

Inaktivierung von Sporen und Sporenbildnern

Gregor Grass

Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr

HZI Braunschweig, 23.02.2016



K. Aistleitner, InstMikroBioBw



Inaktivierung von Sporen und Sporenbildnern

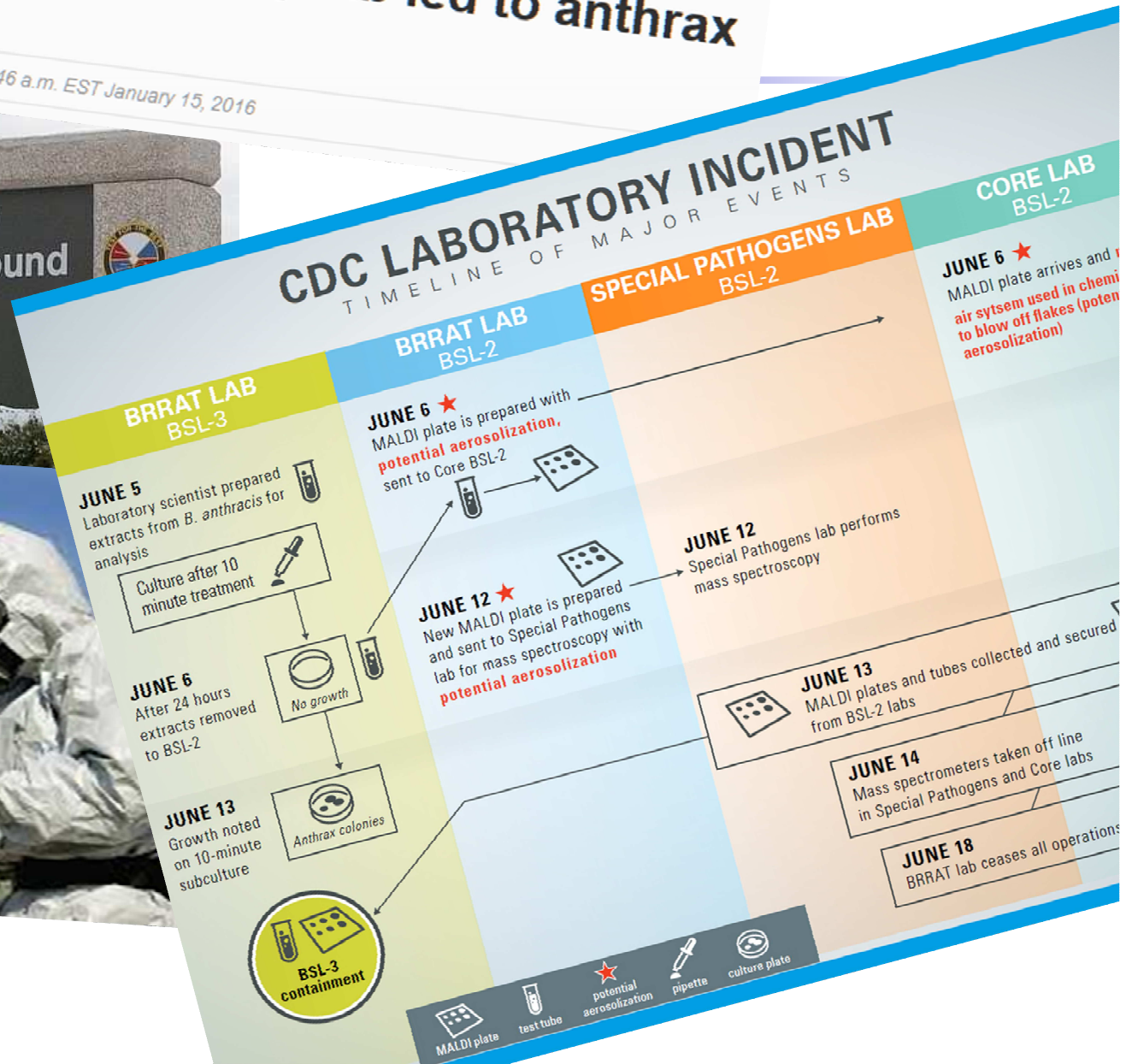


- 1. Einführung: Die Endosporen-Problematik**
- 2. Sporeninaktivierungen „durch“ (Methode)**
- 3. Sporeninaktivierungen „für“ (Anwendung)**
- 4. Herausforderungen bei unbeabsichtigter Freisetzung**
- 5. Diskussion**

