



KÜng Biotech & Umwelt

Konsumstrasse 20, CH-3007 Bern
Tel. 031 357 53 73
valentin.kueng@kueng-biotech.ch
www.kueng-biotech.ch

Chemische Inaktivierung von Organismen in Flüssigkeiten

**Wegleitung zur chemischen Inaktivierung von Organismen in Flüssigkulturen oder
Überständen mit dem Nachweis der Wirksamkeit und der sicheren Entsorgung**

**für das BAG,
Bundesamt für Gesundheit**

20. September 2016

Impressum

Autoren:

Valentin Küng, Küng Biotech & Umwelt

Claudia Bagutti, Kantonales Laboratorium Basel-Stadt

Begleitgruppe:

Die Begleitgruppe hat sich in drei Sitzungen getroffen und setzte sich aus den folgenden Mitgliedern zusammen:

Thomas Binz, Bundesamt für Gesundheit BAG

Graziella Mazza, Bundesamt für Umwelt BAFU

Claudia Bagutti, Kantonales Laboratorium Basel-Stadt

Monika Engels, ehemals Virologisches Institut, Vetsuisse-Fakultät ZH; Mitglied der EFBS

Stephen Leib, Labor Spiez LS (bis Sommer 2015)

Christina Stadler, Amt für Abfall, Wasser, Energie und Luft des Kanton Zürich

Kathrin Summermatter, Institut für Virologie und Immunologie IVI.

Ihnen allen sei herzlich gedankt für ihr Engagement und den fachlichen Input mit besonderem Dank an Christina Stadler für ihre wertvolle Unterstützung bei der Schlussredaktion und Claudia Bagutti für das zur Verfügung stellen der Abbildung 2 bis 10 durch das Kantonale Laboratorium Basel-Stadt.

Weiteren Dank für ihre hilfreichen Rückmeldungen gebühren:

Susanne Biebinger, Kantonales Laboratorium Basel-Stadt

Danny Kumin, Institut für Virologie und Immunologie IVI

Fabienne Wichmann, Kantonales Laboratorium Basel-Stadt

Pascal Bittel, Kantonales Laboratorium Basel-Stadt

Nadia Schürch, Labor Spiez LS.

Das Projekt wurde vom Bundesamt für Gesundheit BAG initiiert, finanziert und begleitet.

1	Einleitung	4
1.1	Ausgangssituation	4
1.2	Rechtliche Grundlagen und Vollzugspraxis	4
1.3	Zielsetzung und Aufbau der Wegleitung	6
2	Checkliste für Betriebe und Behörden	8
3	Begriffe und unterschiedliche Inaktivierungsziele	9
3.1	Inaktivierung	9
3.2	Desinfektion	9
3.3	Dekontamination	10
3.4	Sterilisation	10
3.5	Validierung und Nachweis der Wirksamkeit	11
4	Kriterien für die Wahl des Mittels für die chemische Inaktivierung	12
4.1	Wirkungsspektrum	12
4.2	Anwendungsbereich	13
4.3	Anwendungsbedingungen	14
5	Methode und Worst-case Bedingungen	15
5.1	Indikatororganismen	15
5.2	Einflussfaktoren	17
5.3	Inaktivierung bei maximaler Belastung (Worst-case)	21
5.4	Inaktivierung bei variierenden Parametern	23
5.5	Neutralisation des Desinfektionsmittels beim Nachweisverfahren	24
5.6	Bestimmung der Organismenzahl	25
5.7	Optimierung und Effizienz	26
6	Nachweis der Wirksamkeit	27
6.1	Was heisst Nachweis der Wirksamkeit?	27
6.2	Reduktionsrate als Massstab für die Wirksamkeit und die sichere chemische Inaktivierung	28
6.3	Prüfung der Wirksamkeit	30
6.4	Bestimmen der Einwirkzeit für die sichere Inaktivierung	34
7	Risikobewertung	37
7.1	Parameter und mögliche Kriterien	37
7.2	Risikobewertung und Erläuterungen zum Ablaufschema	37
7.3	Kriterien für eine sichere Entsorgung biologischer Agenzien	39
7.4	Unschädliche Entsorgung als Abwasser	40
8	Anwendungssicherheit	41
9	Schlussfolgerungen	42
10	Definitionen, Normen und ergänzende Dokumente	44
10.1	Definitionen	44
10.2	Ausgewählte Normen im Bereich Desinfektion	45
10.3	Referenzen	46
Anhang	Guidelines for the validation and application of alternative inactivation methods to heat inactivation using an autoclave	47

1 Einleitung

1.1 Ausgangssituation

In Betrieben und Laboratorien, welche der Einschliessungsverordnung ESV¹ unterstehen, werden Organismen in Flüssigkeiten oft chemisch inaktiviert. Die inaktivierten Flüssigkeiten lassen sich dann via Abwasser entsorgen. Dabei ist jedoch in den wenigsten Fällen klar, ob diese flüssigen Abfälle ganz frei von Organismen sind. In der Regel werden in einem Labor über Jahre dieselben Inaktivierungsbedingungen angewendet. Fragen nach der Wirksamkeit oder nach dem Inaktivierungsgrad der angewendeten Methoden können aber oft nicht fundiert beantwortet werden und es ist unklar, ob die Anforderungen der Einschliessungsverordnung immer erfüllt sind.

1.2 Rechtliche Grundlagen und Vollzugspraxis

Grundsätzlich fordert die ESV als Bedingung, dass Organismen bei Tätigkeiten der Klasse 1 unschädlich entsorgt und bei Tätigkeit der Klassen 2-4 inaktiviert werden müssen (Anhang 4, (Art. 12), Ziff. 2, Sicherheitsmassnahmen 23 und 33). Damit wird dem in der ESV festgeschriebenen Zweck, Mensch, Tiere, Pflanzen und Umwelt vor Gefährdungen und Beeinträchtigungen durch infektiöse Abfälle zu schützen, entsprochen.

Unter Flüssigkeiten mit Organismen werden im Rahmen der ESV primär flüssige Abfälle, welche mit Organismen kontaminiert sind, verstanden. Dies sind z.B. Flüssigkulturen und gebrauchte Kulturmedien bzw. (Zell-)Kulturüberstände.²

Diese Wegleitung ist eine Orientierungshilfe für den Vollzug der ESV. Deshalb ist der Fokus auf mit Organismen kontaminierte Flüssigkeiten, wie sie diese Wegleitung behandelt, sehr begrenzt. Die grundsätzlichen Überlegungen und Ablaufschemen können aber für jede Art von kontaminierten Flüssigkeiten adaptiert werden.

Im Kommentar zur ESV³ vom 1. Juni 2012 wird in der Mitte von Seite 37 festgehalten:

Neu kann deshalb der Autoklav in begründeten Fällen weggelassen werden, z. B. dann, wenn sich eine Inaktivierung in gleichwertigem Ausmass chemisch durchführen lässt.

¹ Verordnung über den Umgang mit Organismen in geschlossenen Systemen (Einschliessungsverordnung ESV, Mai 2012; SR 814.912)

² Siehe ESV, Anhang 4, (Art. 12), Ziff. 2, Sicherheitsmassnahme Nr. 33: *Inaktivierung der Mikroorganismen in kontaminiertem Material, Abfall und an kontaminierten Geräten, von Tieren und Pflanzen sowie Prozessflüssigkeit bei Produktionstätigkeiten «P»*

³ Einschliessungsverordnung (ESV) vom 1. Juni 2012 – Kommentar (267/2006-01825/06/50/03/F165-0482)
http://www.bafu.admin.ch/biotechnologie/01744/01749/index.html?lang=de&download=NHZLpZeg7t,lnp6i0NTU042i2Z6in1acy4Zn4Z2qZpnO2Yuq2Z6gpJCHdYF7fWym162epYbg2c_JjKbNoKSn6A--

Die Einschliessungsverordnung ESV erlaubt neben der thermischen Inaktivierung durch Dampf (Autoklavieren) auch die Inaktivierung von Organismen in Flüssigkeiten mit antimikrobiell wirkenden Chemikalien. Das Ersetzen des Autoklaven ist in solchen Fällen immer bewilligungspflichtig.

Die Erläuterungen auf der Seite 40 im zweiten Abschnitt führen – bezogen auf die Sicherheitsmassnahme Nr. 23 – weiter aus:

Der Autoklav kann bei den Sicherheitsstufen 1 bis 3 weggelassen werden, wenn durch andere Inaktivierungsmethoden mit einer validierten und vergleichbaren Wirkung Kulturen und Anreicherungen von Mikroorganismen sowie allfällige kontaminierte Abfälle vor Ort inaktiviert (Stufe 2 und 3) bzw. unschädlich entsorgt (Stufe 1) werden können. Dazu ist bei meldepflichtigen Tätigkeiten eine Bewilligung des zuständigen Bundesamtes (Art. 17) einzuholen.

Auf Seite 41 wird – bezogen auf die Sicherheitsmassnahme Nr. 33 – festgehalten:

Als Methode der Wahl zur Inaktivierung von Abfällen hat eine fachgerechte Autoklavierung zu gelten. Generell sind alternative Inaktivierungsmethoden dann zulässig, wenn sie als gleichwertig erachtet werden können und validiert wurden.

Aufgrund dieser Kommentare zur ESV wird in der vorliegenden Wegleitung geklärt:

1. was eine *chemische Inaktivierung in gleichwertigem Ausmass zur Autoklavierung* ist
2. was eine „*validierte und vergleichbare Wirkung*“ ist
3. was „*inaktiviert*“ bedeutet.

Für die Entsorgung von chemisch inaktivierten Flüssigkeiten via Abwasser ist als Bedingung in einem Wirksamkeitsnachweis zu zeigen, dass mit chemischen Mitteln eine Inaktivierung erreicht wird, die mit dem Autoklavieren vergleichbar ist. Falls dies nicht der Fall und die chemische Inaktivierung nicht (nachweisbar) vollständig ist, muss die Reduktionsrate unter Worst-case Bedingungen⁴ bestimmt und in der Risikobewertung dargelegt werden, dass die sichere Entsorgung im Sinne der ESV gewährleistet ist.

Auch aus Gründen der Wirksamkeit und der Umweltverträglichkeit ist dem Autoklavieren grundsätzlich der Vorrang zu geben. Verglichen mit dem Aufwand für die Auswahl eines geeigneten Desinfektionsmittels inklusive Nachweis der Wirksamkeit der chemischen Inaktivierungsmethode ist das Autoklavieren in der Regel die einfachere Alternative.

⁴ Siehe Kapitel 5.3

1.3 Zielsetzung und Aufbau der Wegleitung

Die Wegleitung dient als Grundlage für jene Betriebe, die das Autoklavieren von kontaminierten flüssigen Abfällen weglassen und durch eine chemische Inaktivierung ersetzen wollen. Das Weglassen des Autoklaven ist bewilligungspflichtig. Chemisch inaktivierte Flüssigkeiten können via Abwasser entsorgt werden, wenn die Reduktionsrate der Inaktivierung bestimmte Bedingungen erfüllt (siehe dazu Kapitel 6). Die vorliegende Wegleitung erläutert den theoretischen Hintergrund und zeigt die erforderlichen experimentellen Schritte auf.

Gleichzeitig dient das Dokument den kantonalen Biosicherheitsfachstellen für ihre Vollzugstätigkeit als Orientierungshilfe für die Beurteilung und Bewertung der in der Praxis angewendeten Methoden. Ziel ist letztendlich die Wirksamkeit einer angewendeten chemischen Inaktivierungsmethode im Betrieb zu gewährleisten und den Bewilligungs- und Vollzugbehörden nachvollziehbar darlegen zu können. Diese Wegleitung ist in 10 Hauptkapitel gegliedert.

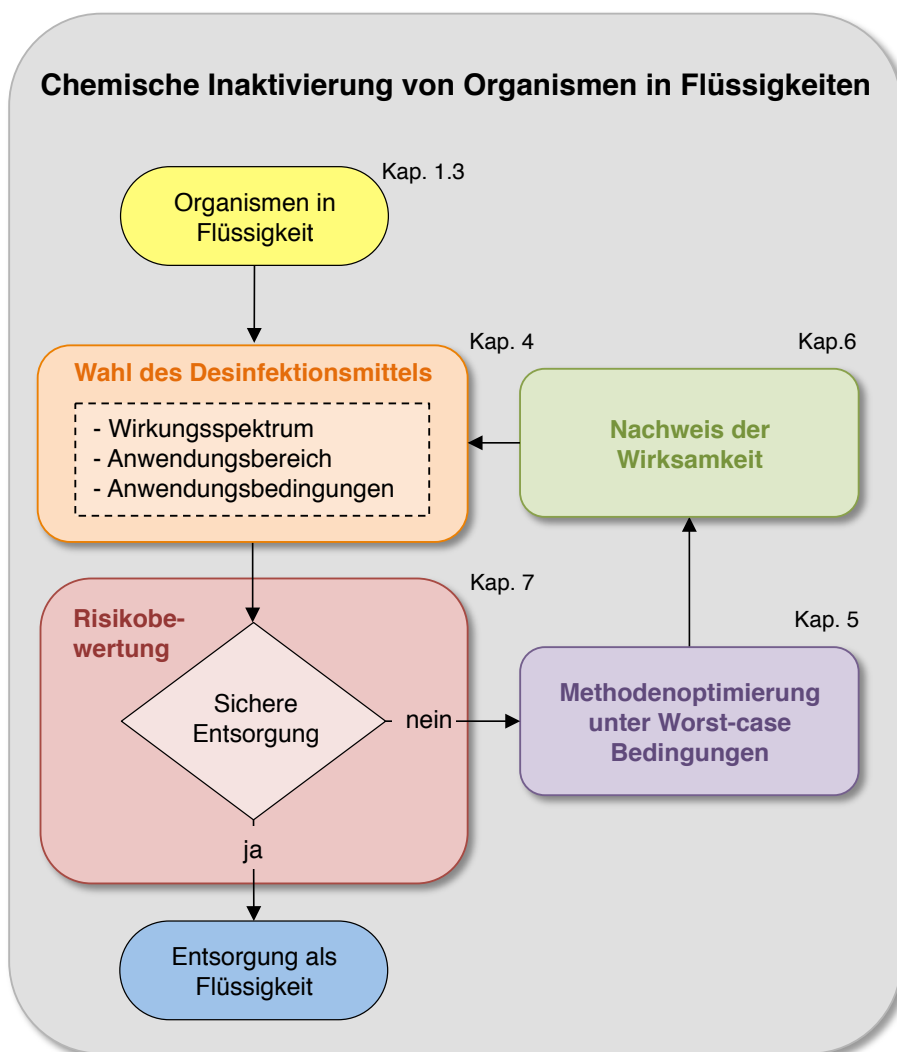


Abbildung 1: Chemische Inaktivierung von Organismen in Flüssigkeiten

In *Kapitel 2* sind die Aspekte aufgelistet, die von Betrieben wie auch von den Bewilligungs- und Vollzugsbehörden als Checkliste genutzt werden können, um ein chemisches Inaktivierungsverfahren für Organismen in Flüssigkeiten auf seine Wirksamkeit hin zu prüfen.

