

Biosicherheit von Zentrifugen: Kampagne mit Probenerhebungen

Bei Betriebsinspektionen zur Kontrolle der Biosicherheit lassen sich Verunreinigungen mit Mikroorganismen in Laboratorien anhand von Wischproben feststellen. Auf Grund der bisherigen Erfahrungen können insbesondere Zentrifugen kontaminiert sein. Erstmals wurden daher in einer Kampagne die Zentrifugen in verschiedenen Laboratorien in den Kantonen BS und BL überprüft.

Es zeigte sich, dass gegenüber den früheren Messungen immer noch häufig Kontaminationen gemessen werden, diese aber durchschnittlich ein erheblich geringeres Ausmass hatten. Dies deutet darauf hin, dass die Betriebe die Problematik mehrheitlich erkannt haben und Gegenmassnahmen ergriffen haben.

1. Einleitung

Ausgangslage

Um die Einhaltung der erforderlichen Sicherheitsmassnahmen zu kontrollieren, inspizieren die Kontrollstelle für Chemie- und Biosicherheit (KCB) und das Sicherheitsinspektorat BL (SIT) Laboratorien und Anlagen, in denen mit pathogenen oder gentechnisch veränderten Organismen gearbeitet wird. Dabei werden fallweise auch Probenerhebungen durchgeführt, mit denen Laboratorien auf Kontaminationen mit Mikroorganismen untersucht werden können.

Bei den bisherigen Probenerhebungen wurden insbesondere bei Zentrifugen¹ Kontaminationen mit Mikroorganismen festgestellt. Solche Kontaminationen können potentielle Quellen für Verschleppungen sein. Zudem stellen sie ein mögliches Expositions- und damit je nach Mikroorganismus auch ein Infektionsrisiko dar. Kontaminationen entstehen durch die Freisetzung von Aerosolen aus den Zentrifugengefässen, können jedoch auch von Mängeln bei den Hygienemassnahmen herrühren.

Rechtliche Grundlage

Die Vermeidung von Aerosolen und angemessene Hygienemassnahmen in Laboratorien gehören zu den Grundsätzen der guten mikrobiologischen Praxis. Gemäss Einschliessungsverordnung (ESV, Anhang 4) sind Massnahmen zu ergreifen, um die Bildung und Freisetzung von Aerosolen und damit auch durch Zentrifugen verursachte Kontaminationen zu minimieren (Sicherheitsstufe 2) oder zu verhindern (ab Sicherheitsstufe 3).

Ziel der Kampagne

Grundsätzlich soll mit den Probenerhebungen das Sicherheitsbewusstsein in den Betrieben verbessert und auf Schwachstellen im Labor aufmerksam gemacht werden. Im Rahmen der Kampagne sollte der Einsatz technischer und organisatorischer Massnahmen, die der Freisetzung von Mikroorganismen aus Zentrifugen entgegenwirken, gefördert werden.

Zu diesem Zweck wurden in Betrieben mit Tätigkeiten der Klasse 2 (Tätigkeiten mit Organismen, die ein *geringes* Risiko aufweisen) Zentrifugen auf Verunreinigungen mit Mikroorganismen geprüft. Um das Ausmass der Kontaminationen zu bestimmen, wurden Wischproben entnommen, die mit molekularbiologischen Methoden auf das Vorhandensein der am jeweiligen Ort verwendeten Mikroorganismen getestet wurden.

Gesamthaft wurden 21 Zentrifugen unterschiedlichen Typs in 6 Betrieben im Kanton Basel-Stadt und in 2 Betrieben im Kanton Basel-Landschaft geprüft. Der Termin der Probenahmen wurde vorher nicht bekannt gegeben, um ein möglichst authentisches Bild zu bekommen.