Egregious safety failures at Army lab led to anthrax mistakes

Alison Young and Tom Vanden Brook, USA TODAY

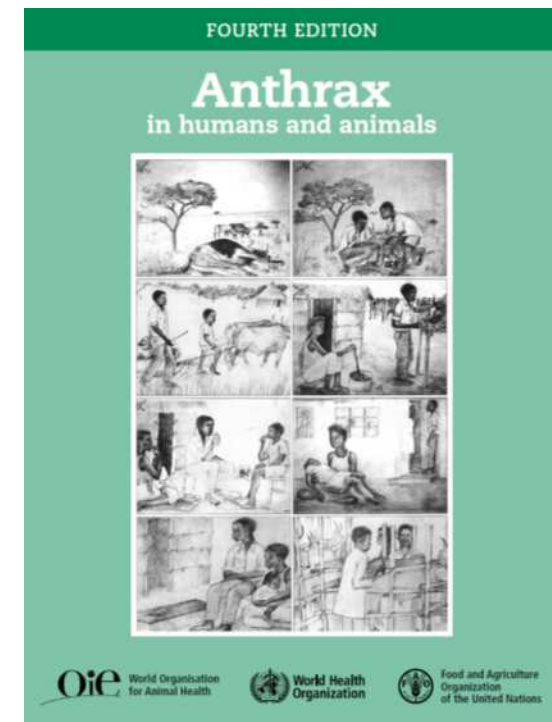
11:46 a.m. EST January 15, 2016



Zum Thema Inaktivierung von Milzbrand-Sporen in der WHO Milzbrand-„Bibel“



- ☠ **Hypochlorit (10 000 ppm verfügbares Chlor) oder**
- ☠ **10% Formalin (30 min)**
- ☠ **Autoklavieren**
- ☠ **Verbrennung**





Sporeninaktivierungen „durch“ (Methode)

Das Sporen-Problem: Unzureichende Inaktivierung durch Hitze



Hitzedesinfektion: Pasteurisation / UHT-Verfahren

- ☣ 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

→ nur Abtötung von vegetativen Keimen

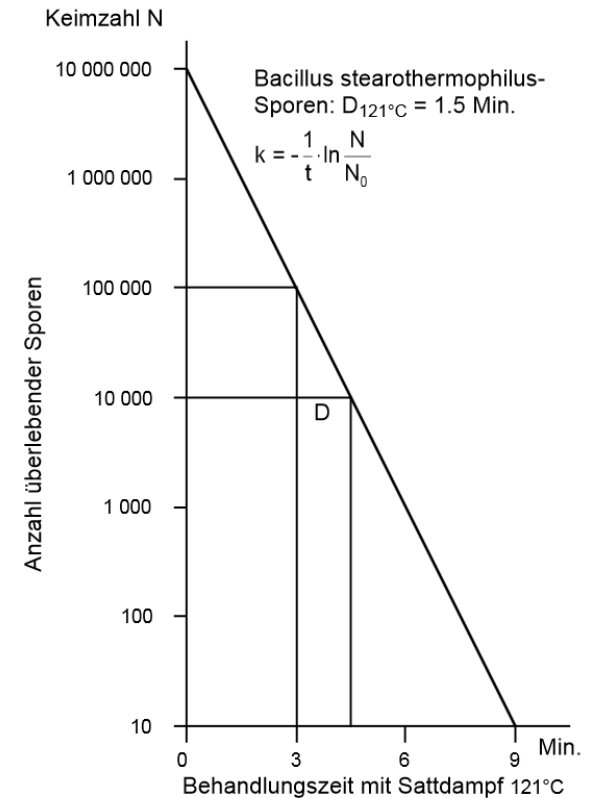
→ thermoresistente Sporen (*Bacillus* ssp. und *Clostridium* ssp.) überleben

Inaktivierung durch Hitze - Autoklavieren



Beispiele von Hitzeresistenz

Resistenzstufe	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



Sterilisation durch mikrobizide Gase



Geeignet für Oberflächen, poröse Materialien (Raumluftfilter) und Textilien

Formaldehyd

- ☣ auch geeignet für Inaktivierung von **Bakteriensporen**
- ☣ toxisch, ziemlich sicher krebserregend
- ☣ stechender Geruch
- ☣ durchdringt PVC und Gummi
- ☣ Denaturierung von Proteinen (chem. Reaktion mit Aminosäuren)

Wasserstoffperoxid

- ☣ auch geeignet für Inaktivierung von **Bakteriensporen**
- ☣ gute Materialverträglichkeit
- ☣ rückstandslos
- ☣ Zugabe von Katalase zu Bebrütungsmedium (Kontrolle) empfohlen