Kapitel 3 gibt einen Überblick über die verschiedenen Begriffe zur Inaktivierung und welche Ziele damit verbunden sind.

Kapitel 4 illustriert, welche Kriterien – bezogen auf den Organismus (Wirkungsspektrum), den Anwendungsbereich und die Anwendungsbedingungen (Umgebungsparameter) – für die optimale Wahl der Desinfektionsmittel für eine chemische Inaktivierung zu berücksichtigen sind.

Kapitel 5 zeigt auf, wie die Wirksamkeit der Inaktivierung von Organismen in Flüssigkeiten durch eine Reihe von Parametern beeinflusst wird und wie diese Parameter für das Austesten der Methode und den Wirksamkeitsnachweis variiert werden müssen.

Kapitel 6 beschreibt, wie der quantitative Nachweis der Wirksamkeit geführt werden kann.

In *Kapitel 7* wird ausgeführt, wie mit der Risikobewertung aufzuzeigen ist, dass Mensch, Tier und Umwelt – durch die möglicherweise verbleibende Menge und Konzentration der Organismen – vor Gefährdungen und Beeinträchtigungen geschützt sind.

Kapitel 8 zeigt auf, dass neben dem Ziel der Inaktivierung von Organismen auch weitere Aspekte der Anwendungssicherheit zu bedenken sind.

Kapitel 9 fasst die wichtigsten Punkte zusammen, und zieht u.a. einen Vergleich zwischen der chemischen Inaktivierung und dem Sterilisieren durch Autoklavieren. Zudem wird die Wichtigkeit des Wirksamkeitsnachweises bei chemischen Inaktivierungsmethoden begründet.

In *Kapitel 10* sind die wichtigen Begriffe definiert und eine Liste von ausgewählten Normen, Referenzen und Quellen für weiterführende Informationen zusammengestellt.

2 Checkliste für Betriebe und Behörden

Die Betriebe müssen intern und auch gegenüber den Bewilligungs- und Vollzugsbehörden nachvollziehbar begründen können, dass mit den angewendeten Inaktivierungsmethoden, der Austritt von Organismen in die Umwelt verhindert wird.

Als Checkliste sind dreizehn Aspekte oder zu messende Parameter aufgeführt, die einem Betrieb dazu dienen, eine Inaktivierungsmethode zu erarbeiten und damit entweder intern oder den Bewilligungs- und Vollzugsbehörden eine Beurteilung der Wirksamkeit der angewendeten chemischen Inaktivierungsmethoden zu ermöglichen:

1. Gibt es im Betrieb ein einheitliches standardmässig angewandtes Inaktivierungsverfahren?
2. Wird die Inaktivierung gemäss einem in der Fachliteratur publizierten Verfahren unter den identischen Bedingungen durchgeführt? Liegt die Publikation vor?
3. Ist das Inaktivierungsverfahren in einer betriebsinternen Standard Operating Procedure SOP festgehalten?
4. Kann begründet werden, warum das entsprechende Inaktivierungsverfahren gewählt worden ist? (*Kapitel 4*)
5. Ist die Zusammensetzung der Organismen in den zu inaktivierenden Flüssigkeiten bekannt?
6. Ist die maximale Organismenzahl in den zu inaktivierenden Flüssigkeiten (absolut und als Titer) bekannt? (*Kapitel 5.4 und 6.4*)
7. Sind die relevanten Einflussfaktoren, welche die Inaktivierung im konkreten Laborsetting inhibieren können, bekannt? (*Kapitel 5.2*)
8. Wurde das Inaktivierungsverfahren unter den Worst-case Bedingungen (maximale organische Belastung der Flüssigkeiten mit Organismen und Medienbestandteilen sowie Anwesenheit aller inhibierenden Einflussfaktoren) auf seine Wirksamkeit getestet? (*Kapitel 5.3*)
9. Wie lang ist die Einwirkzeit des Mittels zur chemischen Inaktivierung bis zum extrapolierten Nullwachstum der Organismen (Extrapolation ausgehend von Ausgangszahl und der Nachweisgrenze der Organismen)? (*Kapitel 5.4 und 6.3*)
10. Entspricht die angewendete Einwirkzeit der 4-fachen Dauer der Inaktivierungszeit bis zum extrapolierten Nullwachstum, falls eine mathematisch nicht beschreibbare oder unbekannt Inaktivierungskinetik vorliegt? (*Kapitel 6.2*)
11. Kann bei ungenauen Kenntnissen zur Overkill-Rate des Verfahrens in einer Risikobewertung dargelegt werden, dass keine Gefährdungen und Beeinträchtigungen für Mensch, Tier, Pflanzen und Umwelt von möglicherweise unvollständig inaktivierten Organismen ausgehen. (*Kapitel 6.2*)
12. Wird die Inaktivierungsmethode in regelmässigen Abständen auf ihre Wirksamkeit überprüft? (*Kapitel 6.3*)
13. Kann nachvollziehbar begründet werden, dass mit den angewendeten Inaktivierungsmethoden die behandelten Flüssigkeiten aus mikrobiologischer Sicht sicher in die Umwelt entsorgbar sind? (*Kapitel 6.2 und 7*)

3 Begriffe und unterschiedliche Inaktivierungsziele

Für die Inaktivierung von Organismen in Flüssigkeiten kann grundsätzlich zwischen der Möglichkeit des Autoklavierens und der chemischen Desinfektion gewählt werden. Je nach Ausgangssituation und Inaktivierungsziel ist entweder das Autoklavieren oder die chemische Inaktivierung die Methode der Wahl. Im Folgenden werden verschiedene Inaktivierungsbegriffe und Inaktivierungsziele definiert.

3.1 Inaktivierung

Gemäss der Definition von Norm EN 12740:1999 bedeutet Inaktivierung bezogen auf Mikroorganismen die *teilweise oder vollständige* Zerstörung einer gegebenen Aktivität bis hin zur Zerstörung des mikrobiologischen Systems.

Weil die Definition von Inaktivierung nicht die vollständige Elimination von Organismen und übertragbarem genetischen Material einschliesst, ist immer von *vollständiger* Inaktivierung die Rede, wo dies als Inaktivierungsziel erforderlich ist. Nur bei einer *vollständigen* Inaktivierung ist die Abwesenheit von infektiösem und übertragbarem genetischen Material (Organismen, Plasmide, RNA) garantiert.⁵

3.2 Desinfektion

Die Desinfektion wird als ein Verfahren zur Reduktion der Anzahl lebensfähiger Mikroorganismen definiert.

Bei kommerziellen Desinfektionsmitteln wird ein Mittel dann zugelassen, wenn innerhalb einer vorgegebenen und praktikablen Einwirkzeit und unter bestimmten Rahmenbedingungen eine Reduktion der Organismenzahl um log 4, also um 99,99% erreicht wird. Gemäss Leitlinie des Robert Koch Instituts gilt ein Desinfektionsmittel dann als wirksam, wenn es bei den vorgeschriebenen Bedingungen zu einer Reduktion der Organismenzahl von 4 bis 5 log-Stufen kommt.⁶ Das Bundesamt für Gesundheit BAG spezifiziert wie folgt: 5 log-Stufen für Bakterien und 4 log-Stufen für Pilze oder Viren.⁷ 4 log-Stufen bedeutet eine Titerreduktion um 99,99%, bzw. dass 0,01% der ursprünglich vorhandene Viren noch infektiös sein können.

⁵ In Situationen, wo es in erster Linie um die Zerstörung von DNA oder RNA geht, ist die chemische Inaktivierung (z.B. mit NaOH) – im Sinne der vollständigen Zerstörung – wahrscheinlich effektiver als das Autoklavieren.

⁶ Im Suspensionsversuch gelten diejenigen Konzentrationen eines Desinfektionsmittels als wirksam gegen Viren, die bei der jeweiligen Einwirkungszeit den Titer an infektiösen Viren um mindestens 4 Zehnerpotenzen herabsetzen (Reduktionsfaktor von ≥ 4 log). (Leitlinie der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten (DVV) und des Robert Koch-Instituts (RKI) zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren in der Humanmedizin; Fassung vom 1. August 2008; Seite 941; DOI 10.1007/s00103-008-0615-5)

⁷ <http://www.bag.admin.ch/anmeldestelle/13604/13869/13880/14043/>; BAG Startseite > Biozidprodukt > Desinfektionsmittel > Wirksamkeitsdossier: *Durchführung der Tests*

Diese Wirksamkeitsdefinition für Desinfektionsmittel genügt für die Inaktivierung von Organismen in Flüssigkeiten nach ESV nicht. Um den Anforderungen der ESV zu entsprechen, sind bei einer chemischen Inaktivierung je nach Ausgangstiter höhere Reduktionsziele notwendig, um eine Verringerung der Organismenzahl zu erhalten, welche für eine sichere Entsorgung von Flüssigkeiten erforderlich ist.

Wenn in mikro- und molekularbiologischen Laboratorien bei virushaltigen Flüssigkeiten die Titer je nach Experiment um Größenordnungen höher sind als bei bakterienhaltigen Flüssigkeiten, ist bei Inaktivierungsraten bzw. den geforderten log-Stufen zwischen Bakterien und Viren klar zu unterscheiden.

Das zeigt sich beispielsweise auch bei Anwendung der Wirksamkeitsdefinition für die Desinfektionsmittel für Noroviren. Die Infektionsdosis von Noroviren ist mit 10 bis 100 Viren sehr gering und die ausgeschiedene Menge infektiöser Viren ist (mit bis 10^{11} Viren/ Gramm Stuhl) sehr hoch. Zudem kann die Infektion auch über Kontakte mit kontaminierten Oberflächen erfolgen, weil die Tenazität dieser Viren, d.h. die Widerstandsfähigkeit gegenüber Umwelteinflüssen sehr hoch ist (Seite 179 in Schwebke und Rabenau, 2012⁸). Ein gegen Noroviren wirksames Desinfektionsmittel muss also unter vorgegebenen Standardbedingungen eine wesentlich höhere Inaktivierungsrate als 4 log-Stufen⁹ aufweisen, um in der Praxis den Vorgaben an eine Hygienesinfektion entsprechen zu können.

3.3 Dekontamination

Gemäss der Definition von Norm EN 12740:1999 steht der Begriff der Dekontamination für die Beseitigung mikrobieller Kontaminationen oder deren Reduzierung auf ein *akzeptables* Niveau. In der Norm ist das „akzeptable“ Niveau nicht weiter ausgeführt.

3.4 Sterilisation

Sterilisation bedeutet theoretisch die Abtötung aller Mikroorganismen. In der Praxis bedeutet dies, dass eine vollständige Sterilisation zwar annäherungsweise, aber nicht mit 100%iger Sicherheit gelingt (siehe Definition der Begriffe, Kap. 10.1).

Autoklavieren bei Standardbedingungen¹⁰ erfüllt die Anforderung an eine Sterilisation und gilt für die Entsorgung von festen und flüssigen Abfällen als Referenz für die *vollständige* Inaktivierung und damit die sichere Entsorgung (siehe Kapitel 6.2).

⁸ Ingeborg Schwebke; Holger F. Rabenau (2012) Aktueller Stand zur Viruzidieprüfung – ein Überblick Hygiene & Medizin 37 (7/8) <http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:0257-10026059> oder http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Krankenhaushygiene/Desinfektionsmittel/Virusinaktivierung/Viruzidiepruefung.pdf?__blob=publicationFile

⁹ Siehe Fussnote 7

¹⁰ Siehe Kapitel 10.1

3.5 Validierung und Nachweis der Wirksamkeit

Validierung ist gemäss der EN-Norm 12740:1999-10¹¹ ein dokumentiertes Verfahren zur Aufzeichnung und Auswertung der Ergebnisse, die für den Nachweis gebraucht werden, dass ein Verfahren kontinuierlich ein Produkt ergibt, das mit den vorgegebenen Eigenschaften übereinstimmt.

Der Unterschied zwischen Validierung und Wirksamkeitsnachweis ist nicht eindeutig sondern graduell: die Validierung muss aufzeigen, *dass ein Verfahren kontinuierlich ein Produkt ergibt*. Um dem Begriff „kontinuierlich“ gerecht zu werden, muss der Nachweis der Wirksamkeit mehrfach bzw. statistisch erhärtet erbracht werden. Ob der Nachweis der Wirksamkeit bei einer Validierung drei- oder gar fünfmal erbracht werden muss, bleibt Ermessensfrage.

Wichtig ist, dass der Nachweis der Wirksamkeit den Grundsätzen für ein naturwissenschaftliches Vorgehen genügt und aussagekräftig und nachvollziehbar ist. Für den Nachweis der Wirksamkeit sollte eine Methode mindestens dreimal ausgetestet worden sein.

¹¹ Norm EN 12740:1999: Diese Norm gibt Anleitungen zu Verfahren der Behandlung, Inaktivierung und Prüfung von Abfällen, die Organismen enthalten, welche bei Tätigkeiten und Prozessen in biotechnischen Laboratorien entstehen. Sie behandelt Verfahren zur Reduzierung der Risiken, die bei der Exposition gegenüber Abfallstoffen aus Tätigkeiten im Labormaßstab entstehen, die Organismen enthalten, welche eine Gefährdung oder potentielle Gefährdung für Menschen, Tiere, Pflanzen oder die Umwelt darstellen können. Zu derartigen Abfällen können sowohl mit Organismen belastete feste, flüssige oder gasförmige Nebenprodukte oder Abwässer gehören, als auch Gegenstände oder Ausrüstungen, die entsorgt werden müssen und die mit Organismen kontaminiert sein können. Abfälle können in biotechnischen, klinischen, molekularbiologischen, mikrobiologischen und anderen Laboratorien bei Tätigkeiten entstehen, bei denen Organismen gehandhabt, gentechnisch veränderte Organismen erzeugt oder verwendet werden, wie auch bei Laborarbeiten, bei denen menschliches, tierisches oder pflanzliches Material verwendet wird. Sonstige Abfälle und Abfälle aus der gesundheitlichen Betreuung von Menschen oder sonstiger medizinischer Tätigkeit sind nicht Gegenstand dieser Norm.

