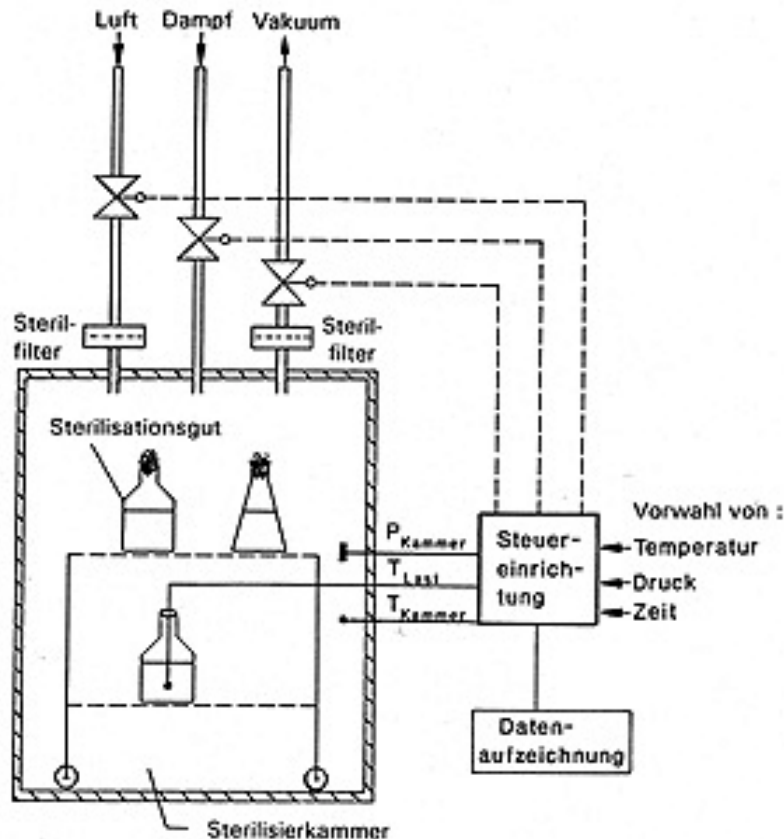
Standautoklav altes Modell



Normaler (älterer) Labor-Standautoklav: Geeignet für Abfallbehandlung Klasse 2 nur dann, wenn Abfälle aussen nicht kontaminiert sind, und keine Aerosolbildung möglich ist. Von Vorteil an diesem Typ ist, dass das Kondensat *in situ* mitsterilisiert wird (Im Wasservorrat). Mängel für die Abfallsterilisation: Aerosole können über die Entlüftungsleitungen in die Umwelt entweichen.