Inaktivierung durch Gamma-Strahlung



Sporen-Inaktivierung als Pulver

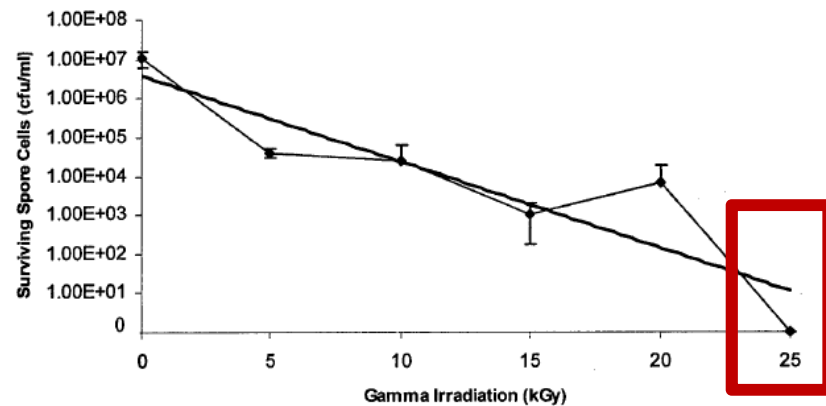


Figure 2: Gamma Irradiation Kill Curve for *Bacillus atropeus* powder. Ten 0.01 g *Bacillus atropeus* samples were gamma irradiated at 15 minute increments. Complete inactivation is seen with 25 kGy at 75 minutes. This corresponded to sample number five. Results are the average of three experiments \pm 1 standard deviation.

Sporen-Inaktivierung als Flüssigkeit

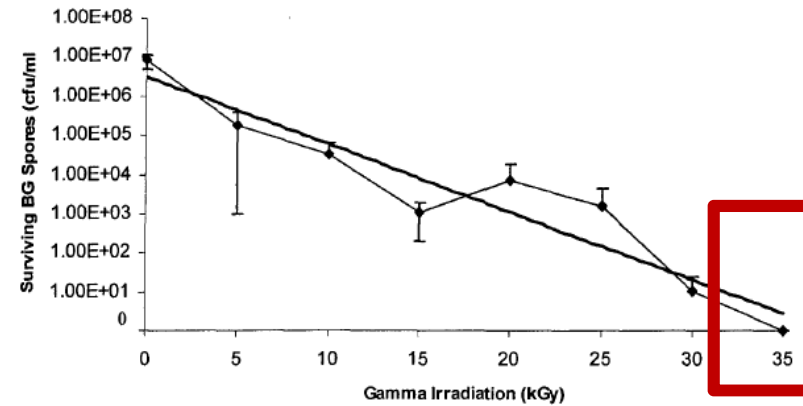


Figure 3: Gamma Irradiation Kill Curve for *Bacillus atropeus* in suspension. Ten 10 mL samples of 0.01 g *Bacillus atropeus* in water were gamma irradiated at 15 minute increments. Complete inactivation is seen with 35 kGy at 105 minutes. This corresponded to sample number seven. Results are the average of three experiments \pm 1 standard deviation.

Inaktivierung durch Desinfektionsmittel



- ☣ wässrige ~~Alkohollösungen~~:
schmales ~~Spektrum~~ - nur für vegetative Bakterien!

Bakterielle Sporen > Pseudomonaden > Schimmelpilze /
Hefen > Gram-positive Bakterien > Gram-negative Bakterien

**Relative Widerstandsfähigkeit
verschiedener Mikroorganismen
gegenüber Desinfektionsmitteln**

- ☣ **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

Wirksame Desinfektionsmittel gegen Sporenbildner der Risikogruppe 3?



Die meisten Desinfektionsmittel für schnelle und sichere Inaktivierung von Milzbrandsporen nicht geeignet!

Von empfohlenen Mitteln (WHO): Formaldehyd, Glutardialdehyd, Peressigsäure (PES), Wasserstoffperoxid und Natriumhypochlorit (NaOCl) töten nur **NaOCl** und **PES** mehr als >99,9 Prozent *Bacillus*-Sporen in 30 min ab.

WHO, EMC, ZDI/98.6 PCb Turnbull: Guidelines for the Surveillance and Control of Anthrax in Human and Animals 3rd edition;
Sagripanti and Bonifacino (1996). Appl. Environ. Microbiol. Feb. 1996, 545-551

Formaldehyd (zehn Prozent) tötet Milzbrandsporen bei praktikablen Konzentrationen und Einwirkzeiten nicht sicher ab

<http://edoc.rki.de/oa/articles/re0qTNMBkZZJY/PDF/21hxFu10WKn4.pdf>

USAMRIID: Dekontaminierung von Sicherheitswerkbänken mit 10% Bleiche oder Hype-Wipe® Desinfektionstüchern

Kriterien zur Auswahl geeigneter sporizider Desinfektionsmittel



- ☣ **starke Keimreduktion bis vollständige Abtötung**
- ☣ **rasche und irreversible Wirkung**
- ☣ **breites Wirkungsspektrum**
- ☣ **Zuverlässigkeit der Wirkung (Eiweißschutzsubstanzen)**
- ☣ **Unschädlichkeit**

„Empfehlung zur Vorgehensweise bei Verdacht auf Kontamination mit gefährlichen Erregern“ (RKI) zur Flächendesinfektion:

- ☣ **1%ige Peressigsäure (Einwirkzeit: 30 Minuten) oder**
- ☣ **10%iges Formaldehyd (Einwirkzeit: 2 Stunden)**

Auswahl Desinfektionsmittel



Die bei der Dekontamination dem Stand der Technik entsprechenden

Desinfektionsmittel und –verfahren:

- ☣ **RKI** (Robert Koch-Institut; www.rki.de) bzw.
- ☣ **VAH** (Verbund für angewandte Hygiene e.V.; <http://www.vah-online.de>) und ggf. der
- ☣ **DVG** (Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft; <http://www.dvg.net>).