2. Vorgehen und Methodik

Ablauf der Probenerhebung

Pro Zentrifuge wurden jeweils an drei Orten (innerhalb Rotor im Röhrchenhalter; an der Zentrifugeninnenwand auf der Höhe des Zentrifugendeckels; in der Umgebung der Zentrifuge im Umkreis von 50 cm) Wischproben genommen; an jedem dieser Orte wurden drei Proben erhoben (s. Abb. 1).

¹ Zentrifugen: Geräte zur Abtrennung von festen Partikeln aus Flüssigkeiten

Analysemethoden

Aus der Wischprobe wurde die DNA (im Fall von Lentiviren auch die RNA) extrahiert. Diese wurden dann jeweils mittels quantitativer PCR² oder Reverse Transkriptase-PCR (für RNA) analysiert. Durch den Einsatz von organismenspezifischen Gensonden in der PCR-Reaktion konnten die Proben auf die Nukleinsäuren der Mikroorganismen, die in der betreffenden Zentrifuge verwendet werden, untersucht werden.

Verwendet wurden folgende validierte Standardanleitungen:

- Abwischvorgang: SOP 220 (Viren), SOP 279 (Bakterien)
- Nukleinsäureextraktion: SOP 221 (Viren-DNA), SOP 348 (Viren-RNA), SOP 337 (Bakterien-DNA).
- Die Extrakte wurden anhand der in der folgenden Tabelle aufgeführten SOPs jeweils im Doppel untersucht.

Vacciniaviren	SOP 222	Campylobacter	SOP 280
Adenoviren	SOP 239	Salmonellen	ABI-Kit
Lentiviren	SOP 347	Streptococcus pneumoniae	SOP 331

Die SOPs sind zum Teil auf der Homepage des Kantonalen Laboratorium BS einsehbar: <http://www.kantonslabor-bs.ch/content.cfm?nav=17&content=24>. Die SOP zum quantitativen Nachweis von Lentiviren (HIV1)-RNA ist bei der KCB auf Anfrage erhältlich.

² PCR: Polymerase-Kettenreaktion zur Amplifikation spezifischer Nukleinsäureabschnitte

Abb. 1: Die Probenerhebungen wurden jeweils an 3 Orten durchgeführt.

Im Röhrenhalter



An der Innenwand der Zentrifuge



In der Umgebung der Zentrifuge



Bedeutung der Analyseergebnisse

Der Nachweis von organismenspezifischen Nukleinsäurefragmenten erlaubt keine direkten Rückschlüsse auf intakte (infektiöse) Organismen. Erhöhte Werte weisen aber darauf hin, dass an dem Ort der Probenahme in der Vergangenheit eine Kontamination stattgefunden hat. Für die Beurteilung einer Kontamination mit Organismen existieren keine offiziellen Grenzwerte. Die Bewertung erfolgt daher durch Vergleichen mit anderen Laboratorien, deren Ausstattung dem üblichen Stand der Sicherheitstechnik entspricht.

Die Methoden ermöglichen es, die *Grössenordnung* einer Nukleinsäure-Kontamination festzustellen. Um die gemessenen Werte vergleichen und einordnen zu können, werden folgende Schwellenwerte unterschieden:

Theoretische Nachweisgrenze: Die PCR-Analytik erlaubt im günstigsten Fall den Nachweis eines einzigen Moleküls (1 Genom). Aus dem Anteil der Wischprobe, welcher in der Messung eingesetzt wird, sowie dem Verlust während der Aufarbeitung, ergibt sich die theoretische Nachweisgrenze für die gesamte Probe (zum Nachweis von Viren-DNA werden z.B. 1/50 der Wischprobe eingesetzt, bei der die DNA mit einer Effizienz von ca. 50% aus der Probe extrahiert werden konnte, woraus sich eine theoretische Nachweisgrenze von 100 Genomkopien ergibt).

Bestimmungsgrenze: Werte, die das 10-fache der theoretischen Nachweisgrenze übersteigen, sind quantitativ aussagekräftig, d.h. erst ab dieser Schwelle ist eine Aussage über die Menge an RNA oder DNA möglich. Werte unterhalb der Bestimmungsgrenze sind statistisch ungenügend gesichert. Die in Laboratorien gemessenen Verunreinigungen mit den häufigsten viralen Vektoren liegen in der Regel in diesem Bereich.

