

# Neue Erkenntnisse zur Sicherheit in der Zellkultur

Paul Distler



Abb. 1: Binder CB 150, CO<sub>2</sub>-Inkubator mit integrierter Heißluftsterilisation bei 180 °C

Die einzig normengerechte und sichere Dekontaminations-Methode für CO<sub>2</sub>-Inkubatoren ist die Heißluftsterilisation bei 180 °C. Das hat jetzt eine unabhängige Studie ergeben. Dieses Konzept ist in nur wenigen CO<sub>2</sub>-Inkubatoren realisiert, wie etwa dem Binder Inkubator, Serie CB.

## Der Hintergrund: mehr Sicherheit

Neue zellbiologische Anwendungsgebiete, etwa die Forschung an Zell- und Gewebeersatz, haben die Anforderungen an moderne CO<sub>2</sub>-Inkubatoren tiefgreifend verändert: Neben hochpräziser Temperaturregelung und schnellster CO<sub>2</sub> Regeldynamik (Distler, GIT Labor-Fachzeitschrift 7/2002 <sup>(1)</sup>) rücken Aspekte wie Keimfreiheit und Sterilität zunehmend in den Mittelpunkt. Die sterile Kulturumgebung ist bei allen in vitro Anwendungen eine Grundvoraussetzung für sicheres Arbeiten auf der Basis GLP/GMP\* konformer Arbeitsprozesse – insbesondere beim Umgang mit humanen Zellen und Geweben. Maximale Hygiene trägt signifikant zur Risikominimierung und Steigerung der Prozesssicherheit bei. Davon profitiert bei Anwendungen in der regenerativen Medizin nicht nur der Wissen-

schaftler, sondern auch der Patient (z. B. bei der Knorpelzellvermehrung). Bei der Kultivierung von humanem Zellmaterial sind, analog zu den Vorschriften für den Umgang mit Blutpräparaten, entsprechende Sicherheitsaspekte zu berücksichtigen, die zum Ausschluss jeglicher Infektionsrisiken (Hepatitis, HIV, etc.) beitragen sollen.

## Nur Heißluft-Sterilisation bei 180°C genügt der Norm nach DIN 58947

Systeme mit integrierten Desinfektionsverfahren wie UV-Bestrahlung der zirkulierenden Umluft, permanente HEPA-Filtration oder Desinfektion bei feuchter Hitze bieten nur sehr begrenzt Sicherheit. Den strengen Richtlinien der thermischen Sterilisationsverfahren genügen all diese Methoden nicht, wie in DIN 58947, Teil 3 festgelegt oder im Bundesgesundheitsblatt 22, Nr. 10 <sup>(2)</sup> dokumentiert. Auch die Keimreduktion durch Desinfektionsverfahren ist qualitativ nicht mit dem technisch aufwendigen Verfahren der 180 °C Heißluft-Sterilisation zu vergleichen. Nur diese ist das einzig sichere in DIN 58947 <sup>(2)</sup> festgelegte Verfahren zur normgerechten Dekontamination, welches auch international anerkannt ist.

## Unabhängige Studie

Exemplarisch wurde in einem international

anerkannten, nach ISO/IEC 17025 akkreditierten mikrobiologischen Prüflabor eine neutrale Vergleichsstudie zwischen einem Inkubator mit 180 °C Heißluftsterilisation (Binder CB, Abb. 1) sowie einem CO<sub>2</sub>-Inkubator mit 90 °C Dekontaminationsroutine (Wettbewerbsmodell) durchgeführt. Ziel dieser Studie waren qualitative und quantitative Aussagen zur Leistungsfähigkeit der zwei verschiedenen Dekontaminationsverfahren unter identischen Prüfbedingungen. Als Testkeime dienten standardisierte, für mikrobiologische Tests bei Medizingeräten und Autoklaven gebräuchliche vegetative Keime sowie Sporen von sporenbildenden Keimen (vgl. Tab. 1). Letztere wurden als Sporenpäckchen appliziert, zur Kontrolle zusätzlich auch in geöffneter Form. Entsprechend der Herstellerangaben wurden die mit Testkeimen kontaminierten CO<sub>2</sub>-Inkubatoren dann anschließend dem jeweiligen Dekontaminationsverfahren unterzogen. Beim CO<sub>2</sub>-Inkubator Binder Serie CB ist dies eine 1-stündige Sterilisation bei 180 °C trockener Hitze, beim Wettbewerbsmodell die Exposition unter 90 °C/feuchte Hitze für 9 Stunden. Im Anschluss hieran wurde der Grad der Keimreduktion für alle Testkeime durch Abstriche und nachfolgende Vermehrung in entsprechenden Kulturmedien untersucht. Unter Einbezug der entsprechenden Kontrollversuche und mehr-