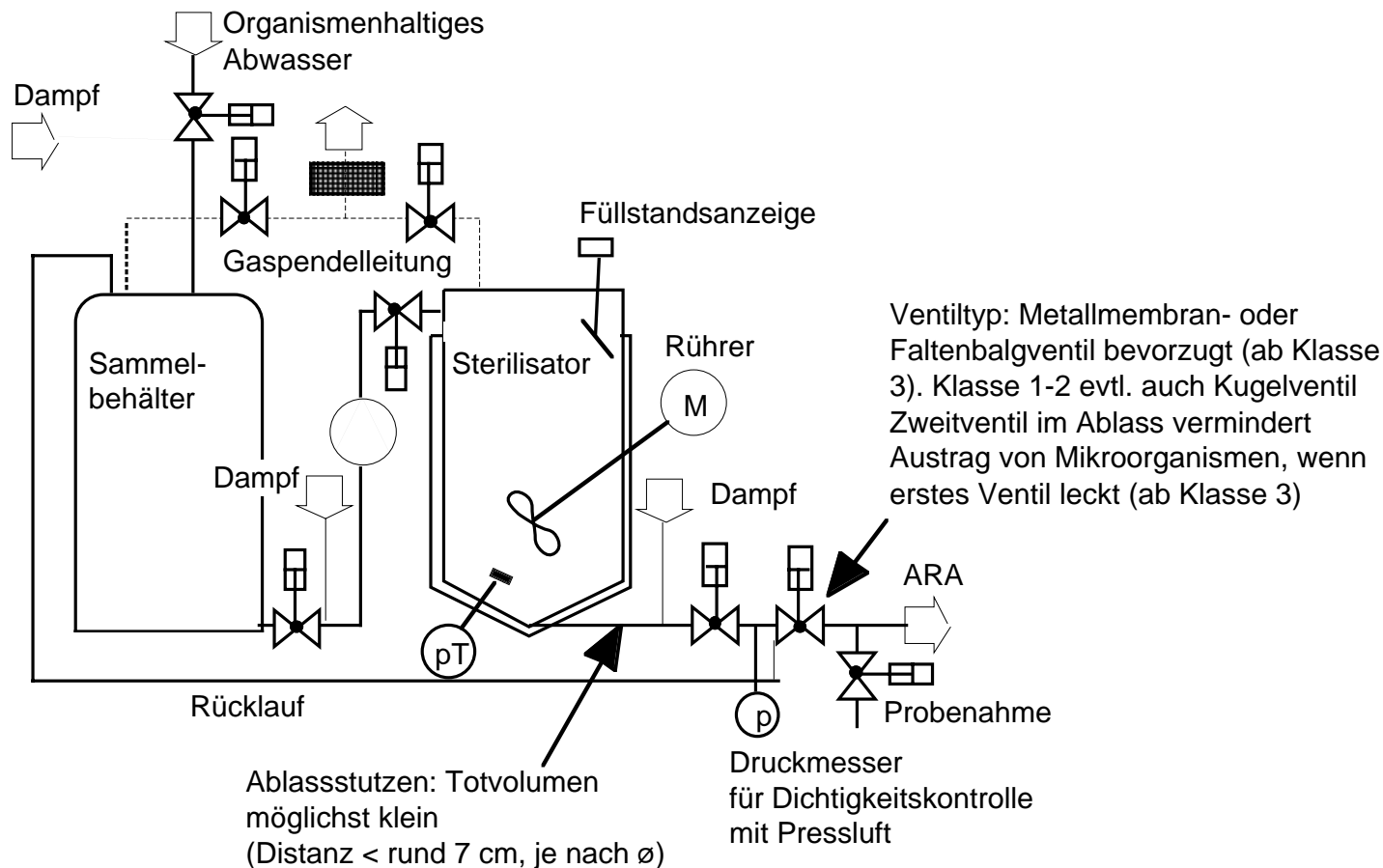
Autoklaven: Beispiele (2)

Durchreicheautoklav



Prinzipschema eines Durchreicheautoklaven. Mit der integrierten Messsonde kann der Prozessüberwacht und aufgezeichnet und optimal gesteuert werden (z.B. F-Wert-Steuerung). Da solche Autoklaven häufig bei Klasse 2 und 3 eingesetzt werden, muss die Abluft, bzw. die Vakuumleitung über Filter geleitet werden. Besonders beachtet werden muss, ob das Kondensat kontrolliert mitautoklaviert wird. In manchen Fabrikaten wird das Kondensat unabhängig und nicht kontrolliert autoklaviert.

Dampfsterilisation: Beispiel (3)



Prinzipschema für Abwassersterilisation im Batchverfahren. Mit Pfeilen sind die besonders heiklen Stellen und Armaturen bezeichnet: Als Ventiltypen sind Membran- oder Faltenbalgventile zu wählen. Das Totvolumen im Ablasstutzen muss so klein sein, dass es beim Autoklavieren genügend (lange) heiss wird. Ausserdem ist darauf zu achten, dass die Abluft über Filter an die Umgebung abgegeben wird. Solche komplexen Anlagen können nicht "von der Stange" bestellt werden, sie werden bedarfsgerecht, "massgeschneidert" für den Kunden zusammengestellt.