Anwendungskonzentrationen / Einwirkzeiten

Wirksamkeiten	5 Min.	15 Min.	60 Min.
VAH-Liste Flächendesinfektion in Krankenhaus und Praxis - geringe Belastung - hohe Belastung	1 % 2 %		
Mykobakterizidie	2 %		1 %
begrenzt viruzid*	1 %		
viruzid*		2 %	
Noro** - geringe Belastung - hohe Belastung	1 % 1 %		
Sporizid gegen <i>C. difficile</i> (Ribotyp 027)*** - geringe Belastung - hohe Belastung	1 % 2 %	1 %	

* gemäß RKI-Empfehlungen Bundesgesundheitsblatt 01/2004

** geprüft mit neuem Prüfvirus: Murines Noro-Virus nach EN 14 476

*** gemäß EN 13704 und EN 13697

DIN-Prüfverfahren (Euro. Normen)



DIN EN 13704:2002-05 (D)

Chemische Desinfektionsmittel - Quantitativer Suspensionversuch zur Bestimmung der sporiziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel in den Bereichen Lebensmittel, Industrie, Haushalt und öffentliche Einrichtungen - Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 1); Deutsche Fassung EN 13704:2002

Inhalt	Seite
Vorwort	3
Einleitung	3
1 Anwendungsbereich	4
2 Normative Verweisungen	5
3 Begriffe	5
4 Anforderungen	5
5 Prüfverfahren	6
5.1 Prinzip	6
5.2 Materialien und Reagenzien	6
5.3 Apparate und Glasgeräte	8
5.4 Herstellung der Sporensuspensionen und Prüflösungen	9
5.5 Verfahrensablauf	11
5.6 Berechnung und Darstellung der Ergebnisse	14
5.7 Schlussfolgerung	16
5.8 Prüfbericht	16
Anhang A (normativ) Herstellung von Bacillus-Stammkulturen-Sporensuspensionen	18
A.1 Material und Reagenzien	18
A.2 Herstellung der Bacillus-Stammkulturen-Sporensuspension	18
Anhang B (normativ) Validierung des Verdünnungs-Neutralisations- und des Membranfiltrationsverfahrens	19
B.1 Prinzip	19
B.2 Herstellung der Sporensuspension	19
B.3 Herstellung der Produkt-Prüflösung	19
B.4 Prüfung auf Validierung	19
B.5 Validierung	22
Anhang C (informativ) Herstellung und Gebrauch von Clostridium sporogenes	23
C.1 Kulturmedien und Reagenzien	23
C.2 Prüfeinrichtung und Glasgeräte	24
C.3 Herstellung von regenerierten Medien und Bebrütungsbedingungen	24
C.4 Herstellung von Clostridium-Sporen-Stammkulturen-Suspension	24
Anhang D (informativ) Neutralisationsmedien	25
Anhang E (informativ) Spüflüssigkeiten	26
Anhang F (informativ) Beispiel für einen typischen Prüfbericht	27
Anhang G (informativ) Bezugsstämme in nationalen Sammlungen	29
G.1 Bacillus subtilis	29
G.2 Bacillus cereus	29
G.3 Clostridium sporogenes	29

DIN EN 13697:2015-06 (D)

Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika - Quantitativer Oberflächen-Versuch nicht poröser Oberflächen zur Bestimmung der bakteriziden und/oder fungiziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel in den Bereichen Lebensmittel, Industrie, Haushalt und öffentliche Einrichtungen - Prüfverfahren und Anforderungen ohne mechanische Behandlung (Phase 2, Stufe 2); Deutsche Fassung EN 13697:2015

Für den Nachweis der sporiziden Wirksamkeit werden in-vitro-Tests gefordert (quantitative Suspensionsversuche)

Suspensionsversuche oder in vitro Tests



lassen generell Aussagen über den mikrobiziden Charakter eines Desinfektionsmittels zu

Auch für europäische Phase 1-Tests und Phase 2, Stufe 1-Tests:

- ☣ Phase 1-Tests: Qualitative Suspensionsversuche → wirksame Konzentrationsbereiche → Resistenzen?
- ☣ Phase 2, Stufe 1-Tests: Obligatorische quantitative Suspensionsversuche → Ermittlung der Konzentration/Zeit-abhängigen Reduktionen der Testorganismen unter Berücksichtigung von organischen Belastungen

Anschließend: **Praxisnahe Versuche**

Gebel, J. et al., 2001, Gemein; 2011, Dissertation; Desinfektionsmittel-Kommission im VAH (Hrsg.). Anforderungen und Methoden zur VAH-Zertifizierung chemischer Desinfektionsverfahren. Stand 2. April 2015. Wiesbaden: Mhp-Verlag, 2015; Desinfektionsmittel-Kommission im VAH. Aktuelle Anforderungen und Methoden zur VAH-Zertifizierung chemischer Desinfektionsverfahren. Stand 2. April 2015. Kommentar und Übergangsmodalitäten. HygMed 2015;40(6):268-269.



Sporeninaktivierungen „für“ (Anwendung)

Inaktivierung im Patientenumfeld

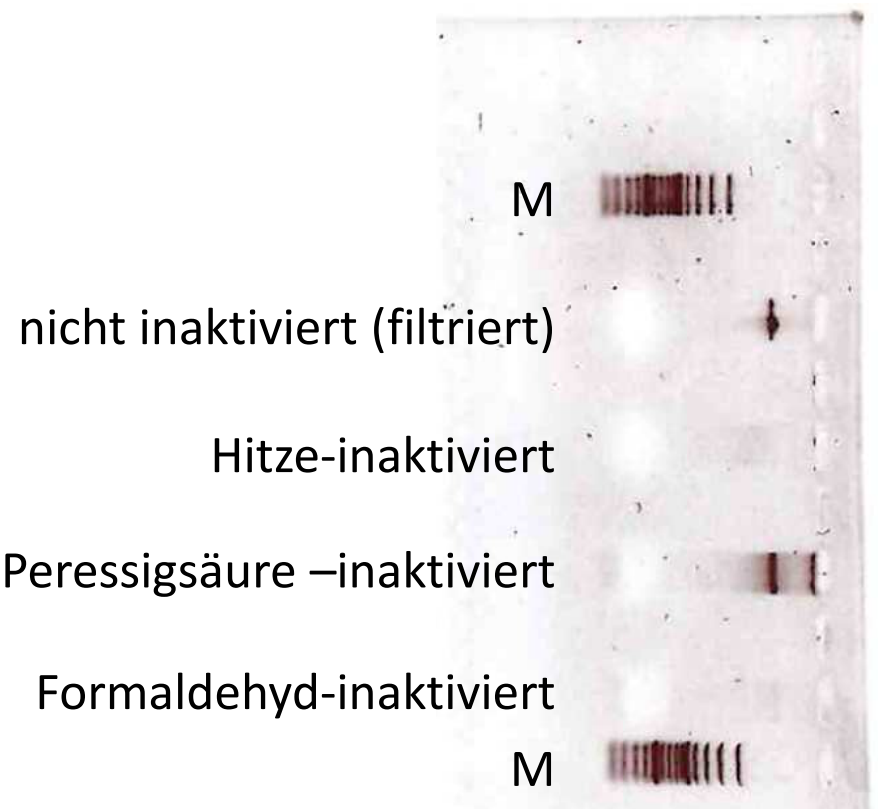


Umgang mit an Milzbrand erkrankten Patienten im Krankenhaus und in OP-Einheiten:

Empfohlene Flächendesinfektion zweimalig mit 1%iger Peressigsäure mit einer Gesamteinwirkzeit von mindestens 30 min, um eine sichere Inaktivierung ggf. vorhandener Sporen zu gewährleisten.

Die Schlussdesinfektion der Flächen ebenfalls zweimalig mit 1%iger Peressigsäure.

DNA-Präparation



Cave: „Kit“-Lysemethoden benötigen Filtrationsschritt!