### Vegetative Formen (1–10) und Sporen (11,12)

1.	Enterococcus faecalis	ATCC 29212
2.	Escherichia coli	ATCC 8739
3.	Pseudomonas aeruginosa	ATCC 9027
4.	Staphylococcus epidermis	ATCC 12228
5.	Salmonella typhimurium	ATCC 13311
6.	Candida albicans	ATCC 10231
7.	Aspergillus niger	ATCC 16404
8.	Bacillus subtilis	ATCC 6633
9.	Bacillus subtilis	ATCC 9372
10.	Bacillus stearothermophilus	ATCC 7953
11.	Bacillus subtilis-Sporenstreifen	ATCC 9372
12.	Bacillus stearothermophilus-Sporenstreifen	ATCC 7953

Tab. 1: Liste der applizierten Testkeime

\* (Good Laboratory/Manufacturing Practice)

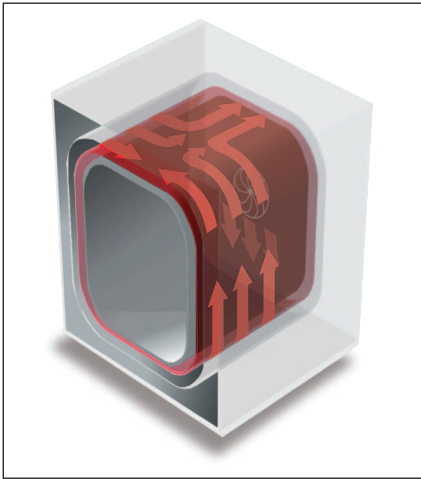


Abb. 2: APT-Line Vorwärmkammerprinzip des Binder CO<sub>2</sub>-Inkubators, Serie CB

maligner Versuchswiederholungen ergab sich ein eindeutig klares Ergebnis zur Wirkungsweise der beiden unterschiedlichen Verfahren.

**Sporen sind bei Desinfektion mit 90 °C/feuchte Hitze nicht zu eliminieren**

Die Auswertung der Studie brachte ein deutliches Ergebnis: Das Resultat der 90 °C/feuchte Hitze-Desinfektion war ungenügend. Vegetative Keimformen wurden zwar inaktiviert, die wesentlich widerstandsfähigeren Sporenformen der Gattung *Bacillus subtilis* und *Bacillus stearothermophilus* hingegen widerstanden dem Desinfektionsverfahren weitestgehend unbeschädigt (vgl. Tab. 2). Beim Inkubator mit normengerechter Heißluftsterilisation wurden wie erwartet alle vegetativen Testkeime sowie auch die Sporen vollständig eliminiert (vgl.

Tab. 2). Damit wurde das Ziel der nachhaltigen und vollständigen Keim-Eliminierung im Inkubator mit 90 °C/feuchte Hitze-Desinfektion nicht erreicht. Dieser Befund war in mehrfachen Versuchswiederholungen reproduzierbar und traf auf alle im Inkubator getesteten Bereiche zu.

