

Erhöhte Arbeitssicherheit durch UVC-Desinfektion in der Kryomikrotomie

Desinfektion mit UV-Strahlung als Alternative zu chemischen Mitteln gewinnt heute zunehmend an Bedeutung. Letztere sind toxisch für den Nutzer, ihre Anwendung und Entsorgung oft schwierig und Maßnahmen zur Arbeitssicherheit erfordern einen erhöhten Aufwand. UVC-Bestrahlung ist technisch ausgereift, sicher und einfach in der Anwendung. Die kurzwellige, energiereiche UVC-Strahlung mit einer Wellenlänge von 254 nm tötet Keime, da sie in bestimmten Bereichen der DNA der Mikroorganismen absorbiert wird und diese photochemisch zerstört: Die Zelle stirbt ab, ohne sich vermehren zu können.

Leica Microsystems setzt die UVC-Desinfektion erstmals in der Kryomikrotomie ein: Der neue CM1850 UV (Abb. 1) bietet erhöhte Arbeitssicherheit und Wirtschaftlichkeit. Beim Arbeiten mit potentiell infektiösen Proben können die Oberflächen und der Luftraum in der Kryostatkammer auf sichere und sehr anwenderfreundliche Weise desinfiziert werden. Die Glasabdeckung der Kryokammer schützt den Anwender, indem sie die keimtötende Strahlung vollkommen abschirmt. Ein Abtauen des Kryostaten ist bei Verwendung von UVC-Strahlung nicht nötig. Die Wirksamkeit einer Ozon-Desinfektion hingegen ist bei tiefen Temperaturen nicht erwiesen. Zudem entfällt der Aufwand für die Beseitigung giftiger Chemikalien.

Erwiesene Wirksamkeit unter praxisnahen Bedingungen

Die Firma ecoscope, Labor für Mikrobiologie und Ökotoxikologie in Amtzell, führte zwei Hauptuntersuchungen für



Ingo Maier



Verena Nickl

die UVC-Oberflächendesinfektion im Leica-Kryostaten durch. Da es dafür weltweit kein standardisiertes Testverfahren gibt, wurden Keime als „Biosimulant“ eingesetzt, die auch in Prüfungen zur Wirksamkeit von chemischen Desinfektionsmitteln verwendet werden. Die Keimreduktion durch UVC-Bestrahlung wurde in verschiedenen Positionen in der Kryostatkammer ermittelt. Das anhand der Untersuchungsergebnisse erstellte Zertifikat bestätigt den keimtötenden Effekt der UVC-Strahlen. Die empfohlenen Bestrahlungszeiten ermöglichen die vollständige Inaktivierung jeglicher Bakterien und Viren im Arbeitsbereich.

Ermittlung der Keimreduktion von *Staphylococcus aureus*

In einer ersten Untersuchung prüfte ecoscope die Wirkung der UVC-Strahlung auf den Standardtestkeim *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Testscheiben aus geschliffenem Edelstahl mit jeweils insgesamt 0,5 ml Bakteriensuspension, aufgebracht in 30 Tropfen in symmetrischer Anordnung und angeetrocknet (Abb. 3), wurden an verschiedenen Positionen in der Kryokammer bei einer Temperatur von -20°C bestrahlt. Abhängig von der Bestrahlungsdauer wurden in den vier Testpositionen (Abb. 2) – auf der Andruckplatte (Position A), in der Pinselablage (B), in der Schnittabfallwanne (C) und auf der Schnellgefrierleiste (D) – die Überlebensraten der Bakterien ermittelt. Die für die Versuche verwendete Bakteriensuspension war auf eine Keimdichte von circa 10^9 koloniebildende Einheiten/ml eingestellt.

Ohne UV-Bestrahlung ergab sich für *Staphylococcus aureus* eine Wiederfindungsrate von 70 %. Diese 70 % der Testkeime, die Präparation, Einfrieren und Rückgewinnung überleben, wurden bei der anschließenden Ermittlung der Keimreduktion berücksichtigt.