4 Kriterien für die Wahl des Mittels für die chemische Inaktivierung

Als Anforderungen an die Wahl eines Mittels zur chemischen Inaktivierung von Organismen gilt grundsätzlich: Das Desinfektionsmittel soll eine möglichst hohe Wirksamkeit für die zu inaktivierenden Organismen haben.

Neben der Zuverlässigkeit ist auch die Irreversibilität der Wirkung (Effekt) von Bedeutung und je nach Anwendungszweck auch die Materialverträglichkeit, Hartwasserstabilität, Anwendungssicherheit, Dosierbarkeit und Wirtschaftlichkeit.

Als Voraussetzung für die optimale Anwendung sind bei der Wahl des Desinfektionsmittels zur chemischen Inaktivierung von Organismen drei Hauptaspekte zu beachten:

1. Wirkungsspektrum (mit hoher Spezifität für den/die in der zu inaktivierenden Flüssigkeit enthaltenen Organismus/en)
2. Anwendungsbereich (beispielsweise Anwendung in Flüssigkeiten) und
3. Anwendungsbedingungen (umfasst u.a. die Einwirkzeit und Konzentration des Inaktivierungsmittels und berücksichtigt die massgeblichen Einflussfaktoren).

4.1 Wirkungsspektrum

Das Wirkungsspektrum eines Desinfektionsmittels ist durch seine Wirkung auf bestimmte Organismengruppen definiert und wird an ausgewählten Bakterien und Viren von meist medizinischer Bedeutung getestet. Anhand dieser Krankheitserreger werden das Wirkungsspektrum sowie die optimale Wirkstoffkonzentration und Einwirkzeit unter definierten Bedingungen ermittelt.

Jedes Desinfektionsmittel wirkt in unterschiedlicher Stärke entweder bakterizid, fungizid, tuberkulozid (Mykobakterien), viruzid¹² oder sporozid. Es gibt kein Desinfektionsmittel, das alle Arten von Mikroorganismen mit der gleichen Effizienz abtötet, daher müssen bei Gemischen von Organismen (z.B. Bakterien und Viren) eventuell Produkte mit sich ergänzenden Wirkungsspektren verwendet werden. Dabei ist die gegenseitige Verträglichkeit der verschiedenen Mittel abzuklären.

In der „Liste der vom Robert Koch-Institut geprüften und anerkannten Desinfektionsmittel und -verfahren“¹³ werden beim Wirkungsspektrum vier Kategorien von unterschiedlich widerstandsfähigen Organismen unterschieden. Anhand der Angaben zum Spektrum der empfindlichen Organismen gilt es, dasjenige Desinfektionsmittel für die chemische Inaktivierung auszuwählen, welches die im Labor verwendeten Organismen am effizientesten inaktiviert (siehe Kapitel 5.7).

¹² Bei der Virusinaktivierung wird teilweise unterschieden zwischen der Wirksamkeit auf „nur behüllte Viren“ oder auf „behüllte und unbehüllte Viren“. Behüllte Viren sind tendenziell sensitiver gegenüber inaktivierenden Substanzen.

¹³ Online Bezugsquelle:
http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Krankenhaushygiene/Desinfektionsmittel/Desinfektionsmittelliste.pdf?__blob=publicationFile

4.2 Anwendungsbereich

Bei den meisten kommerziell erhältlichen Inaktivierungsmitteln wird nicht auf den Anwendungszweck „Inaktivierung von Organismen in Flüssigkeiten“ hingewiesen. In der folgenden Tabelle sind die für kommerziell erhältliche Produkte gebräuchlichen Anwendungen und deren Eignung für die Inaktivierung von Organismen in Flüssigkeiten aufgelistet¹⁴:

Tabelle 1: Anwendungsbereich und Eignung für die Inaktivierung von Organismen in Flüssigkeiten

Anwendungsbereich		Eignung für die Inaktivierung von Organismen in Flüssigkeiten
1.	Hände- und Körperdesinfektion	<i>nicht geeignet</i>
2.	Flächen- und Raumdesinfektion	
3.	Geräte- und Instrumentendesinfektion	<p><i>Möglicherweise geeignet, da diese Mittel für das Tauchbadverfahren und somit für längere Standzeiten ausgelegt sind. Sie behalten ihre Wirkung auch bei höheren Eiweisskonzentrationen.</i></p> <p><i>Es ist deshalb naheliegend, die entsprechenden Produkte auch im Laborbereich zur Inaktivierung von Organismen in Flüssigkeiten zu verwenden.</i></p>
4.	Wäschedesinfektion.	

Die konkreten Bedingungen für die Anwendung eines kommerziell erhältlichen Produktes werden im Labor in der Regel von den Herstellerangaben abweichen.

Es gilt:

Sobald die Anwendungsweise (Anwendungsbereich und -bedingungen) von der Benutzervorschrift für ein Mittel abweicht, ist der Anwender selber für den Wirksamkeitsnachweis verantwortlich.

Der Anwender muss – beispielsweise gegenüber den Vollzugsbehörden – die Wirksamkeit (Effektivität) eines Desinfektionsmittels darlegen können – entweder, indem er die Gebrauchsanweisung unter den beschriebenen Einflussfaktoren genau befolgt und dies belegen kann oder indem er die Wirksamkeit unter den konkret gegebenen Umständen methodisch korrekt nachgewiesen hat. Der Verweis auf eine publizierte und analoge Verwendungsweise eines Mittel zur Inaktivierung reicht ebenfalls.

Bei jeder nicht-standardgemässen Anwendung eines Desinfektionsmittels zur Inaktivierung von Organismen ist also die Wirksamkeit unter den konkret gegebenen Umständen nachzuweisen.

¹⁴ In allen vier Anwendungsbereichen gibt es zudem die sogenannten Desinfektionsreiniger. Darunter versteht man Desinfektionsmittel, die auch als Reinigungs- und gegebenenfalls als Pflegemittel fungieren.

4.3 Anwendungsbedingungen

Neben dem Wirkungsspektrum und dem Anwendungsbereich sind die Anwendungsbedingungen entscheidend für den erreichbaren Grad der Inaktivierung (siehe Kapitel 5.1). Die Anwendungsbedingungen umfassen Parameter wie Einwirkungsdauer, Konzentration des Inaktivierungsmittels und eventuell pH-Optimum. Daneben wird der Grad der Inaktivierung durch weitere – abhängig von der Art des Inaktivierungsmittels – Einflussfaktoren wie Temperatur, Stabilität (Einfluss der Standzeit), eventuell Feuchtigkeit und Oberflächenbeschaffenheit sowie die Anwesenheit von Proteinen, Schmutz und eventuell Tensiden sowie Katalysatoren in unterschiedlichem Masse bestimmt. Für die Wirksamkeit der Inaktivierung sind die verschiedenen Einflussfaktoren zu identifizieren und ihre Auswirkung auf die Effizienz der Inaktivierung zu bewerten. Die Einflussfaktoren und ihre Bedeutung für den erreichbaren Inaktivierungsgrad sind in Kapitel 5.2 weiter beschrieben.

5 Methode und Worst-case Bedingungen

Die Methodenoptimierung umfasst verschiedene Schritte wie in Abbildung 2 schematisch dargestellt und in den nachfolgenden Unterkapiteln weiter ausgeführt.

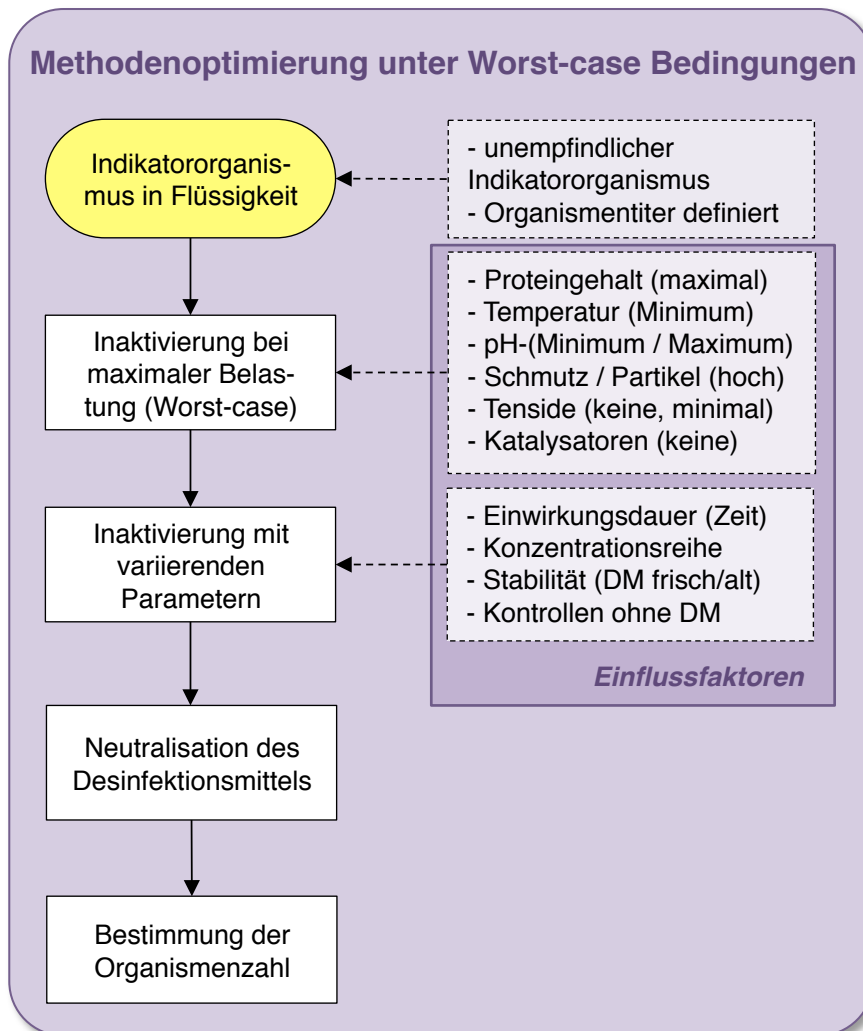


Abbildung 2: Methodenoptimierung unter Worst-case Bedingungen

5.1 Indikatororganismen

In der Regel beinhaltet die zu inaktivierende Flüssigkeit nicht nur eine (einzige) Organismenart, sondern es werden verschiedene Organismen verwendet oder es liegt ein Organismengemisch vor. In diesen Fällen muss ein Indikatororganismus festgelegt werden, für den die Inaktivierungsrate zu bestimmen ist. Ein Indikatororganismus muss die folgenden Anforderungen erfüllen:

1. Unempfindlichkeit (Resistenz) gegenüber der gewählten Methode und bezogen auf das vorhandene Organismenspektrum so hoch wie möglich.

2. Organismtyp, welcher der obersten Risikogruppierung mit der geringsten Infektionsdosis entspricht, bzw. einen solchen Organismus (stellvertretend) repräsentiert.
3. Der Organismtiter soll sich einfach bestimmen lassen.

Dabei lassen sich zwei Kategorien von Indikatororganismen unterscheiden:

- A) Der Indikatororganismus entspricht einem der kultivierten Organismen bzw. ist bereits im Organismengemisch vorhanden und steht als sogenannter Indikator-*Leitorganismus* stellvertretend für ein Gemisch von Organismen und erfüllt die oben genannten Bedingungen.
- B) Im zweiten Fall wird der Organismus – weil er einfach nachweisbar ist – von aussen als Indikator-*Testorganismus* (*spiking*) zugeführt.

Tabelle 2: Zwei Kategorien von Indikatororganismen

Indikator-Leitorganismen	Indikator-Testorganismen
Der Organismus ist in einem bestehenden Organismengemisch bereits vorhanden (oder ist der einzige Vertreter).	Der Organismus wird einem Organismengemisch extern zugegeben .
Dessen Elimination zeigt die Inaktivierung der anderen Organismen an. (Spezialfall: in der Flüssigkeit ist nur eine einzige Organismenart vorhanden.)	Der Indikator-Testorganismus soll – in zweiter Priorität – so wenig pathogen wie möglich sein.

Entspricht die Inaktivierung beim Indikatororganismus der erwünschten Reduktionsrate, ist davon auszugehen, dass auch bei den anderen Organismen das Reduktionsziel erreicht wurde.

Bei einem Organismengemisch gilt für den Indikator-Leitorganismus wie für den Indikator-Testorganismus:

Der Indikatororganismus muss gegenüber der gewählten Methode so unempfindlich (resistent) wie möglich sein. Er muss in der höchsten Konzentration (Titer) oder in der grössten Menge (Gesamtzahl) vorliegen und zugleich die oberste Risikogruppierung mit der geringsten Infektionsdosis repräsentieren.

Erlaubt die Inaktivierungsrate für diesen Indikatororganismus eine sichere Entsorgung, gelten die Inaktivierungsbedingungen stellvertretend für die anderen Organismen im Gemisch.

Aufgrund der unterschiedlichen Widerstandsfähigkeit bzw. Empfindlichkeit von Organismen gegenüber einer bestimmten Inaktivierungsmethode ist zwischen verschiedenen Kategorien von Organismen zu unterscheiden.

Dies sind:

- Sporenbildner
- Bakterien
- Mykobakterien
- Behüllte Viren
- Unbehüllte Viren
- Einzellige Parasiten
- Pilze
- Prionen¹⁵

Wenn in einem Organismengemisch beispielsweise keine Sporenbildner vorkommen, muss die Wirksamkeit eines Mittels auch nicht gegen Sporenbildner getestet werden.

5.2 Einflussfaktoren

In Kapitel 4 wurden Wirkungsspektrum, Anwendungsbereich und Anwendungsbedingungen als Kriterien für die Wahl eines Desinfektionsmittels genannt, weil dies die wichtigsten Aspekte für die Wirksamkeit eines Desinfektionsmittels sind. Nicht nur die Wahl der Methode sondern auch deren Optimierung sind stark abhängig von den Einflussfaktoren (siehe Abbildung 2). Für den Nachweis der Wirksamkeit¹⁶ und die Optimierung der Methode sind die Kenntnisse über die Relevanz dieser Einflussfaktoren zentral.

Die Anwendungsbedingungen bei der chemischen Inaktivierung lassen sich differenzieren in:

1. Einwirkungsdauer bzw. Einwirkzeit¹⁷ (Bsp. in Abbildung 3)
2. Konzentration des Desinfektionsmittels DM¹⁸ (Bsp. in Abbildung 4)
3. Temperatur¹⁹ (Bsp. in Abbildung 5)
4. Proteine²⁰ (Bsp. in Abbildung 6)

¹⁵ Prionen sind hier der Vollständigkeit halber erwähnt. Die Inaktivierung von Prionen in Flüssigkeiten ist ein Spezialfall, auf den hier nicht eingegangen werden soll. Alternativ gilt das Absorbieren von prionenhaltigen Flüssigkeiten in saugfähigem Material und das Verbrennen als Sonderabfall als ein sicherer Entsorgungsweg.