Sterilisation: Trockene Hitze

- Trockene Hitze dient vor allem zur Sterilisation von Instrumenten und hitzestabilen Geräteteilen. Sie ist weit weniger wirksam als luftfreier, gesättigter Wasserdampf, da Luft ein schlechterer Wärmeleiter ist als Wasserdampf. Deshalb sind höhere Temperaturen und längere Einwirkungszeiten zur Sterilisation erforderlich. Ausserdem werden Proteine in feuchtem Milieu sehr viel leichter denaturiert als in wasserarmem Zustand.
- Zu den Sterilisationsverfahren mit trockener Hitze gehören:
 - Heissluftsterilisation
 - Ausglühen
 - Abflammen

Heissluftsterilisation

- Die Erhitzung erfolgt in einem geschlossenen Raum ohne äussere Luftzufuhr, z. B. in Sterilisationsschränken. Gemäss Pharmakopöen und WHO - Empfehlungen sollen Temperaturbereiche von 150 - 250°C und Einwirkungszeiten von 30 - 180 Minuten angewendet werden. Je nach Hitzeempfindlichkeit des Sterilisiergutes werden in der Praxis alternativ folgende Bedingungen gewählt (reine Sterilisationszeit, Aufheiz- und Abkühlzeiten müssen noch hinzugerechnet werden):
 - 3 Stunden, 150°C
 - 2 Stunden, 160°C
 - 30 Minuten, 180°C

Ausglühen

- Kleinere Instrumente, wie z.B. Impfösen aus glühfestem Metall, werden in der mikrobiologischen Arbeitspraxis vor und nach jedem Gebrauch durch Ausglühen in der offenen Flamme eines Bunsenbrenners sterilisiert. Beim Umgang mit pathogenem Material wird vorzugsweise ein Bunsenbrenner mit Schutzglocke oder ein Elektro-Laborbrenner mit glühender Keramikröhre verwendet werden. Das Umherspritzen von infektiösen Partikeln kann dadurch je nach Arbeitstechnik vermindert bis **verhindert** werden.

Abflammen

- Die Keimzahl an Oberflächen von Metall- und Glasgeräten kann durch Abflammen vermindert werden. **Das Gerät wird** in 70%igen Ethanol oder Methanol eingetaucht und der anhaftende Alkohol entzündet. Die Nachteile dieser Methode sind, dass Endosporen von Bakterien häufig nicht abgetötet werden, und dass Keime in Luftpolstern überleben können. Ein weiterer Nachteil ist auch die Brandgefahr.
- Es sind Fälle von Laborbränden bekannt, bei denen sich das Alkoholreservoir entzündet hat. In sterilen Werkbänken mit Umluft**zirkulation** besteht **zudem** Explosionsgefahr.


Sterilisation: Gase

Mikrobizide Gase: Geeignet für Oberflächen, poröse Materialien und Textilien

Formaldehyd 2 - 5%

- Als einziges Gas geeignet für Bakterien und Bakteriensporen
- toxisch, ziemlich sicher krebserregend
- stechender Geruch
- Durchdringt PVC und Gummi
- Denaturierung von Proteinen (chem. Reaktion mit Aminosäuren)

Ethylenoxid

- Geeignet für Pilze, Bakterien und Viren
- toxisch; bildet mit Luft explosive Gemische (zwischen 3 und 80%),  Vakuumverfahren
- geruchslos
- zersetzt sich rasch in Wasser und feuchter Luft
- Radikalbildung: Reaktion mit Aminosäuren, RNS und DNS

Ozon

- Geeignet für Pilze, Bakterien und Viren
- toxisch, starker charakteristischer Geruch
- wenig stabil
- nur bei der Aufbereitung von Trink- und Badewasser verwendet

Ionisierende Strahlung

γ **Kobalt** **Co⁶⁰**

- z.T. hohe Dosen notwendig, die das Sterilgut verändern (z.B. manche Kunststoffe)

Einsatz:

- Behälter, verpackte Gegenstände, insbesondere Einwegartikel
- pharmazeutische Produkte
- Lebensmittel (in der Schweiz nicht zugelassen)

UV

- Nur Oberflächenbehandlung, geringe Eindringtiefe (Poren, Schmutz etc.)
- Abstand und Schattenwurf berücksichtigen
- Luft (klinischer Bereich) und Wasser (Wasseraufbereitung) : Nur bei genügend langer Kontaktzeit wirksam

Filtrationsverfahren

Je nach Porengröße und Filtrationsverfahren:

- Keimzahlreduktion
- Keimentfernung

Porengrößen für Filtration von Flüssigkeiten: $0.2\mu\text{m}$ oder $0.45\mu\text{m}$

Scheibenfilter oder Filterkerzen für Flüssigkeiten

Tiefenfilter (z.B. HEPA oder Hosch) für Luftfiltration (Adsorption von Partikeln)

Luftfilter funktionieren nur im trockenen Zustand!

Für Viren spezielle Adsorptions- und Ultrafilter

Desinfektion: Pasteurisation /UHT-Verfahren

- Nur Abtötung von vegetativen Keimen
- thermoresistente Sporen (*Bacillus* sp. und *Clostridium* sp.) überleben
- ☞ Nahrungsmittelindustrie: Einsatz von Konservierungsmitteln um Auskeimen der Sporen zu verhindern

Dauererhitzung	~30 Min.	62°C
Kurzzeiterhitzung	~20 Sek.	70 - 74°C
Hocherhitzung	3 - 5 Sek.	85 - 87°C
UHT	1 - 3 Sek.	130 - 150°C

Tyndallisierung 30 Min. 100°C
anschliessend 4 Std. 30°C
Zyklus 2mal wiederholen

Besonders geeignet um Sporenbildner abzutöten, wenn das Sterilgut hitzeempfindlich ist. Die Sporen werden durch die Hitze (100°C) zum Auskeimen (bei 30°C) gebracht, die anschliessende Temperaturerhöhung tötet die vegetativen Keime ab.

Desinfektionsmittel

schnell wirksame Mittel *:

- wässrige **Alkohollösungen** (30%) 70% (90%)
Aethylalkohol oder Propylalkohol
Schmales Spektrum: Nur für vegetative Bakterien!
Achtung: Brennbar, explosible Gemische mit Luft bereits bei Raumtemperatur
 - **Natriumhypochlorit** bei pH 4 bis 6.5: Chlorbildung
Breites Spektrum: Bakterien, Bakteriensporen, Viren
 - **Peressigsäure** bei pH 2 bis 3.5
Sehr breites Spektrum: Bakterien, Bakteriensporen, Viren, Pilze
- * schnell wirksam heisst: Mind. 2 Min. Einwirkungszeit für vegetative Keime.

G e b ä u d e

Sachschaden in der Höhe von 150 000 Franken

Bei einem Brand im LFW ist am 1. Mal ein Sachschaden von zirka 150 000 Franken entstanden.

Personen wurden keine verletzt.

Ein Student hatte in einer Laminar Flow Box mit Bunsenbrenner und Alkohol Arbeiten für die sterile Aussaat von Pflanzen

ausgeführt, wobei ihm der Aethanol in Brand geriet. Er machte erfolglose Löschversuche und alarmierte dann seinen

Kollegen. Dieser hatte Mühe mit der Handhabung der Feuerlöscher. In der Zwischenzeit hatte sich jedoch der Brand soweit ausgebreitet, dass die Löschversuche nichts mehr nützten.

Labors für einige Monate nicht brauchbar

Am Gebäude entstand Hitzeschaden. Ein Teil des Labormobiliars wurde zerstört. Der Rauchschaden reichte bis zu den für solche Fälle vorgesehen Brandabschnittstüren. Die betroffenen Labors sind für einige Monate nicht brauchbar.

Abteilung Sicherheit
und Umweltschutz