Desinfektion nach 30 Minuten Bestrahlung erreicht

Nach den Richtlinien der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiolo-



Abb. 1: Ecoscope bestätigte den keimtötenden Effekt der UVC-Lampe im Leica Routinekryostat CM1850 UV. Die mit Standardtestkeimen gewonnenen Untersuchungsergebnisse erlauben Rückschlüsse auf eine vollständige Inaktivierung gefährlicher Keime wie etwa *Mycobacterium tuberculosis*, die *Aviäre Influenza A/H5N1* oder das *Hepatitis B-Virus*.

gie (DGHM) wird für die Desinfektion durch chemische Mittel eine Reduktion von Bakterien und Pilzen um in der Regel 5 \log_{10} -Stufen (99,999 %) gefordert. Dies schließt auch den besonders für US-Richtlinien wichtigen Tuberkuloseerreger *Myobacterium tuberculosis* mit ein. Der Wert entspricht der europäischen Norm DIN EN 1040 für die Prüfung chemischer Desinfektionsmittel im Suspensionstest (Stufe 1) und einer mittleren Desinfektionsstufe nach Begriffsbestimmungen des U. S. Department of Health and Human Services, der Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology (APIC) und der WHO.

In den Positionen A-C war eine Desinfektion entsprechend dem Kriterium der DGHM bereits nach einer Bestrahlungsdauer von 20 Minuten erreicht. In Position D war eine Bestrahlungsdauer von 30

Minuten erforderlich. Diese 30 Minuten empfiehlt ecoscope auch in dem mit dem Leica CM1850 UV erhältlichen Zertifikat zur Inaktivierung bakterieller Erreger mit Ausnahme widerstandsfähiger Bakteriensporen.

UVC-resistente Viren nach drei Stunden inaktiviert

In der zweiten Testreihe wurde das *Simian Virus 40* (SV 40) als Modellvirus eingesetzt. SV 40 ist ein vorgeschriebenes Testvirus für eine Standardprüfung von chemischen Desinfektionsmitteln. Es ist ein relativ kleines Virus mit einem kleinen Genom aus doppelsträngiger DNA (dsDNA), das besonders hohe Resistenz gegen UV-Strahlung aufweist. Grundlage dafür ist ein zweiter, komplementärer DNA-Strang bei dsDNA-Viren, der bei Schädigung eines Strangs die effiziente Reparatur ermöglicht. Viren mit kleinem Genom sind überdies resistenter gegen Strahlenschädigung als solche mit großem Genom. SV 40 wird als Surrogat für die UV-Inaktivierung des *Hepatitis B-Virus* angesehen, denn dieser ist ebenfalls ein dsDNA-Virus mit nahezu identischer Größe wie SV 40. Somit eignete sich SV 40 optimal für die zweite Hauptuntersuchung mit dem Leica CM1850 UV.

Entsprechend der Tests mit *Staphylococcus aureus* wurden wieder je 0,5 ml Virussuspension in 30 Tropfen auf die geschliffene Fläche der Edelstahltestscheiben aufgetrocknet (Abb. 3). In Annäherung an Praxisbedingungen war die Virussuspension mit Zellkulturmedium und einem Zusatz von 2% fötalem Kälberserum belastet. Ausgelegt wurden die Testscheiben in der Pinselablage – der Testposition B –, wo sie ebenfalls bei einer Temperatur von -20°C mit UV-Licht bestrahlt wurden. Der Ausgangstiter der Virussuspension, der durch Beimpfen von Affennierenzellen bestimmt wurde, ergab einen Mittelwert von circa $10^{6,8}$ /ml. Für die anschließende Berechnung der Reduktion des Virustiters

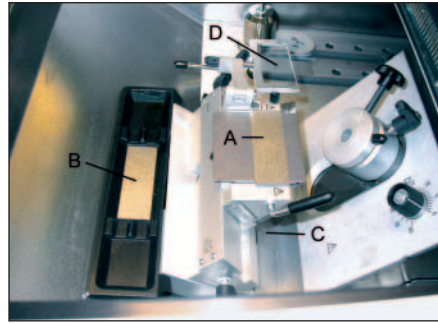


Abb. 2: Die Überlebensraten des Standardtestkeims *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 wurden in vier Positionen der Kryokammer ermittelt: auf der Andruckplatte (Position A), in der Pinselablage (B), in der Schnittabfallwanne (C) und auf der Schnellgefrierleiste (D).

wurde auch in dieser Versuchsreihe vorab eine Wiederfindungsrate durch Präparation und Rückgewinnung unbestrahlter Proben ermittelt. Sie betrug praktisch 100%.

Nach 95 Minuten Bestrahlungsdauer wurde eine 99,99%ige Titerreduktion erreicht. Diese Reduktion um 4 \log_{10} -Stufen entspricht dem anerkannten Kriterium der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten (DVV) und des Robert-Koch-Institutes (RKI) für die Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln gegen Viren. Hochgerechnet auf andere Testpositionen in der Kryokammer und mit Anwendung eines Sicherheitsfaktors empfiehlt ecoscope eine Bestrahlungsdauer von 180 Minuten, um eine hohe Desinfektionsstufe zu erreichen. Bei einer hohen Desinfektionsstufe werden alle Mikroorganismen – resistente Viren, Bakterien- und Pilzsporen – abgetötet.