¹⁶ In der Wegleitung wird unterschieden zwischen Wirkungsspektrum, Wirksamkeit, Wirkung und Effizienz. Siehe dazu Kapitel 6.2

¹⁷ Die Einwirkungsdauer ist durch das Eindringen des Desinfektionsmittels in den Mikroorganismus, die Wechselwirkung mit dem Mikroorganismus und die Verdampfungszeit des Lösemittels bestimmt.

¹⁸ Die häufige Annahme, dass eine hohe Konzentration eine bessere Wirkung erziele, ist nur bedingt richtig. Wasser spielt bei der Desinfektion häufig eine entscheidende Rolle. Beispielsweise versagt absoluter Alkohol bei der Händedesinfektion; 60 bis 80-%iger Alkohol hat dagegen gute desinfizierende Wirkung. Es ist darauf zu achten, dass Verdünnungen nur mit destilliertem Wasser hergestellt werden.

¹⁹ Generell erhöht sich die desinfizierende Wirkung mit steigender Temperatur analog chemischer Reaktionen.

5. pH-Optimum²¹
6. Alter des Inaktivierungsmittels, d.h. Standzeit seit dem Zeitpunkt des Ansatzes (Bsp. in Abbildung 7)
7. positive wie negative Wirkung durch Tenside²²
8. Schmutz²³
9. Stabilität (Haltbarkeit des Desinfektionsmittels)²⁴
10. Katalysatoren

Jeder dieser Parameter kann die Wirksamkeit und Effizienz einer chemischen Inaktivierung beeinflussen. Für die Optimierung einer Inaktivierung ist aufzuzeigen, dass die entsprechenden Parameter entweder optimiert worden sind oder aber keinen Einfluss haben, weil sie irrelevant oder konstant sind bzw. nicht variieren. Gegebenenfalls müssen daraus Ausschlusskriterien für die Durchführung abgeleitet werden, beispielsweise „Inaktivierung darf nicht ausserhalb des Temperaturbereichs von 22°C bis 30°C“ oder „Inaktivierung darf nicht ausserhalb des pH-Bereiches von 5 bis 7“ durchgeführt werden, weil ausserhalb dieser Bereiche die Inaktivierung nicht mehr gewährleistet ist.

Die Publikation *Guidelines for the validation and application of alternative inactivation methods to heat inactivation using an autoclave*²⁵ beschreibt Inaktivierungskurven und kritische Punkte anhand von drei exemplarischen Inaktivierungsmethoden: Natriumhydroxid NaOH, aktives Chlor²⁶ und Ultraviolett-Strahlung. Einzelne Experimente aus diesen Methodenentwicklungen werden in diesem und dem folgenden Kapitel zur Veranschaulichung gezeigt. Diese Publikation bietet auch eine Übersicht zu weiteren Inaktivierungsmethoden, deren Funktionsprinzip und deren Vor- und Nachteile.

²⁰ Proteine (Serum, Casein) reduzieren häufig die Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln. In diesen Fällen muss die Konzentration erhöht oder ein anderer Wirkstoff ausgewählt werden.

²¹ Viele Mittel zur chemischen Inaktivierung wirken nur bei einem bestimmten pH-Wert optimal. Herstellerangaben beachten!

²² Reste von Reinigungsmitteln und anderen Stoffen können das Desinfektionsmittel inaktiv machen. Zum Beispiel werden kationisch/quaternäre Desinfektionsmittel durch anionische Reinigungsmittel inaktiviert. Verschiedene Desinfektionsmittel können auch antagonistische Wirkung haben, wenn sie gemischt werden.
Tenside als oberflächenaktive Stoffe können die Wirkung (Effizienz) einer desinfizierenden Substanz auch erhöhen, da diese Stoffe es erst ermöglichen, dass das Desinfektionsmittel zu den Organismen gelangt.

²³ Schmutz- oder Fetthüllen können die Abtötung von Mikroorganismen erschweren oder verhindern, und machen sie in angetrocknetem Zustand oft unmöglich.

²⁴ Eigene Desinfektionsverdünnungen mit destilliertem (de-ionisiertem) Wasser sind täglich/wöchentlich neu herzustellen.

²⁵ Guidelines for the validation and application of alternative inactivation methods to heat inactivation using an autoclave; 2016; Kantonales Laboratorium Basel-Stadt; Auftraggeber: Bundesamt für Gesundheit BAG

²⁶ z.B. Javelle-Wasser

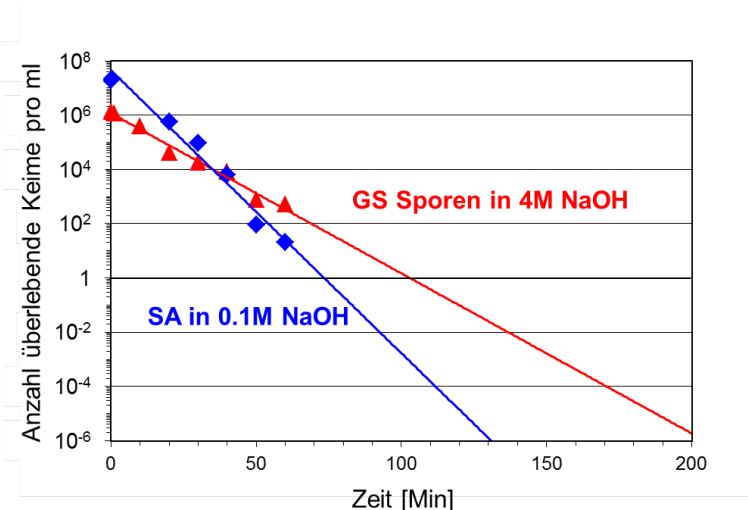


Abbildung 3: Einwirkdauer²⁷

Inaktivierung von *S. aureus* (SA, blau) mit 0.1M NaOH und *G. stearothermophilus* (GS, rot) mit 4N NaOH über einen Zeitraum von 360 Min. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde eine Probe entnommen und auf replikationsfähige Bakterien (SA) bzw. keimfähige Sporen (GS) untersucht. Bei der hier verwendeten logarithmischen Darstellung der Anzahl Organismen über die Zeit verlaufen in diesem Beispiel beide Sterbekurven linear und können auf einen SAL-Wert (hier 10⁻⁶) extrapoliert werden.

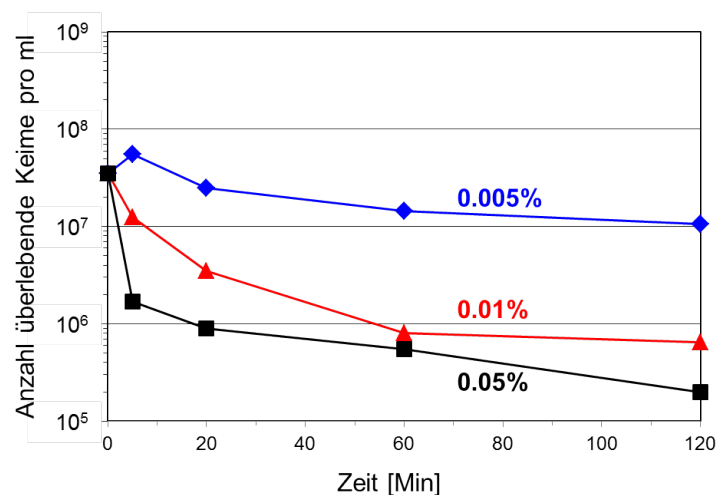


Abbildung 4: Konzentration des DM

Inaktivierung von MS2 Bakteriophagen mit verschiedenen Konzentrationen von HazTabs (Produkt auf Basis aktiver Chlorverbindung; 0.005%, 0.01%, 0.05%). Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und auf Plaque-bildende Einheiten untersucht. In diesem Beispiel konnten über die gesamte Zeitdauer aktive MS2 Bakteriophagen nachgewiesen werden. Die

²⁷ Siehe Fussnote 25. Gilt ebenso für die Abbildungen 4 bis 10.

Sterbekurve verläuft nicht-linear sondern flacht ab, sodass keine sichere Inaktivierung gewährleistet werden kann.²⁸

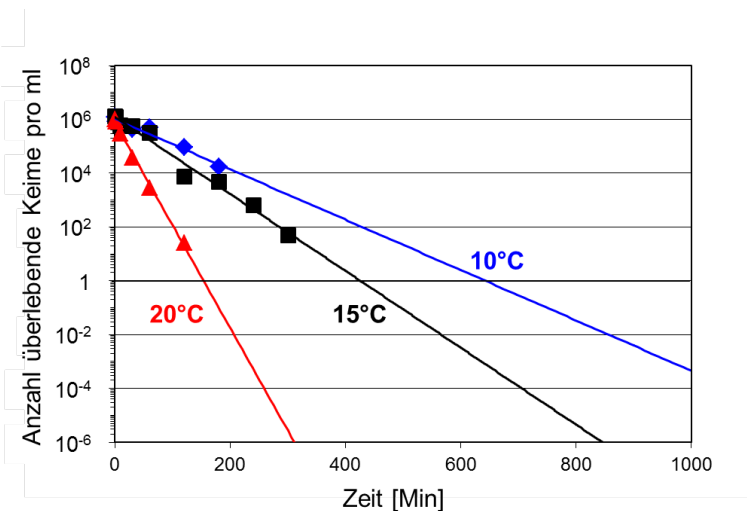


Abbildung 5: Temperatur

Inaktivierung von *G. stearothermophilus* mit 2M NaOH bei unterschiedlichen Temperaturen (10°C, 15°C, 20°C). Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde eine Probe entnommen und auf keimfähige Sporen (GS) untersucht. Bei einer Reduktion der Inkubationstemperatur von 20°C auf 15°C ist in diesem Beispiel eine ungefähr dreifache Einwirkdauer notwendig, um einen SAL-Wert von 10⁻⁶ zu erreichen.

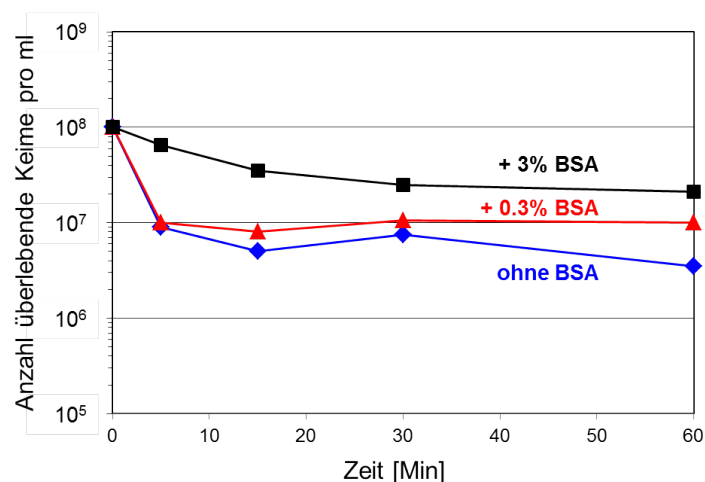


Abbildung 6: Proteine, entspricht der organischen Belastung

Inaktivierung von MS2 Bakteriophagen mit 0.01% HazTabs (Produkt auf Basis aktiver Chlorverbindung) in Abwesenheit (blau) und Anwesenheit von organischer Belastung unterschiedlicher

²⁸ In der Praxis müsste eine höher konzentrierte Lösung zur Anwendung kommen, um eine ausreichende Inaktivierungseffektivität zu erhalten. Die Konzentration im Beispiel wurde gewählt, um die Effekte sichtbar zu machen.

Konzentration (0.3% (rot) und 3% (schwarz) BSA, Rinderserumalbumin). Die Proteinkonzentration von flüssigem Zellkulturabfall liegt normalerweise im Rahmen von 0.3%. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und auf Plaque-bildende Einheiten untersucht. Die Anwesenheit von BSA im Inaktivierungsverfahren erniedrigt die abgetötete Menge an MS2 Phagen im Beispiel um ungefähr das fünf- bis zehnfache²⁹.

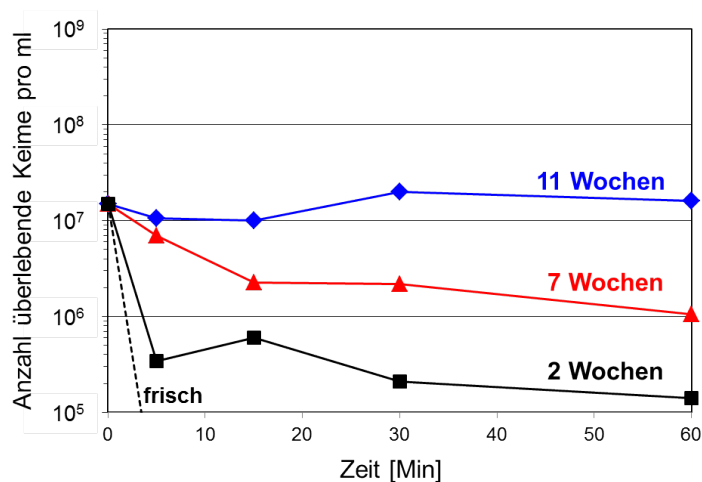


Abbildung 7: Alter des Inaktivierungsmittels, entspricht der Standzeit

Inaktivierung von MS2 Bakteriophagen mit 0.1% HazTabs (Produkt auf Basis aktiver Chlorverbindung), wobei unterschiedlich frische/alte Lösungen verwendet wurden: eine am Tag des Experimentes frisch angesetzte (gestrichelte Linie), eine 2 (schwarze), 7 (rote) und 11 (blaue durchgezogene Linie) Wochen alte. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und auf Plaque-bildende Einheiten untersucht. Bei der frisch angesetzten Lösung können schon nach 5 Min. keine Bakteriophagen nachgewiesen werden, während mit zunehmendem Alter die Effektivität abnimmt und nach 11 Wochen gar nicht mehr vorhanden ist.³⁰

5.3 Inaktivierung bei maximaler Belastung (Worst-case)

Optimierung der Methode bedeutet (auch), dass bei einer maximalen Organismenlast und bei chemisch-physikalisch widrigsten Umständen (Worst-case) die vorgegebene Reduktion der Organismenzahl garantiert und deren sichere Entsorgung in die Umwelt gewährleistet ist.