Überdurchschnittliche Kontamination: Von einer *überdurchschnittlichen Kontamination* wird gesprochen, wenn die Bestimmungsgrenze um ein 100-faches überschritten wird.

3. Resultate

Die nachfolgende Tabelle enthält eine Übersicht über die getesteten Zentrifugen und die Größenordnung der gemessenen Werte.

Ergebnisse der Probenanalyse					
Organismus	Anzahl Betriebe	Anzahl Zentrifugen ¹			
		Total	Kontamination		
			nicht nachweisbar oder unterhalb Bestimmungsgrenze	nachweisbar (oberhalb Bestimmungsgrenze)	davon überdurchschnittlich (≥ 100-fach über Bestimmungsgrenze)
Lentiviren	4	13	5	8	2 ²
Adenoviren	5	7	3	4	1
Vacciniaviren	1	3	1	2	-
Campylobacter	2	3	3	-	-
Streptococcus pneumoniae	1	2	1	1	-
Salmonella	2	3	3	-	-

¹ Die Zentrifugen wurden teilweise auf mehrere Mikroorganismen untersucht.

² In einem Fall wurde auch lentivirale RNA nachgewiesen, was auf das Vorhandensein intakter infektiöser Viruspartikel hindeutet. (Beim Nachweis von DNA ist dieser Rückschluss nicht möglich, da nicht zwischen intakten Organismen und einer Kontamination mit Plasmid-DNA unterschieden werden kann.)

Bei 16 der getesteten 21 Zentrifugen konnte DNA resp. RNA gemessen werden. Bei den Viren lagen die Werte mehrheitlich knapp oberhalb der Bestimmungsgrenze (s. Tabelle und Abbildung 2). Sie liegen im Rahmen dessen, was üblicherweise in ähnlichen Labors gemessen wird. In drei Zentrifugen ergaben die Messungen aber eine überdurchschnittliche Kontamination (>100-fach über Bestimmungsgrenze). Diese wurden in den Röhrchenhaltern (Lentiviren) und an der Innenwand einer Zentrifuge (Adenoviren) gemessen (s. Abbildung 2).

In den 8 überprüften Zentrifugen, die für Bakterien oder Vacciniaviren verwendet wurden, wurden geringe Werte gemessen, die mit einer Ausnahme unterhalb der Bestimmungsgrenze lagen.

Bei der Kampagne wurden im Durchschnitt geringere Kontaminationen gemessen als bei den bisher durchgeführten Probenerhebungen. Eine Verbesserung wurde vor allem in zwei Zentrifugen bezüglich Viren (s. Abbildung 2b, Z2) und bezüglich Bakterien (nicht dargestellt) festgestellt, in denen bereits bei früheren Kontrollen Proben erhoben und auf Grund von festgestellten Kontaminationen Korrekturmaßnahmen veranlasst worden waren.