Probenvorbereitung für Elektronen-Mikroskopie

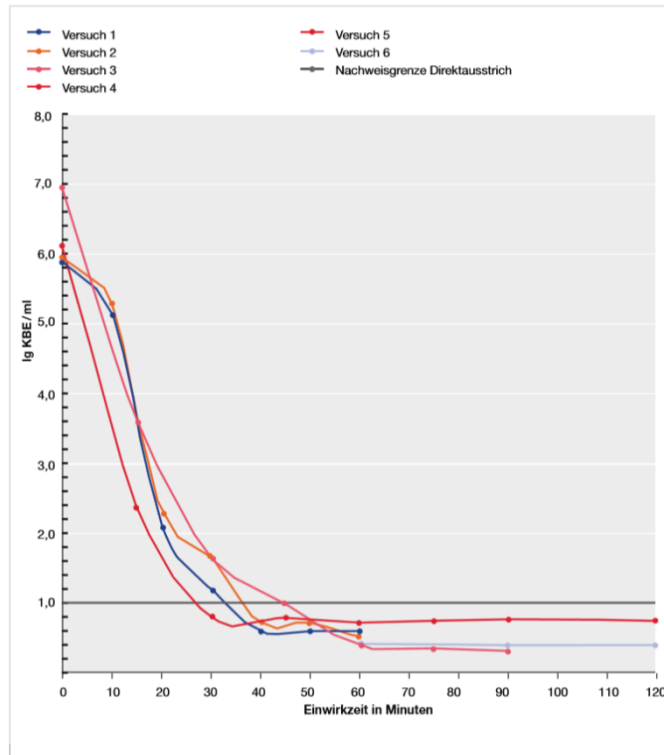
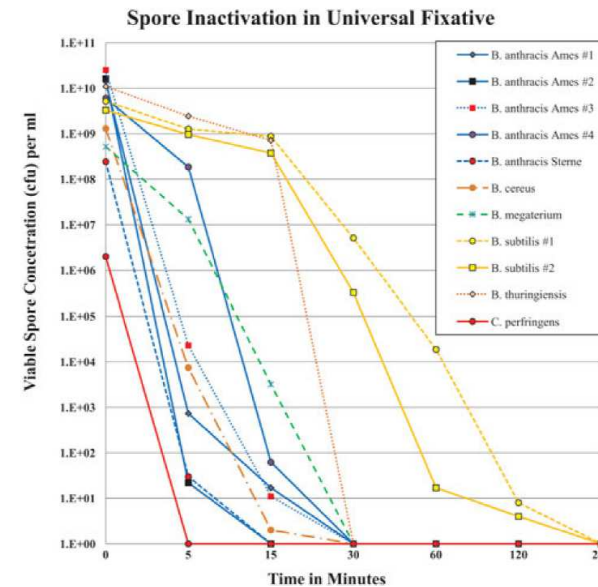


Abb. 34: Wirkung von Fixationsmittel für die EM (10 % FA + 0,05 % GA) auf *B. anthracis*-Sporen in Suspensionsversuchen bei 20 °C



Fixierung/Sporen-Inaktivierung in 4% para-FA mit 1% GA (universal fixative solution)

number of spores remaining viable after 5, 15, 30, 60, 120, and 240 min of treatment with fixative. The time for inactivation varied for the different species, ranging from 5 min for *Clostridium*

... a minimum of ten times the sample volume is typically used.



Inaktivierung für MALDI-TOF

Anal. Chem. 2008, 80, 2026–2034

MALDI-TOF Mass Spectrometry Compatible Inactivation Method for Highly Pathogenic Microbial Cells and Spores

Peter Lasch,^{*,†} Herbert Nattermann,[‡] Marcel Erhard,[‡] Maren Stämmler,[†] Roland Grunow,[‡] Norbert Bannert,[§] Bernd Appel,^{‡,¶} and Dieter Naumann[†]

P25, ZBS2, and ZBS4, Robert Koch-Institut, Nordufer 20, 13353 Berlin, Germany, and AnagnosTec GmbH, Gesellschaft für Analytische Biochemie und Diagnostik mbH, Am Mühlenberg 11, D-14476 Potsdam-Golm, Germany

Table 2. Inactivation of *Bacillus* Spores by TFA (80%, 30 Min) without Filtration^a

species	concn [CFU/mL]	no. of strains	no. of inactivation tests	cases with survivals
<i>B. anthracis</i>	10 ⁹	2	8	0
<i>B. cereus</i>	10 ⁷	2	6	0
<i>B. cereus</i>	10 ⁸	2	13	10
<i>B. licheniformis</i>	10 ⁹	1	5	0
<i>B. subtilis</i>	10 ⁹	1	7	1
<i>B. thuringiensis</i>	10 ⁹	1	6	0
Σ:		9	45	11

^a Survival was tested by recultivation from enrichment media at day 1 and after 14 days according to the European norm EN 14347 (ref 16). Survival of spores was found only for the strains *B. cereus* ATCC 10987 and *B. subtilis* DSM 347 in suspensions of 10⁹ CFU/mL.

Inaktivierungsprotokoll*:

- 3 Impfösen Material (30 µL) in 20 µL H₂O
- Zugabe von 80 µL Trifluor-Essigsäure (TFA)
- Inkubation mit Schütteln für 30 min.
- Verdünnung 1:10 in HPLC-H₂O
- Keine Zentrifugation oder Filtration
- **Testung der Verdünnungen auf Sterilität**

*Modifiziert in: Lasch P, Beyer W, Nattermann H, Stämmler M, Siegbrecht E, Grunow R, Naumann D. 2009. Identification of *Bacillus anthracis* by using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and artificial neural networks. Appl Environ Microbiol 75:7229-7242.