Die maximale Belastung (Worst-case) setzt sich zusammen aus:

1. sämtlichen möglichen negativen Bedingungen wie höchst mögliche Organismenbelastung mit dem resistentesten Keim (anhand dessen sich die Wahl des Indikatororganismus richtet) und

²⁹ Siehe Fussnote 28.

³⁰ Siehe Fussnote 29.

- allen bei der gewählten Inaktivierungsmethode relevanten Einflussfaktoren in ihrem maximalen Ausmass (ausser sie sind mittels Ausschlusskriterien so begrenzt, dass ihr inhibierender Einfluss ausgeschlossen werden kann; Beispiele in den Abbildungen Abbildung 7 und Abbildung 8).

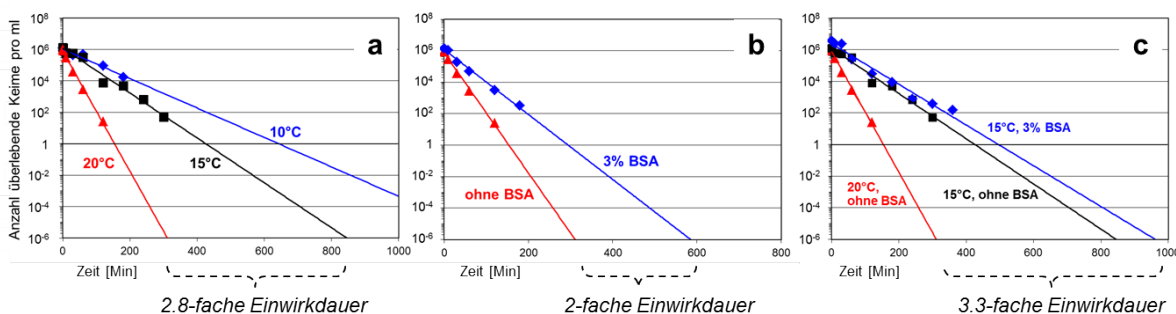


Abbildung 8: Worst-case 1

Inaktivierung von *G. stearothermophilus* mit 2M NaOH unter Worst-case Bedingungen (Figur c, blaue Gerade (15°C, 3% BSA). Die Kombination zweier Bedingungen, welche die für den SAL 10^{-6} benötigte Einwirkdauer verlängern: niedrigere Temperatur (Figur a, 15°C versus 20°C; schwarze versus rote Gerade; 2.8-fache Einwirkdauer) und Anwesenheit von 3% BSA (Figur b, rote versus blaue Gerade; 2-fache Einwirkdauer) ergibt in der Kombination (=Worst-case) eine 3.3-fache Einwirkdauer (Figur c, rote versus blaue Gerade).

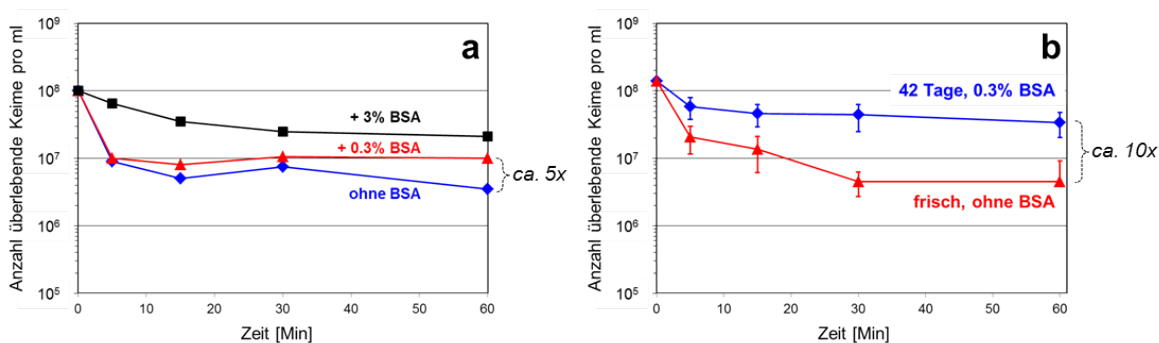


Abbildung 9: Worst-case 2

Inaktivierung von MS2 Bakteriophagen mit 0.01% HazTabs unter Worst-case Bedingungen (Figur b, blaue Kurve: 42 Tage alte Lösung, 0.3% BSA). Die Kombination zweier Bedingungen, welche die Abtötungseffektivität vermindern: Anwesenheit von BSA (Figur a, kein versus 0.3% BSA, ca. Faktor 5 verminderte Effektivität) und Alter der HazTab Lösung (nicht dargestellt, vgl. Abbildung 7) ergibt in der Kombination (=Worst-case) eine um ca. Faktor 10 verminderte Abtötungseffektivität.³¹

³¹ Siehe Fussnote 29.

Die in Tabelle 3 aufgelisteten Einflussfaktoren haben in der Tendenz entweder eine positive oder negative Auswirkung auf die Effizienz der Inaktivierung.

Tabelle 3: Zustand von Einflussfaktoren, in dem sie einen negativen Einfluss auf die Effizienz der Inaktivierung haben

Einflussfaktor	Bedingung im Worst-case
Proteingehalt	hoch
Temperatur	niedrig
pH	<i>case-by-case</i>
Schmutz / Partikel	viel
Tenside	<i>case-by-case</i>
Katalysatoren	keine
Einwirkungsdauer	kurz
Konzentration	niedrig

5.4 Inaktivierung bei variierenden Parametern

Zur Bestimmung einer Inaktivierungskinetik können die folgenden Parameter gegeneinander getestet werden:

1. Einwirkungsdauer bzw. Einwirkzeit
2. Konzentration des Desinfektionsmittels
3. Organismenzahl (Titer)
4. Temperatur
5. Belastung mit Inhibitoren (z.B. Proteinen)
6. Stabilität des Desinfektionsmittels (frisch/alt)

Im experimentellen Ansatz wird jeweils nur einer der Parameter variiert; die anderen bleiben konstant. In den meisten Fällen wird die Einwirkungsdauer oder die Konzentration des Mittels zur chemischen Inaktivierung variiert.

Die Temperatur wird in der Regel bei Raumtemperatur RT liegen. Zu bedenken ist, dass die Effizienz der Inaktivierung mit einer erhöhten Temperatur wesentlich erhöht werden kann (Chemo-thermische Desinfektion z.B. mit NaOH).

Bei der Organismenzahl ist eine Konzentration zu wählen, die im maximalen Bereich der laborüblichen Situation liegt. Dasselbe gilt für die Konzentration von Inhibitoren, die eine hohe Belastung (worst-case) repräsentieren sollen.

Die Stabilität des Desinfektionsmittels ist dann als Parameter von Bedeutung, wenn das Mittel innerhalb der Verwendungs- bzw. Standzeit im Labor chemisch zerfällt und inaktiv werden kann. Anhand einer Versuchsreihe mit unterschiedlich frisch zubereitetem Desinfektionsmittel kann nachgewiesen werden, dass das Mittel sein Inaktivierungspotenzial während der üblichen Standzeit im Labor nicht verliert.

Tabelle 4: Beispiele von möglichen Parametern

	Bereich	Erläuterung
Einwirkungszeit	<i>Zeitreihen:</i> <ul style="list-style-type: none"> im Stundenbereich, 15 Stunden (über Nacht), im Minutenbereich 	Für die Inaktivierung von Organismen in Flüssigkeiten sind Zeiten im Stundenbereich die Regel.
Konzentration des DM	unverdünnt, Verdünnungsreihe (1:5; 1:10, 1:100 etc.)	Relevant ist das Schlussverhältnis von DM zum Volumen der Probe.
Organismenzahl (Titer)	Bakterien, Pilze z.B. 10^6 /ml, Viren z.B. 10^5 bis 10^6 /ml, Parasiten z.B. 10^3 /ml	Kann auch höher sein; Konkret vorliegende Titer berücksichtigen.
Temperatur	15°C (Worst-case), 20°C Raumtemperatur RT, 40° bis 60° C*	* bei höheren Temperaturen gesundheitsgefährdende Dämpfe bedenken.
Belastung mit Inhibitoren (z.B. Proteinen)	Abschätzung Konzentration	Casein, Albumin, Serumproteine etc.
Stabilität des DM (frisch/alt)	Stunden bis Monate	je nach Mittel und ob verdünnt oder nicht.

5.5 Neutralisation des Desinfektionsmittels beim Nachweisverfahren

Der Grad der Inaktivierung wird anhand der Anzahl überlebensfähiger Organismen nach der Inaktivierung bestimmt. Dazu müssen die Organismen aus der Inaktivierungslösung in ein Wachstumsmedium (z.B. bei Bakterien) oder auf Zellkulturen (z.B. bei Viren) gegeben werden. Um keine falsch-negativen Resultate zu erhalten muss das Inaktivierungsmittel neutralisiert werden, d.h. die inaktivierende Wirkung muss ausgeschaltet werden. Für die Versuchsreihen mit variabler Einwirkungsdauer ist das Abstoppen der Inaktivierung eine experimentelle Herausforderung, die für jede Anwendung anders zu lösen ist. Als Beispiele möglicher Methoden zählen:

- Molekularsiebverfahren (d.h. abbinden, beispielsweise mittels Sephadex-Säule³², Abbildung 10: Molekularsiebverfahren zur Neutralisation des Desinfektionsmittels)

³² Siehe Norm: EN13610 (Chemical disinfectants – Quantitative suspension test for the evaluation of virucidal activity against bacteriophages of chemical disinfectants used in food and industrial areas)

- Zentrifugieren
- Chemisch (z.B. pH-Wert-Verschiebung / Neutralisation³³)
- Verdünnen der Inaktivierungslösung und Separieren der Organismen (z.B. durch Zentrifugieren)
- Filtrieren und Spülen.

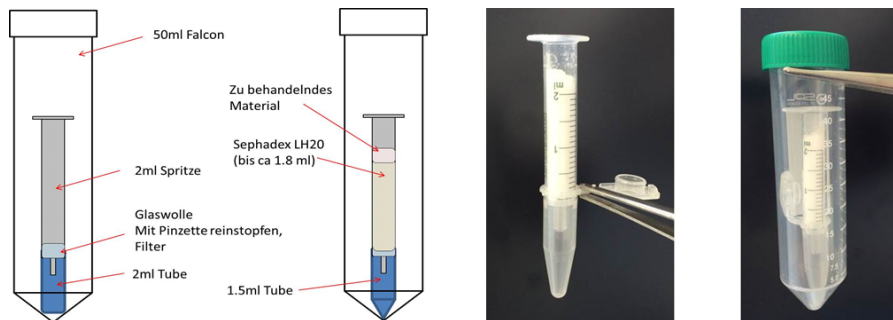


Abbildung 10: Molekularsiebverfahren zur Neutralisation des Desinfektionsmittels

Elimination der Toxizität des DM (z.B. aktive Chlorverbindungen) mittels Aufreinigung durch Molekularsiebverfahren (Sephadex).

5.6 Bestimmung der Organismenzahl

Im Normalfall ist das Knowhow, wie die Menge oder der Titer der in einem Labor verwendeten Organismen bestimmt werden kann, dort vorhanden. Die quantitative Bestimmung von Bakterien ist einfacher als diejenige von Viren oder von gewissen Parasiten. Der Nachweis durch Kultivierung ist die Methode erster Wahl und für Bakterien und Bakteriophagen einfach umsetzbar. Für Viren kann der Nachweis mit Hilfe von Zellkulturen durchgeführt werden. Die vorgängige Neutralisation des Desinfektionsmittels (Elimination der toxischen Wirkung) ist dabei besonders zu beachten.

Nur in Ausnahmefällen kann die Polymerase Kettenreaktion PCR eine Alternative zur Kultivierung darstellen, wobei hier der Rückschluss auf die Zahl der lebensfähigen Organismen nur indirekt möglich ist. Die PCR-Analyse weist lediglich die verbleibende DNA/RNA nach und erlaubt keine Unterscheidung, ob noch infektiöse Organismen oder transformationsfähige DNA vorhanden sind.

Wichtig: Nur der Nachweis, dass *keine* DNA/RNA mehr vorhanden ist, gilt als Beweis der Abwesenheit von infektiösen Einheiten. Dieser Nachweis ist methodisch anspruchsvoll und nur mit Positivkontrollen und Zeitreihen möglich.

³³ Siehe Norm: EN13727 (Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der bakteriziden Wirkung im humanmedizinischen Bereich)

Anstelle der normalerweise im Labor verwendeten Organismen können auch Indikator-Testorganismen verwendet werden, wenn diese einfacher nachzuweisen bzw. zu kultivieren sind (z.B. MS2-Bakteriophagen³⁴). Siehe auch Kapitel 5.1.

5.7 Optimierung und Effizienz

Optimierung bedeutet Effizienz und ist der Massstab für die Wirtschaftlichkeit bzw. das Verhältnis von Kosten und Nutzen. Neben geringen ökonomischen Kosten für das Mittel ist ein optimiertes Verhältnis zwischen **grosser Wirkung** und **kurzer Einwirkzeit** und hoher **Anwendungssicherheit** sowie **geringe Umweltbelastung** erstrebenswert.

Daraus folgt:

Die effiziente, optimierte Verwendung eines Mittels zur chemischen Inaktivierung bedeutet in erster Linie eine Anwendung mit wenig Wirkstoff, bei möglichst niedriger Konzentration, in kurzer Zeit und bei guter Materialverträglichkeit bei minimaler Belastung für Anwender und Umwelt.

Grosse Wirkung, grosse Anwendungssicherheit und geringe Umweltbelastung sind drei Aspekte, welche sich teilweise auch widersprechen und deshalb oft gegeneinander abzuwägen sind. Siehe dazu Kapitel 8. Was Wirkung und Wirksamkeit bedeutet, ist im nachfolgenden Kapitel 6 ausgeführt.

³⁴ ssRNA Virus mit vier Genen aus der Familie der *Leviviridae*. Siehe dazu auch die Publikation der Fussnote 25.