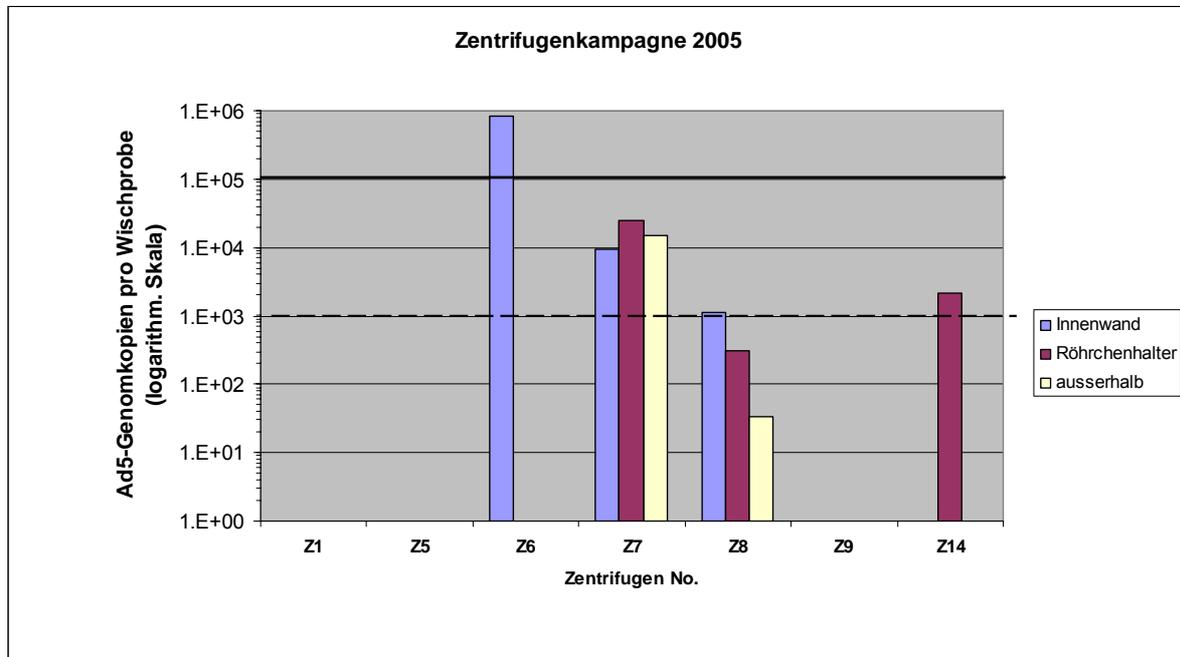
Hingegen wurden in einer Zentrifuge zum zweiten Mal Kontaminationen an der Zentrifugeninnenwand festgestellt, die auf eine Freisetzung von Aerosolen aus dem Rotor hindeuteten. Die von der KCB empfohlene Massnahme - die Ausrüstung des Zentrifugenrotors mit einem Aerosolschutzdeckel – wurde in der Zwischenzeit umgesetzt (s. Abbildung 2a, Z6).

Die Ergebnisse zeigen, dass in Zentrifugen zwar häufig Kontaminationen gemessen werden, diese aber selten überdurchschnittlich sind. Diese Kontaminationen können durch geeignete Massnahmen minimiert resp. beseitigt werden (s. unter 5.). Dadurch lassen sich wie eingangs

erwähnt das Risiko einer Exposition mit infektiösem Material oder Verschleppungen vermindern.