Das vorliegende Versuchsergebnis widerlegt damit die weit verbreitete Meinung der angeblichen Sicherheit dieses Verfahrens. Insbesondere stehen die Befunde damit in Gegensatz zu bisherigen einschlägigen Dokumentationen, welche die Wirksamkeit des Verfahrens unter Bezugnahme auf mikrobiologische Tests belegen sollen. Diese Diskrepanz rührt wahrscheinlich daher, dass bei den früheren Nachweisen nicht mit Sporen, sondern nur mit wesentlich unempfindlicheren vegetativen Formen getestet wurde.

**Fazit**

Keimreduktion durch Desinfektion bei 90 °C/feuchte Hitze ist qualitativ keinesfalls mit der 180 °C Heißluftsterilisation vergleichbar. Dieses Verfahren ist auch bei sehr langen Expositionszeiten über viele Stunden ungeeignet und unzureichend, um eine sterile Umgebung entsprechend der gängigen Vorschriften zu garantieren. Die unseren Erkenntnissen zufolge einzig verlässliche und international anerkannte Methode für den Einsatz bei hochanspruchsvoller Zellkultur unter GLP/GMP-Bedingungen ist die thermische Heißluftsterilisation bei 180 °C. Für kritische Zellkulturen-Anwendungen mit pathogenen Viren und Bakterien bietet die Heißluftsterilisation bei 180 °C einzigartige Sicherheit. Zudem hat das Verfahren den Vorteil einer signifikanten Zeit- und damit Kostenersparnis von mehreren

Stunden gegenüber der langwierigen thermischen Desinfektion bei 90 °C/feuchte Hitze. Maximale Sicherheit und Prozessqualität der Zellkultur in CO<sub>2</sub>-Inkubatoren setzt zudem eine Reihe weiterer Aspekte voraus. Dieses sind perfekte Temperierpräzision, hervorragende Dynamik in der Regulation von CO<sub>2</sub> und Temperatur, sowie modernste Regler Technologie für eine optimale Prozesssteuerung und Überwachung. Binder CO<sub>2</sub>-Inkubatoren der Serie CB verfügen über all diese wichtigen Eigenschaften und bieten dem Anwender die perfekte Voraussetzung für optimalen Kulturerfolg.

**Literatur:**

- 1) P. Distler (2002), GIT Labor-Fachzeitschrift 7, 801- 803
- 2) DIN 58947, Sterilisation – Heißluftsterilisatoren, 1990
- 3) Bundesgesundheitsblatt (1979), 22 Nr. 10, 193-200

*Anschrift des Autors:*

Dr. Paul Distler  
 Binder GmbH  
 Bergstr. 14  
 78532 Tuttlingen  
 Tel.: 07461-1792-0

Prüfstelle	CO <sub>2</sub> Inkubator Wettbewerbsmodell Desinfektion bei 90 °C/feuchte Hitze								Binder CO <sub>2</sub> Inkubator Heißluftsterilisation bei 180 °C							
	Sporenstreifen <i>Bacillus subtilis</i>				Sporenstreifen <i>Bacillus stearothermophilus</i>				Sporenstreifen <i>Bacillus subtilis</i>				Sporenstreifen <i>Bacillus stearothermophilus</i>			
	a	b	c	d	a	b	c	d	a	b	c	d	a	b	c	d
Türe	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Decke	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Boden	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Rückwand	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
linke Seitenwand	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
rechte Seitenwand	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Kontrolle Sporenstreifen	+				+				+				+			

+ = Wachstum in Caso-Bouillon, - = kein Wachstum in Caso-Bouillon, a-d, 4 Sporenstreifen pro Testkeim. Die Desinfektion bei 90 °C / feuchte Hitze im Wettbewerbsmodell führt zu einer unvollständigen und ungenügenden Sporeneliminierung. Durch Heißluftsterilisation bei 180 °C im Binder CO<sub>2</sub>-Inkubator, Serie CB werden Sporen entsprechend DIN 58947 normengerecht eliminiert.

Tab. 2: Wirksamkeit der Desinfektion bei 90 °C / feuchte Hitze und Heißluftsterilisation bei 180 °C in CO<sub>2</sub>-Inkubatoren.