6 Nachweis der Wirksamkeit

6.1 Was heisst Nachweis der Wirksamkeit?

Um die Wirksamkeit einer Inaktivierungsmethode für Organismen nachweisen zu können, muss zuerst das Inaktivierungsziel festgelegt sein, an dem sich der Inaktivierungsgrad messen lässt. Dieser ist beim Autoklavieren eindeutig, denn das Autoklavieren bietet als validierte Methode – bei Einhaltung der Bedingungen – einen exakt vorgegebenen Grad der Inaktivierung bzw. der Abtötung der Organismen.³⁵

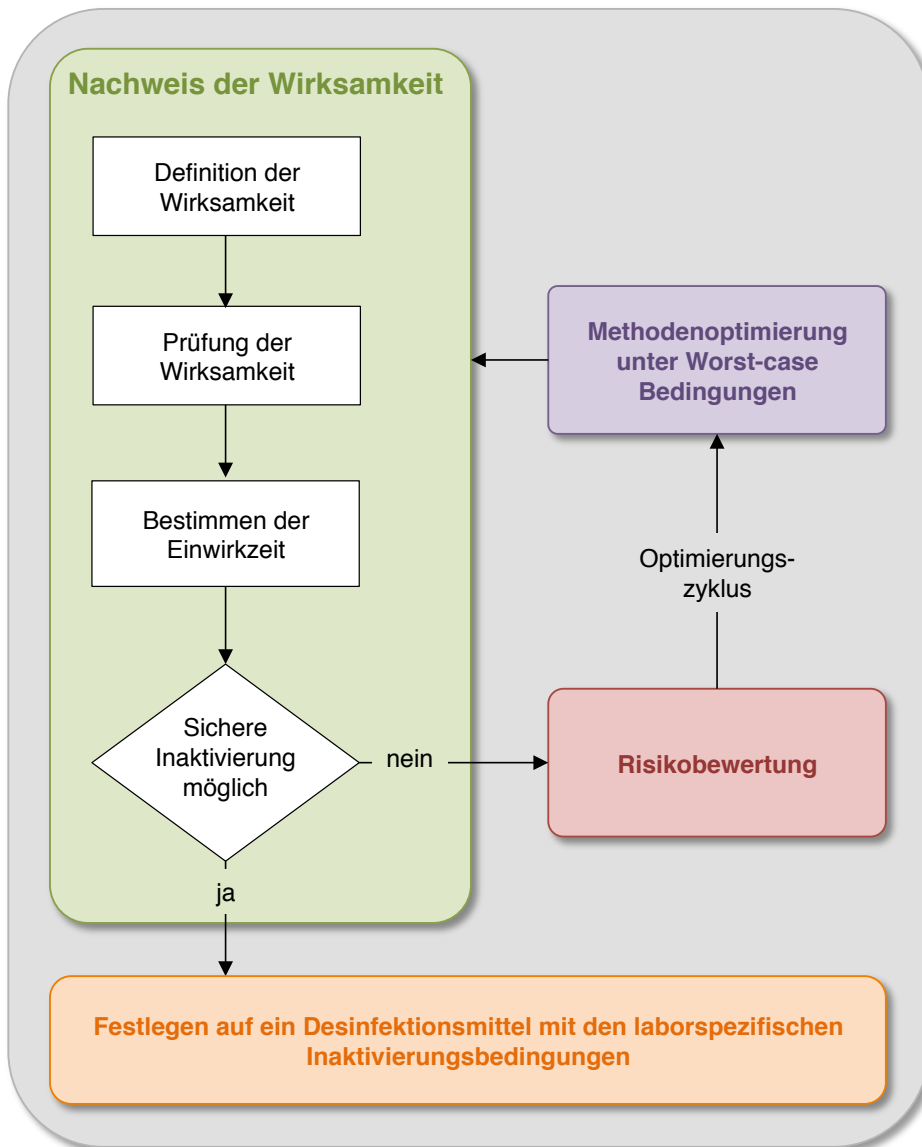


Abbildung 11: Nachweis der Wirksamkeit

Die Inaktivierungsbedingungen beim Autoklavieren sind klar definiert. Im Vergleich dazu müssen die Inaktivierungsbedingungen für jedes Desinfektionsmittel bei einer variierenden Zusam-

³⁵ Siehe Kapitel 3.4 und 10.1.

mensetzung der Flüssigkeiten (mit verschiedenen Organismenarten und unterschiedlichen Inhaltsstoffen) zuerst etabliert werden und die Wirksamkeit der angewendeten Methode für den zu inaktivierenden Organismus ist nachzuweisen.

Doch wie lässt sich *Wirksamkeit* nachweisen? Um dem Titel der *Chemische Inaktivierung von Organismen in Flüssigkeiten – Wegleitung zur chemischen Inaktivierung von Organismen in Flüssigkulturen oder Überständen mit dem Nachweis der Wirksamkeit und der sicheren Entsorgung* gerecht zu werden, muss geklärt werden, was eine wirksame Inaktivierung ist.

Der Nachweis der Wirksamkeit soll den Grundsätzen für ein naturwissenschaftliches Vorgehen erfüllen und aussagekräftig und nachvollziehbar sein. Im Vergleich zur einer *Validierung* (siehe Definition in Kapitel 3.5 und 10.1) werden an den Wirksamkeitsnachweis weniger Ansprüche an mehrfache Wiederholungen und Standardisierung gestellt (siehe dazu Kapitel 3.5).

6.2 Reduktionsrate als Massstab für die Wirksamkeit und die sichere chemische Inaktivierung

Die chemische Inaktivierung soll die sichere Entsorgung von Flüssigkeiten ermöglichen, so dass die inaktivierten Flüssigkeiten Mensch, Tier und Umwelt weder beeinträchtigen noch gefährden können (siehe Kapitel 7.3).

Für den Entscheid, ob eine sichere Entsorgung möglich ist, braucht es Vorgaben, was unter *Wirksamkeit der Inaktivierung* bzw. unter *inaktivierten Flüssigkeiten* zu verstehen ist. Dafür müssen Wirksamkeit und Effizienz des Inaktivierungsprozesses erfassbar und quantifizierbar sein.

Die **Wirksamkeit** (oder die Effektivität) ist ein Mass für die Zielerreichung (**Wirkung, Effekt**) und steht hier für einen bestimmten Inaktivierungsgrad.³⁶ Der Inaktivierungsgrad ist abhängig von der Reduktionsrate, welche nachfolgend weiter beschrieben ist.

Für ein Sterilisationsverfahren wird international einheitlich ein Sterility Assurance Level (SAL, Abbildung 4) von 10^{-6} verlangt. Ein SAL von 10^{-6} bedeutet, dass in einer Million gleichbehandelten Einheiten des Sterilisierguts maximal ein vermehrungsfähiger Mikroorganismus enthalten sein darf oder anders formuliert, dass der theoretische Restgehalt an vermehrungsfähigen Mikroorganismen in einer Einheit des Sterilisierguts höchstens 10^{-6} koloniebildende Einheiten beträgt. Bei einem Titer von 10^6 Organismen bedeutet Sterilisation somit eine gesamthafte Reduktion von 10^{12} , d.h. eine theoretische, d.h. mathematisch errechnete Reduktion der Organismenzahl um 12 log-Stufen.³⁷

³⁶ Ein Desinfektionsmittel hat eine Wirkung auf einen Organismus, wenn dieser zum Wirkungsspektrum des Mittels gehört. Die Wirksamkeit berücksichtigt neben der Wirkung selbst auch die Geschwindigkeit, die notwendige Konzentration etc. und ist damit umfassender zu verstehen.

³⁷ Der D-Wert (Dezimalreduktionszeit D) ist die Zeit für die Reduktion um eine log-Stufe, d.h. die Zeit, in der neun Zehntel einer Organismenpopulation absterben und somit die Organismenzahl auf ein Zehntel reduziert wird. Diese Reduktion um eine Zehnerpotenz entspricht der Abtötungsrate von 90%. Weil diese Zeit stark von der Temperatur und auch weiteren Bedingungen abhängig ist wird

Bei der für die thermische Inaktivierung durch Autoklavieren typischen exponentiellen Inaktivierungskinetik bedeutet ein SAL von 10^{-6} eine Verdoppelung der (messbaren) Inaktivierungszeit, welche notwendig ist, um einen Titer von 10^6 Organismen auf theoretisch eine Einheit (Zelle) eines Organismus (Reduktion um 6 log-Stufen) zu bringen.

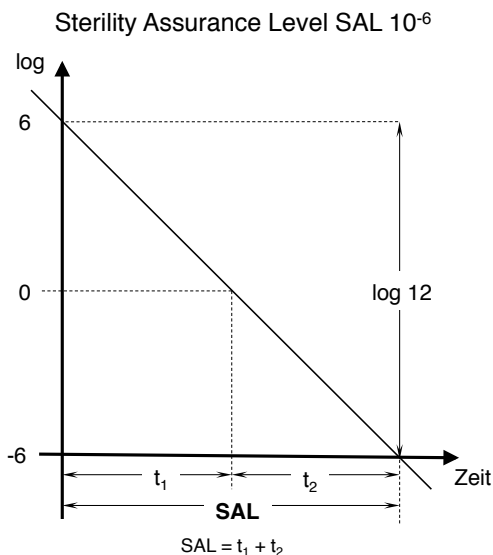


Abbildung 12: Sterility Assurance Level SAL (Organismentiter als Funktion der Einwirkzeit)³⁸

Die Bestimmung eines SAL-Wertes³⁹ beruht auf der Extrapolation einer exponentiellen Inaktivierungskinetik, bzw. eine Inaktivierungskinetik 1. Ordnung, welche als Gerade dargestellt werden kann.

Nur wenn bei der Desinfektion eine Inaktivierungskinetik 1. Ordnung vorliegt, kann der SAL-Wert (z.B. 10^{-6}) für die chemische Inaktivierung festgelegt werden. In allen anderen Fällen ist kein SAL-Wert bestimmbar.

Der Wert t_1 ist nur annäherungsweise bestimmbar, weil theoretisch die Nachweisgrenze bei einer Einheit (Zelle) eines Organismus liegt, in der Praxis dieser Nachweis so aber nicht erbracht werden kann.⁴⁰ t_1 und t_2 sind bei der vorliegenden Inaktivierungskinetik identisch. $t_1 + t_2$ entsprechen dem SAL-Wert von 10^{-6} (wie Abbildung 12).

sie typischerweise mit der Temperatur als Index bezeichnet, z.B. D_{121} . Weiterführende Angaben zur Sterilisation finden sich bei Wikipedia unter <https://de.wikipedia.org/wiki/Sterilisation>

³⁸ Eigene Darstellung

³⁹ Für die Definition von „steril“ ist ein Sterility Assurance Level von 10^{-6} erforderlich, was die Wahrscheinlichkeit bedeutet, dass in einer Million gleichbehandelten Einheiten des Sterilisierguts maximal ein vermehrungsfähiger Mikroorganismus enthalten ist.

⁴⁰ Aus biologischer Sicht entspricht jeder Wert <1 dem Wert Null; eine biologische Einheit ist tot, wenn sie die Bedingung <1 erfüllt.

Der SAL-Wert von 10^{-6} ist eine präzise Angabe für eine Inaktivierung, die in der Praxis auch als Overkill bezeichnet wird.

Ein Overkill kann auch mit einer chemischen Inaktivierung erreicht werden, ohne dies weder theoretisch noch praktisch beweisen zu können. Das Vorgehen zum Bestimmen einer Einwirkzeit für die sichere Inaktivierung mit Chemikalien sieht deshalb folgendermassen aus:

Um die Einwirkzeit für eine ausreichend sichere Inaktivierung mit einem chemischen Inaktivierungsmittel einer bestimmten Konzentration und unter bestimmten Bedingungen festzulegen, ist die Inaktivierungszeit bis hin zur Erreichen eines extrapolierten Nullwachstums der Organismen als Ausgangszeit (t) zu bestimmen.

Die Einwirkzeit für die sichere Inaktivierung beträgt das Vierfache diese Zeit t .

Als „Formel“ ausgedrückt ergibt dies:

$$t_{SI} \text{ (Einwirkzeit Sichere Inaktivierung)} = 4 t_{exN} \text{ (Einwirkzeit bis zum extrapolierten Nullwachstum)}$$

Die Einwirkzeit bis zum extrapolierten Nullwachstum (t_{exN}) ist aufgrund des Inaktivierungsverlaufs – ausgehend von der Ausgangszahl bis zur Nachweisgrenze der Organismen – herzuleiten.

Die Unsicherheit, welche dadurch entsteht, dass die chemische Inaktivierung (vor allem bei tiefen Konzentrationen der Chemikalie) keiner ordentlichen Inaktivierungskinetik folgt, wird dadurch kompensiert, dass die Einwirkzeit für die vollständige Inaktivierung vervierfacht und nicht wie beim SAL von 10^{-6} „nur“ verdoppelt wird. In Kapitel 6.4 Tabelle 8 ist die experimentelle Herleitung dieser Anforderung grafisch dargestellt.

6.3 Prüfung der Wirksamkeit

Um die Wirksamkeit eines Mittels zur chemischen Inaktivierung zu prüfen, muss die Inaktivierungskinetik bestimmt werden. Und um eine fundierte Aussage über die Wirksamkeit der chemischen Inaktivierung zu ermöglichen, ist eine Reihe von Kontrollen als Bezugsparameter notwendig (siehe Tabelle 5).

Dies sind:

1. Kontrolle mit Organismen ohne Desinfektionsmittel
2. Kontrolle ohne Organismen mit Desinfektionsmittel
3. Negativkontrolle ohne Organismen ohne Desinfektionsmittel (Sterilitätsprüfung)

Tabelle 5: Parameter als Rahmen zum Bestimmen der Inaktivierungskinetik

Parameter als Rahmen zum Bestimmen der Inaktivierungskinetik		
Inaktivierungskinetik	Inaktivierung mit DM in Abhängigkeit von Einwirkungsdauer, Konzentration und ev. Standzeit des DM unter Worst-case Bedingungen	a
Negativkontrollen (Kontrollen sollten kein Wachstum zeigen)	Sterilitätsprüfung für Neutralisationsschritt (Lösungen etc.)	b
	Sterilitätsprüfung Inaktivierungsverdünnungsmittel (Kontrolle bezogen auf Inaktivierung mit DM)	c
	Sterilitätsprüfung Organismenverdünnungsmittel (Kontrolle bezogen auf Zugabe der Testorganismen)	d
Positivkontrollen (Kontrollen sollten Wachstum zeigen)	Ausschliessen einer inaktivierenden Eigenschaft des Flüssigabfalls und Kontrolle für Titerbestimmung des Testorganismus	e
	Bestätigen der restlosen Neutralisation des DM, Kontrolle für Titerbestimmung des Testorganismus	f
	Recovery-Rate: Kontrolle für Titerbestimmung des Testorganismus	g
	Recovery Rate für Organismen im Flüssigabfall	h
Titerbestimmung	Organismenzahl im kontaminierten Flüssigabfall	i
	Testorganismen (z.B. 10 ⁶ cfu)	k

In der Tabelle 5 sind alle theoretisch möglichen Kontrollen aufgeführt. Je nach experimentellem Ansatz kann auf einzelne der Kontrollen verzichtet werden, beispielsweise, wenn die Zugabe der Testorganismen vom Flüssigkeitsvolumen her vernachlässigbar ist und deshalb die Kontrolle mit dem entsprechenden Volumen eines Verdünnungsmittels nicht relevant ist.