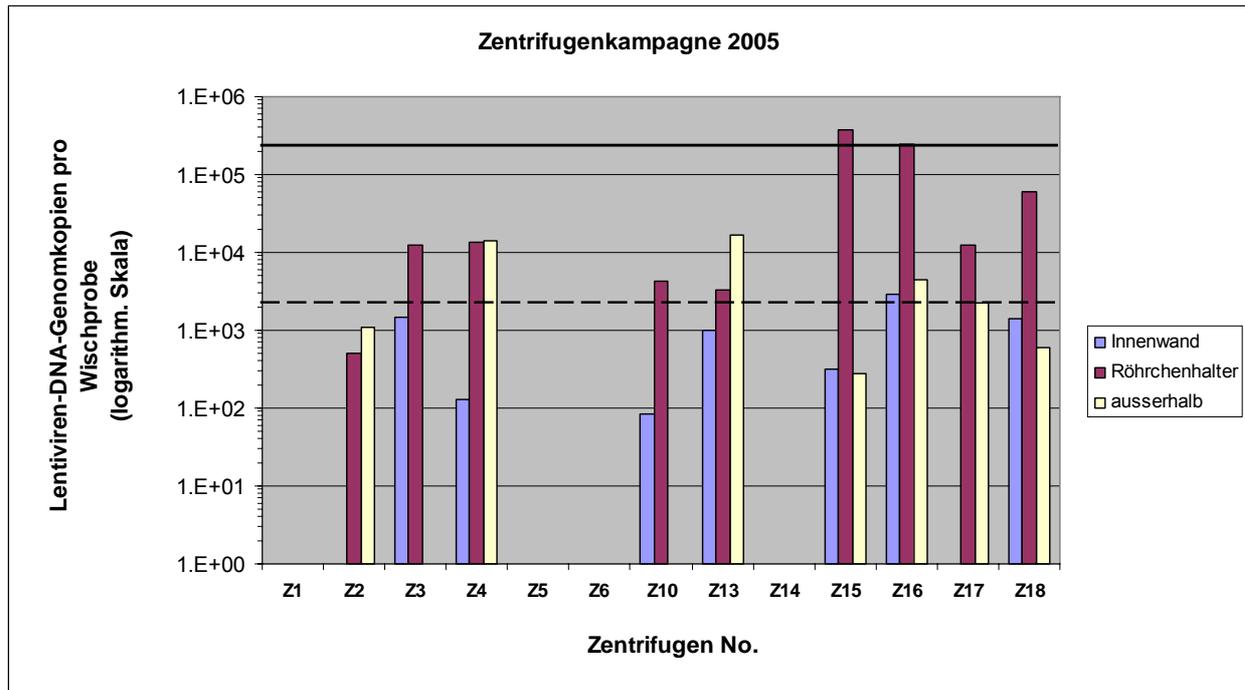
Abb. 2 Messergebnisse der am häufigsten geprüften viralen Vektoren

a. Adenoviren



Ad5: Adenovirus Typ 5; **gestrichelte Linie:** Bestimmungsgrenze (10x theoretische Nachweisgrenze);
Werte oberhalb der **durchgezogenen Linie** gelten als überdurchschnittliche Kontaminationen
Dargestellt ist jeweils das arithmetische Mittel der Triplikate eines Probenahmeortes.

b. Lentiviren



gestrichelte Linie: Bestimmungsgrenze (10x theoretische Nachweisgrenze);
 Werte oberhalb der **durchgezogenen Linie** gelten als überdurchschnittliche Kontaminationen.
 Dargestellt ist jeweils das arithmetische Mittel der Triplikate eines Probenahmeortes.

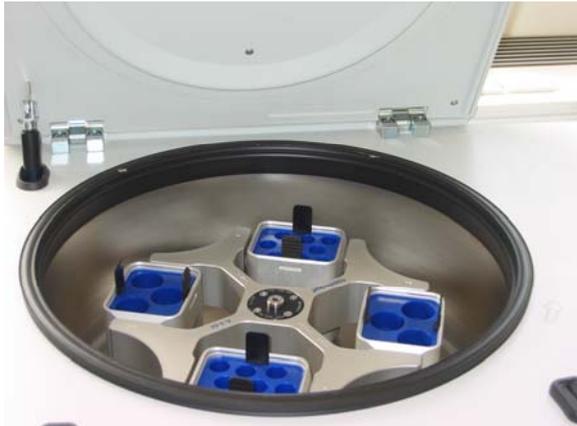
4. Massnahmen zur Minimierung und Vermeidung von Kontaminationen

Zur Minimierung resp. Verhinderung von Kontaminationen stehen verschiedene technische und organisatorische Mittel zur Verfügung:

Technische Schutzmassnahmen:

Durch die Verwendung dichter Zentrifugenröhrchen kann ein Austreten von Aerosolen bei der Quelle minimiert werden. Einige weit verbreitete Typen von Zentrifugenröhrchen werden unter der Zentrifugalkraft komprimiert und dadurch undicht. Für die Zentrifugation empfehlen sich Röhrchen mit Schraubverschluss, die mit einem O-Ring versehen sind.