Die an *Staphylococcus aureus* und SV 40 gewonnenen Untersuchungsergebnisse wurden zu der sehr umfangreichen wissenschaftlichen Literatur zur UV-Inaktivierung und der biologischen Eigenschaften von Mikroorganismen und Viren in Beziehung gesetzt. Ein Vergleich der zur Keimreduktion erforderlichen UVC-Dosiswerte (Tabelle) ermöglicht eine Aussage über die Desinfektionsleis-

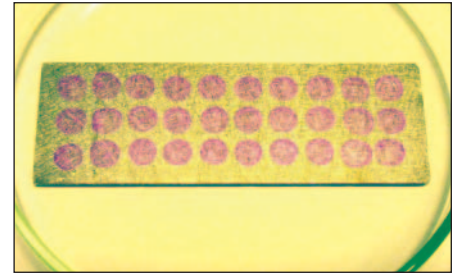


Abb. 3: Edelstahltestscheiben mit *Simian Virus 40* (SV 40). Nach 95 Minuten Bestrahlungsdauer in der Pinselablage ist das besonders UV-resistente Virus inaktiviert.

tung der UVC-Lampe im Leica-Kryostaten. Bei Krankheitserregern wie z. B. dem *Hepatitis B Virus* (HBV), für den keine Messwerte vorliegen, erlaubt die Kenntnis der biologischen Eigenschaften wie Genomgröße und -struktur Rückschlüsse auf die UVC-Sensitivität. HBV ist wie SV 40 ein sehr kleines dsDNA-Virus, und es ist daher zu erwarten, dass es bei ähnlichen Dosiswerten inaktiviert wird.

Zusammenfassung

Wirksam gegen alle klinisch relevanten Pathogene

In den beiden Hauptversuchsreihen bestätigte ecoscope den keimtötenden Effekt der UVC-Lampe im Leica CM1850 UV. Aus den für *Staphylococcus aureus* und *Simian Virus 40* ermittelten Werten errechneten sich die im Zertifikat empfohlenen Bestrahlungszeiten von 30 Minuten für eine mittlere und 180 Minuten für eine hohe Inaktivierungsstufe auf Oberflächen und im Luftraum. Damit werden auch gefährliche Keime wie der Tuberkuloseerreger *Mycobacterium tuberculosis*, das Vogelgrippevirus *Aviäre Influenza A/H5N1* und das *Hepatitis B-Virus* eliminiert.

PD Dr. Ingo Maier

Bis 1980 Biologiestudium; 1985 Promotion; 1997 Habilitation in allgemeiner Botanik. 2002 Gründer und Geschäftsführer der Firma ecoscope, Labor für Mikrobiologie und Ökotoxikologie Hochgratweg 12 88279 Amtzell ingo.maier@ecoscope.de www.ecoscope.de

Verena Nickl

Bis 2003 Magisterstudium der Anglistik und Germanistik und Volontariat in interner und externer Unternehmenskommunikation bei der Cobion AG in Kassel. Seit 2004 im Bereich Corporate Communications der Leica Microsystems AG tätig.

Leica Microsystems AG
Corporate Communications
Ernst-Leitz-Str. 17–37
verena.nickl@leica-microsystems.com
www.leica-microsystems.com

Tab. 1: Übersicht über UVC-Dosiswerte für die Desinfektion von Mikroorganismen und Viren um 5 \log_{10} -Stufen bei Bakterien und Pilzen, 4 \log_{10} -Stufen bei Viren)

Gruppe	Beispiele	Strahlungsdosis [mWs cm ⁻²]
Bakterien	<i>Staphylococcus aureus</i>	10–28
	<i>Escherichia coli</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	3–84
Bakteriensporen	<i>Bacillus spp</i>	
Hefen	<i>Candida albicans</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i>	22–170
Schimmelpilze	<i>Aspergillus fumigatus</i>	14–550
UVC-sensitive Viren	Herpesviren, Influenza-Viren, Vogelgrippe, <i>Hepatitis A</i> , Poliovirus, <i>Vaccinia</i>	13–58
UVC-resistente Viren	<i>Simian Virus 40</i>	440
Adenoviren, Retroviren, Reoviren, SARS	<i>Coronavirus</i>	31–240