Als Kontrolle ist die Organismenzahl bzw. der Titer der Organismen (i) im Flüssigabfall und bei den zugefügten Testorganismen (für das *Spiking*) zu bestimmen. Zudem sind in Kontrollen aufzuzeigen, dass die Sterilität der einzelnen experimentellen Schritte gewährleistet ist. Von besonderer Bedeutung ist die Kontrolle (f), mit der gezeigt wird, dass die Neutralisierung des Desinfektionsmittels vor dem Kultivieren effektiv ist, so dass der Nachweis der Organismen nicht durch Desinfektionsmittelreste verfälscht wird. Dies ist insbesondere beim Nachweis von Viren in Zellkulturen von Bedeutung, wo die Zellen (für den Nachweis der Viren) relativ empfindlich gegenüber Desinfektionsmittel sind. Aber auch bei der Inaktivierung von bakteriellen Sporen ist zu bedenken, dass das verwendete Desinfektionsmittel vor dem Ausplatten der Sporen in der Sporenhülle neutralisiert (d.h. ausgewaschen) werden muss.

Abbildung 13 zeigt, wie die Kontrollen (e und f) durch Hinzufügen von Testorganismen in einer tiefen Konzentration (der Nachweis lässt sich dann ohne Verdünnungsschritte vornehmen) nach dem Neutralisationsschritt des Desinfektionsmittels durchgeführt wird.

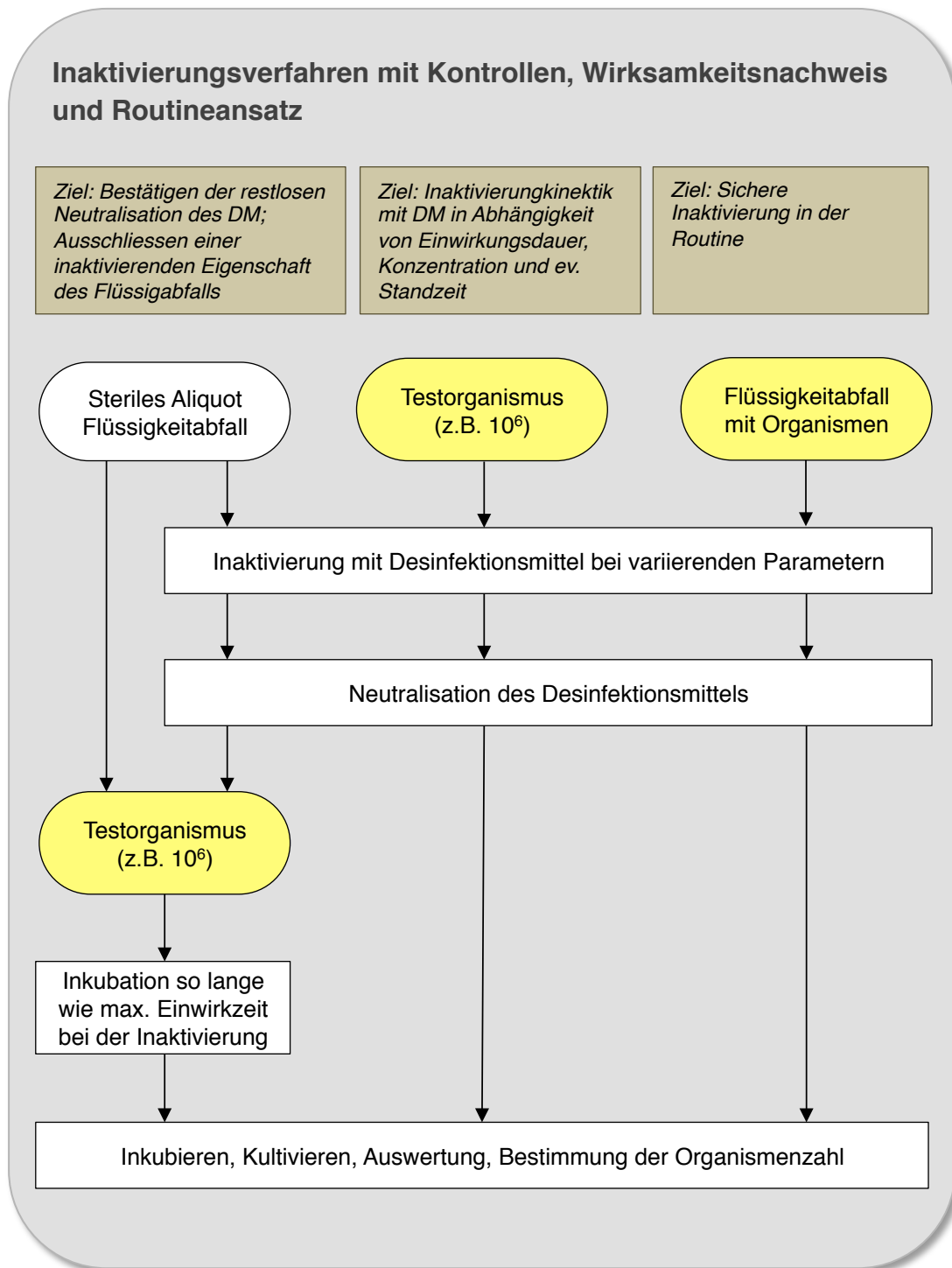


Abbildung 13: Inaktivierungsverfahren mit Kontrollen, Wirksamkeitsnachweis und Routineansatz

Mit den in der nachfolgenden Tabelle aufgeführten Schritten oder zuzufügenden Komponenten ist schematisch aufgezeigt, wie die Inaktivierungskinetik bestimmt werden kann.

Tabelle 6: Experimentelle Schritte oder Zugabe von Komponenten

Diese Tabelle erläutert die Spalten der nachfolgenden Tabelle 7.

Experimentelle Schritte oder Zugabe von Komponenten		Erläuterung
1.	Aliquot mit sterilisiertem Flüssigabfall FL	<i>Dient dazu, eine inaktivierende Eigenschaft im Flüssigabfall selbst auszuschliessen</i>
2.	Entsprechendes Volumen Verdünnungsmittel (wie 1)	<i>Kompensation des Volumen des unter Pt. 1 zugegebenen Aliquots an sterilem Flüssigabfall</i>
3.	Aliquot mit Flüssigabfall mit Organismen	<i>Inaktivierungsreihe</i>
4.	Zugabe von Testorganismen (10^6 cfu)	<i>Nachweis der Inaktivierungskinetik</i>
5.	Zugabe des Mittels zur chemischen Inaktivierung	<i>Durchführung der Inaktivierung mit Zeit- und Konzentrationsreihen</i>
6.	Entsprechendes Volumen Verdünnungsmittel (wie 5)	<i>Kompensation des Volumens des unter Pt. 5 zugegebenen Mittels zur chemischen Inaktivierung</i>
7.	Neutralisationsschritt (Aufheben der Wirkung des DM)	<i>Eliminieren bzw. Entfernen der Wirkung des Desinfektionsmittels</i>
8.	Zugabe von Testorganismen (10^2 cfu)	<i>Kontrolle, ob das Desinfektionsmittel effektiv neutralisiert worden ist</i>
9.	Zugabe des entsprechenden Volumens Verdünnungsmittel	<i>Kompensation des Volumen des unter Pt. 8 zugegebenen Aliquots mit Testorganismen</i>
10.	Maximale Einwirkzeit wie bei Inaktivierung	<i>Vorgaben für ausgewählte Positivkontrollen</i>
11.	Auswertung	<i>Inkubieren, Kultivieren, /CFU bestimmen</i>

Die Zugabe von „entsprechenden Volumina Verdünnungsmittel (Schritte 2, 6 und 9) kann ggf. weggelassen werden, wenn diese Volumina so gering sind, sodass die Titerbestimmung nicht verfälscht wird.

Tabelle 7 ist der Zusammenschluss von Tabelle 5 und Tabelle 6 und zeigt, wie neben dem Bestimmen der Inaktivierungskinetik die notwendigen Kontrollansätze und Titer-Bestimmungen zusammenzustellen sind. Die Tabelle ist von links nach rechts zu lesen. In den Spalten sind die jeweils notwendigen Arbeitsschritte oder zuzufügenden Komponenten (Puffer, Indikatororganismen etc.) indiziert (schwarze Punkte).

Tabelle 7: Prüfung der Wirksamkeit

Prüfung der Wirksamkeit		Experimentelle Schritte / Komponenten (Erläuterungen siehe Tab. 6)										
Bestimmen der	Ziel	1. Aliquot aus Flüssigabfall FL (steril)	2. entsprechendes Vol. Verdünnungsmittel	3. Flüssigabfall mit Organismen	4. Testorganismus (10 ⁶ cfu)	5. Zugabe Desinfektionsmittel	6. entsprechendes Vol. Verdünnungsmittel	7. Neutralisation des DM	8. Zugabe von Testorganismen (z.B. 10 ⁶ cfu)	9. entsprechendes Vol. Verdünnungsmittel	10. Maximale Einwirkzeit wie bei Inaktivierung	11. Auswertung / Wachstum
Inaktivierungskinetik	Inaktivierung mit DM in Abhängigkeit von Einwirkdauer, Konzentration und ev. Standzeit			•		•		•				
					•	•		•				
Negativkontrollen	Sterilitätsprüfung für Neutralisationsschritt	•						•				-
	Sterilitätsprüfung Inaktivierungsverdünnungsmittel	•					•	•				-
	Sterilitätsprüfung Organismenverdünnungsmittel	•						•		•		-
Positivkontrollen	Ausschliessen einer inaktivierenden Eigenschaft des Flüssigabfalls	•							•		•	+
	Bestätigen der restlosen Neutralisation des DM	•				•		•	•		•	+
	Recovery-Rate für Testorganismus				•		•	•				+
	Recovery Rate für Organismen im Flüssigabfall			•			•	•				+
Titerbestimmung	Organismenzahl im kontaminierten Flüssigabfall			•			•					+
	Testorganismen (z.B. 10 ⁶ cfu)				•		•					+

6.4 Bestimmen der Einwirkzeit für die sichere Inaktivierung

In diesem Kapitel ist exemplarisch aufgezeigt, wie die Einwirkzeit, Konzentration und ev. Standzeit des Desinfektionsmittels zu variieren sind, um die Inaktivierungskinetik zu bestimmen.

Beim Autoklavieren wird allgemein akzeptiert, dass es theoretisch keine 100% Inaktivierung gibt. Theoretisch, weil der Nachweis einer vollständigen Inaktivierung aus rein praktischen Gründen gar nie erbracht werden kann. Doch lässt sich beim Autoklavieren die Overkill-Rate aufgrund der exponentiellen Inaktivierungskinetik zumindest theoretisch beschreiben und

zahlenmässig festhalten. Bei der chemischen Inaktivierung ist die Situation weniger einfach, weil hier die Inaktivierungskinetik meistens nicht (oder nur in bestimmten Konzentrationsbereichen) einfach abbilden lässt und deshalb keine theoretischen Inaktivierungsziele extrapoliert werden können. Empirisch lassen sich aber Einwirkzeiten festlegen, welche das Ziel einer Overkill-Rate erfüllen. Um die Parameter für die chemische Inaktivierung in Form einer definierten und quantifizierbaren Reduktionsrate zu bestimmen, sind bei standardisierten Bedingungen mit *nur einem* Desinfektionsmittel und *nur einem* Indikatororganismus⁴¹ Messreihen bis zum extrapolierten Nullwachstum durchzuführen.

In der Praxis könnte der Verlauf einer Inaktivierung nach dem Schema in Tabelle 8 ablaufen.

Für den experimentellen Ansatz gilt:

- Das Mittel zur chemischen Inaktivierung wird in mindestens drei verschiedenen Konzentrationen getestet (DM-Konz. A, B und C).
- Die Einwirkzeit wird als Zeitreihe variiert (t_x , $2t_x$, $4t_x$, $8t_x$ etc.).
- Als einer von möglicherweise relevanten Einflussfaktoren wird die Standzeit (t_y) des Desinfektionsmittels variiert (t_y , $2t_y$, $3t_y$ etc.).

Prämissen sind:

- Der Indikatororganismus ist repräsentativ für das zu inaktivierende Organismengemisch und die Konzentration bewegt sich im getesteten Bereich von 10^6 cfu/ml oder höher bis bspw. 10^9 cfu/ml.
- (+/-) bedeutet nur noch ein knapp nachweisbares Wachstum bei unverdünnter Probe (Nachweisgrenze) und deshalb wird die entsprechende Einwirkzeit als Dauer für eine log 6 Reduktion betrachtet (orangefeld). Der Nachweis der vollständigen Inaktivierung kann nur indirekt erbracht werden, weil die Reduktionsrate nur bis hin zur Nachweisgrenze bzw. dem direkt nachweisbaren Wachstum von Organismen gezeigt werden kann.

⁴¹ Bekanntes Beispiel für einen Indikatororganismus für die Validierung von Autoklavierungsprozessen ist *Geobacillus stearothermophilus*. Bei chemischen Inaktivierungsmethoden gibt es ein paar regelmässig verwendete Testorganismen für die Wirksamkeitsprüfung von Desinfektionsmitteln; diese stammen vor allem aus dem für Spitäler relevanten Spektrum (HIV, HBV, Mykobakterien).