Eine Freisetzung von Mikroorganismen aus Zentrifugen kann vermieden werden, wenn der Rotor oder die Gehänge mit einem Aerosolschutzdeckel ausgerüstet sind (s. Abb. 3). Dies ist um so wichtiger, je höher das Risiko ist (abhängig u.a. von der Übertragbarkeit der Organismen, Konzentration, Überlebensfähigkeit der Organismen in der Umwelt). Handelt es sich um aerogen übertragbare Organismen, bei denen ein Infektionsrisiko auf Grund freigesetzter Aerosole möglich ist, so ist die Verwendung von Aerosolschutzdeckeln in jedem Fall notwendig.

Abb. 3

Zentrifugeneinsätze ohne Aerosolschutzdeckel



Zentrifugeneinsätze mit Aerosolschutzdeckel

Für Ultrazentrifugen besteht die Möglichkeit, diese mit einem HEPA-Filter auszustatten oder die abgesaugte Abluft in eine mikrobiologische Sicherheitswerkbank abzuführen.

Hygienemassnahmen und korrekte Benutzung der Zentrifugen:

In Ergänzung zu den technischen Massnahmen sollten die Zentrifuge und der benachbarte Arbeitsbereich regelmässig desinfiziert und gereinigt werden. Den Röhrenhaltern sollte dabei besondere Beachtung geschenkt werden, um Verschleppungen von Kontaminationen über verschmutzte Röhren zu verhindern.

Hygienemassnahmen sind besonders für Geräträume, die durch viele verschiedene Personen genutzt werden, wichtig. Die für infektiöse Organismen verwendeten Geräte sollten deutlich mit einem Biogefährdungszeichen gekennzeichnet werden, um das Bewusstsein für Risikozonen zu erhöhen. Bei der Benutzung der Zentrifuge ist es wichtig, den Zentrifugeneinsatz (z.B. Einsatz aus Ausschwing-Rotoren) beim Entladen geschlossen in eine mikrobiologische Sicherheitswerkbank zu transferieren und erst dort zu öffnen, da auch nach der Zentrifugation Aerosole entweichen können.

**Abb. 4 Korrektes Handling der Zentrifugen**

Der Zentrifugeneinsatz sollte in der mikrobiologischen Sicherheitswerkbank beladen und entladen werden.

Ausbildung

Von zentraler Bedeutung ist die Ausbildung des Laborpersonals, besonders wenn es im Umgang mit infektiösen Organismen noch wenig Erfahrung hat. Hierbei gilt es, das Bewusstsein für die Entstehung von Bioaerosolen bei verschiedenen Labortätigkeiten zu stärken. Die Probenerhebungen können hierbei als Hilfsmittel dienen. So wurden beispielsweise die Ergebnisse der vorliegenden Kampagne auf Wunsch eines Betriebs bei einer betriebsinternen Ausbildungsveranstaltung präsentiert.

5. Schlussfolgerungen

Bei der Kampagne konnten in über der Hälfte der getesteten Zentrifugen Kontaminationen gemessen werden. Nur in 3 von 21 Fällen wurden überdurchschnittliche Werte gemessen.

Im allgemeinen dürfte die Grössenordnung einer Kontamination auf Grund der gemessenen Werte eher unterschätzt werden. Dies trifft besonders dann zu, wenn das nachgewiesene Material wie im Fall lentiviraler RNA sehr instabil ist. Die gemessenen Werte hängen zudem ab von der Häufigkeit der Benutzung, dem letztmaligen Gebrauch oder der letztmaligen Reinigung der Zentrifuge.

Überdurchschnittliche Messwerte weisen eindeutig darauf hin, dass an dem Ort der Probenahme die Sicherheitsmassnahmen nicht vollständig genügen oder verbessert werden können. Bei allen Messwerten, die über der Bestimmungsgrenze liegen, wird den Betrieben in Anbetracht der möglichen Unterschätzung der Werte empfohlen, ihre technischen Sicherheitsmassnahmen und die Arbeitsgänge auf mögliche Schwachstellen zu überprüfen.