Alternativ (Bruker-Protokoll):

**70% EtOH → 70% Ameisensäure
→ 50% Acetonitril → Filtration**

Weller SA, Stokes MG, Lukaszewski RA. 2015. Observations on the inactivation efficacy of a MALDI-TOF MS chemical extraction method on *Bacillus anthracis* vegetative cells and spores. PLoS One 10:e0143870.



Herausforderungen bei unbeabsichtigter Freisetzung

Herausforderung Milzbrandsporenkontamination



Trommel-Happening (USA, 2009)



→ Sanierung des Gebäudes und der Trommeln
inkl. Dekontaminierung aller Oberflächen mit
einer Kombination aus Reinigung mit Bleiche
und HEPA-Filter-Absaugung

CDC (Roybal Campus) Vorfall 2014



Sporen-Extrakt für MALDI TOF-Analyse

- ⚠ MALDI TOF Inaktivierungs-Protokoll für *Brucella* auf *B. anthracis* angewandt
- ⚠ Proben nur für 10 min. (nicht 24 h) behandelt
- ⚠ Sterilkontrolle bereits nach 24 h bewertet

Ursachen:

1. Ungetestete Prozedur (keine SOP)
2. Sterilität nicht überprüft
3. Mangelhafte Literaturkenntnis
4. Nutzung von pathogenen Stämmen

Report on the Potential Exposure to Anthrax

Centers for Disease Control and
Prevention

7/11/2014

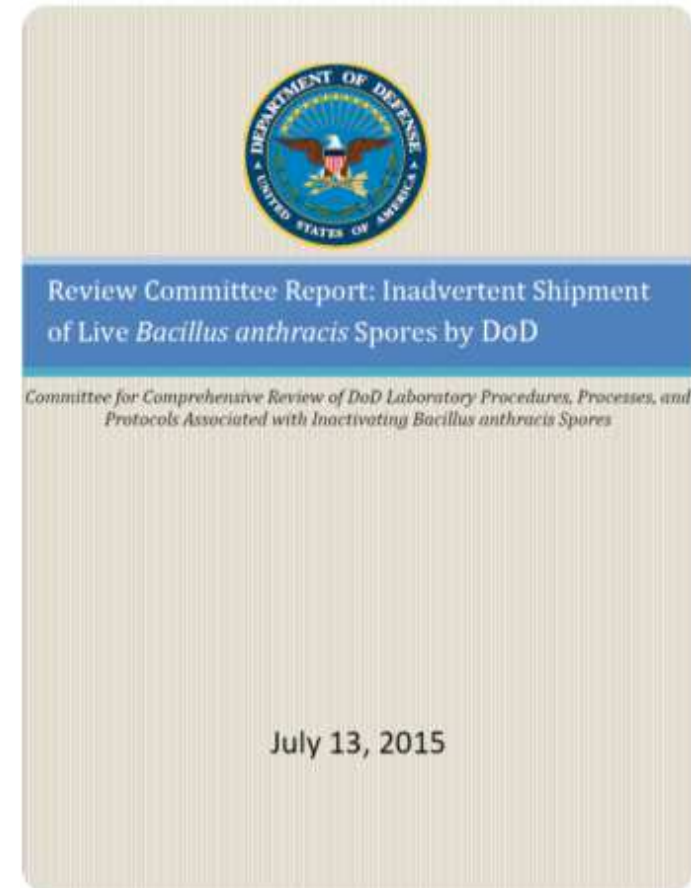
Spätere Teste: 50.000 Sporen
→ 24 h Ameisensäure (AS)
→ AS/Acetonitril → 8 d Bebrütung
→ **4 CFU**

Probleme am *Dugway Proofing Grounds* - Review Committee Report



Über ein Jahrzehnt haben 86
Einrichtungen in USA und 7
anderen Ländern mit
Milzbrandsporen kontaminierte
Proben erhalten!

→ Verursacht durch
unsachgemäße Gamma-Strahlen-
Inaktivierung



Probleme am *Dugway Proofing Grounds* - Review Committee Report

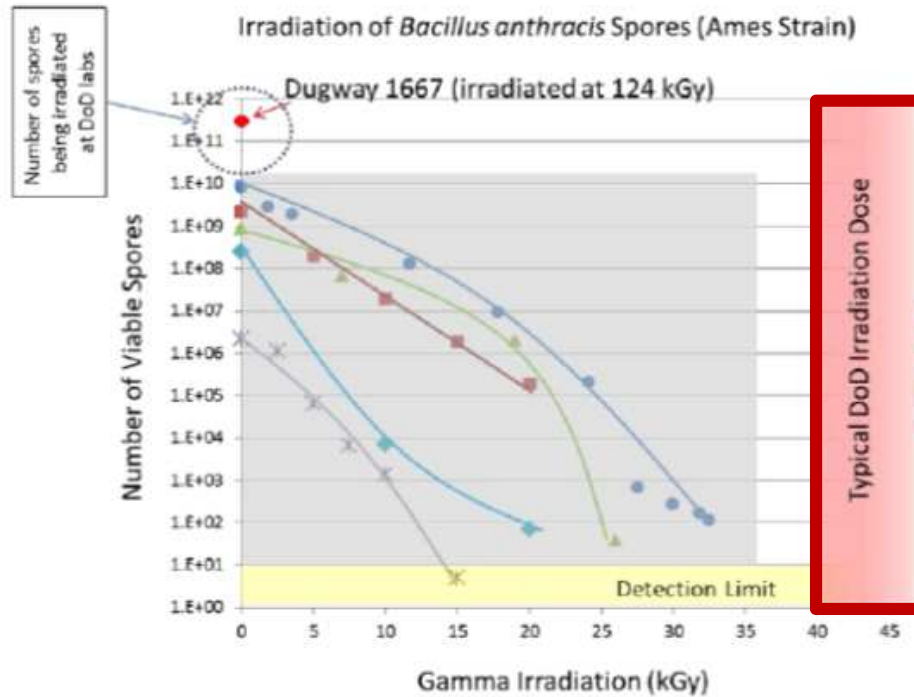
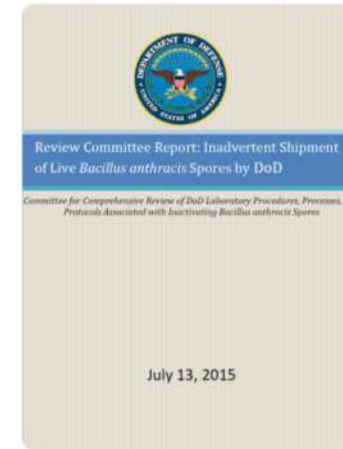


Figure 2: Consolidated kill curve data from multiple sources.



Problematische Parameter:

1. Außerhalb validierter Daten
2. Höhere Sporenanzahl
3. Nur 10% der Probe für Sterilitätstest
4. Nicht Linearität

Allgemeine DoD-Probleme mit Sporen

- Review Committee Report



Vergleich der Inaktivierungs-Verfahren durch Gamma-Strahlen

Laboratory	Dose (kGy)	Dose Determination	Starting Titer (cfu/ml)
ECBC	54 ^(a)	Calculated using time/decay rate of isotope and calibration data from instrument install	Max: 10 ⁸ cfu/ml
USAMRIID	40 ^(b)	Not performed ^(b)	10 ⁸ - 10 ^{10(b)}
NMRC	Min: 32.5 Typical: 40 - 50 ^(b)	Not stated in protocol	5.9x10 ⁷ - 6.9x10 ⁹ with majority 5x10 ⁸ - 5x10 ⁹ ^(b)
Dugway	38-42	Alanine dosimeter test strips	10 ⁸ - 10 ¹¹

- (a) Specified in 6/8/15 meeting at ECBC
- (b) Specified in 6/9/15 meeting at USAMRIID
- (c) Specified in 6/17/15 meeting at DPG
- (d) Information provided after site visit

Vergleich der Inaktivierungs-Verfahren durch Gamma-Strahlen

Laboratory	Sterility Testing								
	Sampling	Culture Media		Incubation					
		Sterility Sampling %	Broth	Solid Media	Broth to Plate?	Direct Plating	Incubation Temp (°C)	Incubation Time (hrs)	Positive control?
ECBC	10%	None ^(a)	Tryptic Soy Agar ^(a)	No	100 ul/plate	25-37 "appropriate growth temp"	72 ^(b)	No	No
USAMRIID	10-50% ^(b)	None identified	Blood Agar ^(b)	None identified	None identified	37	48	No	Yes ^(b)
NMRC	Small vol: 1-10 µL Large vol: 1-5%	Brain Heart Infusion Broth +10% serum	Blood Agar, Brain Heart Infusion Agar, Nutrient Agar, Mueller-Hinton agar	1 µl and 200µl are plated	Broth: >=72 Plates: 72	35-37	72	Yes	Yes
Dugway	5%	25 ml 2X nutrient broth	Tryptic Soy Agar	200 µl/10 plates	No	34	96 - 336 ^(c)	Yes	Yes

- (a) Specified in 6/8/15 meeting at ECBC
- (b) Specified in 6/9/15 meeting at USAMRIID
- (c) Specified in 6/17/15 meeting at DPG

Erkennung von systemischen Problemen:

Fehlen spezifischer, validierter Standards zur Entwicklung von Prozessen, Protokollen und Qualitätssicherungsmaßnahmen





gregorgrass@bundeswehr.org

www.instmikrobiobw.de