Tabelle 8: Bestimmen der Einwirkzeit für die sichere Inaktivierung, abhängig von Konzentration und Standzeit des Desinfektionsmittels DM

Bestimmen der Einwirkzeit für die sichere Inaktivierung													
Indikatororganismus	beispielsweise 10^6 bis 10^9 cfu/ml												
Einflussfaktoren (wie Standzeit)	t_y				$2t_y$				$3t_y$				etc.
Einwirkzeit	t_x	$2t_x$	$4t_x$	$8t_x$	t_x	$2t_x$	$4t_x$	$8t_x$	t_x	$2t_x$	$4t_x$	$8t_x$	etc.
DM-Konz. A	+/+	+/-	-/-	-/-	+/+	+/+	+/-	-/-	+/+	+/+	+/-	+/-	
DM-Konz. B	+/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/-	-/-	-/-	+/+	+/+	+/-	-/-	
DM-Konz. C	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/-	-/-	-/-	
Positiv-Kontrolle	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Negativ-Kontrolle	-				-				-				

Tabelle 9: Interpretation des Wachstums und Farbcode:

Wachstum (Doppelbestimmung)		Farbe	Einwirkzeit	Interpretation
+/+	eindeutiges Wachstum in beiden Duplikaten	+/+		Einwirkzeit bei der entsprechenden Konzentration ungenügend
+/-	knappes Wachstum (Nachweisgrenze) in beiden Duplikaten oder kein Wachstum in einem der Duplikate	+/-	t_{exN} (Einwirkzeit bis zum extrapolierten Nullwachstum)	
-/-	kein Wachstum in beiden Duplikaten	-/-		
-/-	kein Wachstum in beiden Duplikaten	-/-	t_{SI} (Einwirkzeit sichere Inaktivierung)	akzeptierbare Einwirkzeit: Overkill garantiert

Interpretationsbeispiele aufgrund der postulierten Resultate in Tabelle 7:

- Das Inaktivierungsmittel hat eine begrenzte Haltbarkeit: die Wirkung lässt mit (t_y , $2t_y$ und $3t_y$) nach.
- Um eine vollständige Inaktivierung garantieren zu können, ist die Desinfektion mit einem Desinfektionsmittel mit Standzeit von t_y bei folgenden Bedingungen durchzuführen⁴²:
 - a. DM-Konz. A: Sichere Inaktivierung bei einer Einwirkzeit von mindestens $8t_x$.
 - b. DM-Konz. B: Inaktivierung bei einer Einwirkzeit von mindestens $4t_x$.
 - c. DM-Konz. C: Inaktivierung bei einer Einwirkzeit von mindestens $2t_x$.

⁴² Diese Bereiche sind in der obigen Tabelle dunkelgrün markiert und markieren die akzeptable Einwirkzeit mit einem praktisch garantierten Overkill (siehe Kapitel 6.2).

7 Risikobewertung

Der Nachweis der sicheren Entsorgung ist der zentrale Aspekt der Risikobewertung in Kapitel 7.

7.1 Parameter und mögliche Kriterien

Notwendige Parameter für die Risikoermittlung⁴³ sind:

1. Absolute Menge (Gesamtzahl) der in die Umwelt freigesetzten Organismen
2. Konzentration (Titer)
3. Eigenschaften wie Vermehrbarkeit, Verbreitungsfähigkeit, Persistenz sowie Tenazität (Inaktivierungskinetik in der Umwelt, insbesondere im Abwasser)
4. Infektionsdosis für vorhandenen Pathogene

Mögliche Kriterien für die Bewertung des Risikos sind:

1. Kann die Vermehrbarkeit, Verbreitbarkeit und Persistenz in der Umwelt praktisch ausgeschlossen werden?
2. Wird die Infektionsdosis in der Umwelt für vorhandene Pathogene unterschritten?
3. etc.

Beachte dazu auch die ESV, in Anhang 2.

7.2 Risikobewertung und Erläuterungen zum Ablaufschema

Der Ablauf der Risikobewertung ist in der Abbildung als Ablaufschema dargestellt. Die einzelnen Schritte sind nummeriert und nachfolgend erläutert.

1. Für die Risikobewertung muss klar sein, welcher Risikogruppe die Organismen in der zu inaktivierenden Flüssigkeit zugeordnet sind (siehe Kapitel 1.2) und auch bekannt ist, welches chemische Inaktivierungsverfahren am besten geeignet ist (siehe Kapitel 4 und 5).
2. Für die Risikobewertung wird das (im Betrieb oder Labor) übliche Verfahren zur chemischen Inaktivierung als methodische Grundlage gewählt. Das setzt voraus, dass die entsprechenden Parameter nicht nur definierbar sondern auch festgelegt sind.
3. Die Inaktivierung bzw. Reduktionrate, welche durch (fachgerechtes) Autoklavieren erreicht wird, gilt als Bezugsgrösse (Referenz) für die *vollständige* Inaktivierung (siehe dazu Kapitel 6.2).
4. Wenn durch die chemische Inaktivierung nachweisbar eine vergleichbare Reduktion wie durch Autoklavieren erreicht wird, ist keine weitere Risikobewertung notwendig. Die Organismen gelten als vollständig inaktiviert; somit wird ein Austritt von Organismen in die Umwelt verhindert und eine sichere Entsorgung ist gewährleistet.

⁴³ Die situationsbezogene Risikoermittlung und Bewertung kann sich an den Vorgaben der ESV (Anhang 2.1; Art. 6 und 26) orientieren.

5. Falls die Reduktion durch chemische Inaktivierung nicht der Rate wie durch fachgerechtes Autoklavieren erreichbar entspricht, muss diese experimentell – entsprechend dem Vorgehen in Kapitel 5 – bestimmt werden.

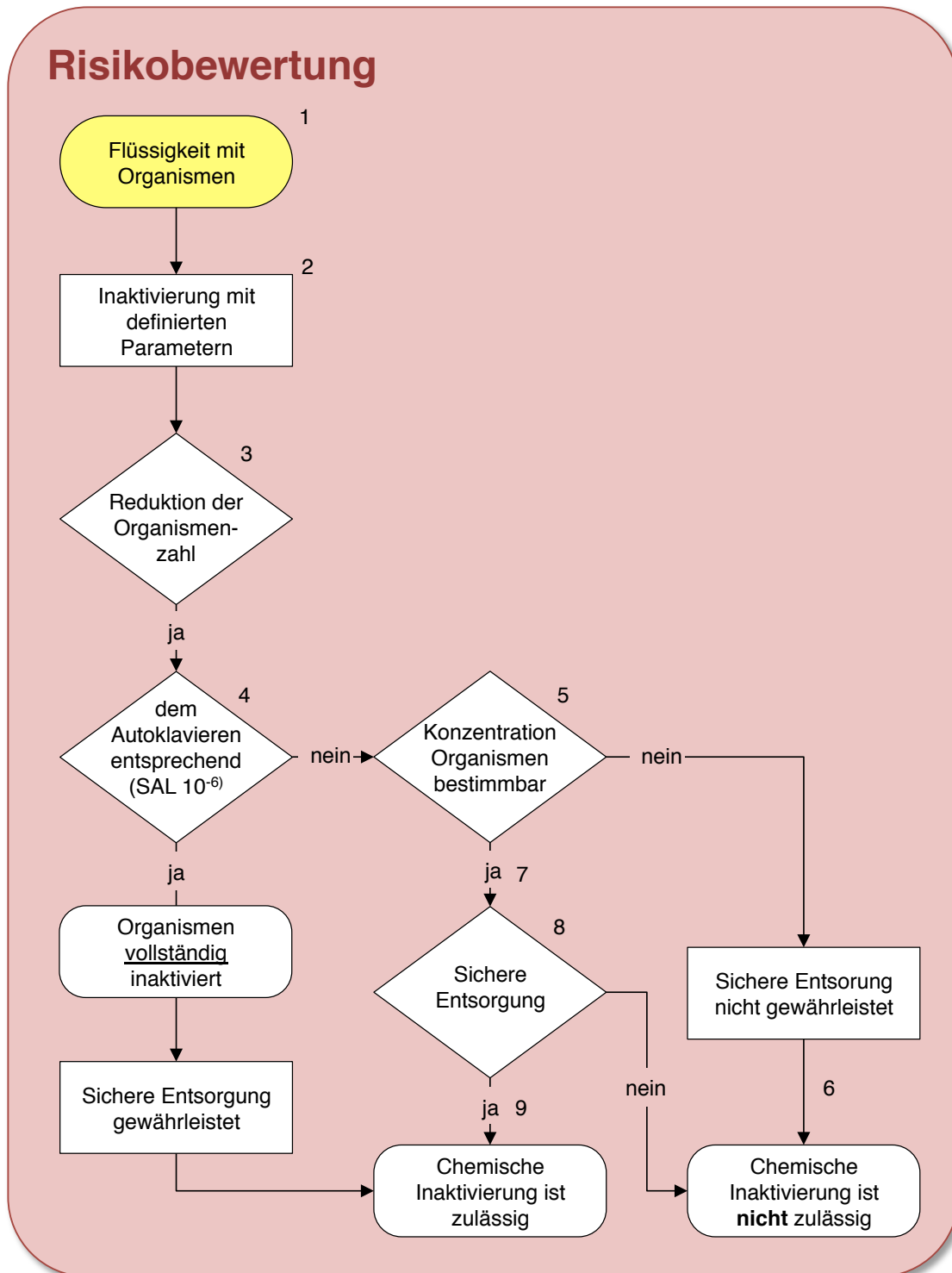


Abbildung 14: Ablaufschema Risikobewertung

6. Sind weder absolute Menge noch Konzentration der Organismen nach dem Inaktivierungsprozess bestimmbar, ist keine fundierte Aussage darüber möglich, ob eine sichere Entsorgung gewährleistet ist. Deshalb ist die chemische Inaktivierung nicht zulässig.
7. Um die Risikobewertung vornehmen zu können, muss einerseits die absolute Organismenzahl, aber auch die Konzentration (Titer) in den inaktivierten Flüssigkeiten bestimmbar und bekannt sein.
8. In der Risikobewertung ist aufzuzeigen, dass bei der Entsorgung via Abwasser Mensch, Tiere, Pflanzen und Umwelt vor Gefährdungen und Beeinträchtigungen geschützt sind.
9. Eine sichere Entsorgung durch chemische Inaktivierung ist dann gegeben, wenn mit der Einwirkzeit des Mittels zur chemischen Inaktivierung ein Overkill garantiert wird. Siehe dazu Kapitel 6.2 und 6.4. Theoretisch lässt sich auch bei der Overkill-Inaktivierung nicht ausschliessen, dass keine Organismen via Abwasser in die Umwelt gelangen. Neben der Overkill-Inaktivierung gilt folgendes Argument zusätzlich für die Risikominimierung: Selbst wenn nach der Inaktivierung eine geringe Zahl an Organismen in die Umwelt gelangen, sich diese dort aber weder vermehren, verbreiten noch überleben können, ist die sichere Entsorgung möglich und die chemische Inaktivierung unter belegbaren Overkill-Bedingungen erlaubt.

7.3 Kriterien für eine sichere Entsorgung biologischer Agenzien

Um die chemische Inaktivierung von Organismen bei der Entsorgung von flüssigen Abfällen in die Umwelt sicher anwenden zu können, müssen die Anforderungen an die zu erreichenden Schlussbedingungen festgelegt sein.

Für die Risikobewertung stehen die Anforderungen an die inaktivierten Flüssigkeiten, welche eine sichere Entsorgung in die Umwelt ermöglichen, im Zentrum. Bedingung für die sichere Entsorgung ist, dass aufgrund der theoretisch nicht auszuschliessenden, verbleibenden Organismenzahl (absolut und/oder aufgrund der Konzentration) plausibel angenommen werden kann, dass Mensch, Tier, Pflanzen und Umwelt vor Gefährdungen und Beeinträchtigungen geschützt sind.

Für den Entscheid, ob eine sichere Entsorgung möglich ist, muss die Organismenzahl nach der Inaktivierung quantifizierbar sein und bestimmt werden. Das methodische Vorgehen für den Nachweis der Wirksamkeit sind in den Kapiteln 4 und 5 ausgeführt.

Es gilt:

Chemisch inaktivierte Flüssigkeiten sind aus mikrobiologischer Sicht dann sicher in die Umwelt entsorgbar, wenn bei der Entsorgung – gemäss ESV⁴⁴ – Mensch, Tiere, Pflanzen und Umwelt vor Gefährdungen und Beeinträchtigungen geschützt sind.

Die Belastung mit chemischen Stoffen muss den gesetzlichen Vorgaben des Gewässerschutzgesetzes entsprechen.

7.4 Unschädliche Entsorgung als Abwasser

Bei der Entsorgung der flüssigen Abfälle sind die Vorgaben des Gewässerschutzgesetzes⁴⁵ und der Gewässerschutzverordnung⁴⁶ einzuhalten. Dies betrifft – neben der Belastung mit Chemikalien – vor allem zwei Aspekte:

1. Verdünnung
2. Überschreiten des pH-Wertes.

Zu 1.) Verschmutztes Abwasser darf weder verdünnt noch mit anderem Abwasser vermischt werden, um die Anforderungen einzuhalten. Die Verdünnung oder Vermischung ist nur erlaubt, wenn dies für die Behandlung des Abwassers zweckmässig ist und dadurch nicht mehr Stoffe, die Gewässer verunreinigen können, abgeleitet werden als bei getrennter Behandlung (GSchV, Anhang 3.2, Ziff. 1, Abs. 2, Bst. b).

Zu 2.) Bei der Inaktivierung mit NaOH darf der pH-Wert der resultierenden Abwässer bei der Einleitung in die öffentliche Kanalisation nicht über einem Wert von 9.0 liegen. Siehe dazu GSchV, Anhang 3.2, Ziff. 2, Nr.1.

Für die Belastung mit Chemikalien sind bei der Entsorgung von chemisch inaktivierten Flüssigkeiten mit Organismen die zwei folgenden Spezialfälle zu beachten:

1. Antibiotikarückstände in Medienüberständen
2. Chlorierte organische Abfälle bzw. Chlorierung von organischen Substanzen durch Javelle⁴⁷
3. Restmengen von aktivem Chlor.

In Spezialfällen der chemischen Inaktivierung ist zu prüfen, ob die Entsorgung der Flüssigkeiten als chemischer Sonderabfall gemäss den Vorschriften der VeVA notwendig ist (VeVA Art. 4 bis 7 sowie Anhang 1).

⁴⁴ ESV, Art. 1 Zweck: Diese Verordnung soll den Menschen, die Tiere und die Umwelt sowie die biologische Vielfalt und deren nachhaltige Nutzung vor Gefährdungen und Beeinträchtigungen durch den Umgang mit Organismen, deren Stoffwechselprodukten und Abfällen in geschlossenen Systemen schützen.

⁴⁵ Bundesgesetz über den Schutz der Gewässer (Gewässerschutzgesetz, GSchG) vom 24. Januar 1991; SR 814.20

⁴⁶ Gewässerschutzverordnung (GSchV) vom 28. Oktober 1998; SR 814.201

⁴⁷ Wässrige Lösung von Natriumhypochlorit (NaClO)

8 Anwendungssicherheit

Die Sicherheit bei der Anwendung betrifft folgende Aspekte:

1. Arbeitssicherheit und Gesundheitsschutz
2. Umweltschutz
3. Brandschutz, Explosionsschutz
4. Sicherheitskennzeichen
5. Kritische Faktoren (Haltbarkeit).

Ganz grundsätzlich dürfen nur in der Schweiz zugelassene Desinfektionsmittel verwendet werden.⁴⁸ Dies ist bei selber aus dem Ausland importierten Produkten zu beachten.

Die zu inaktivierenden Substanzen in Desinfektionsmitteln stammen aus ganz unterschiedlichen chemischen Stoffgruppen. Diese sind: Aldehyde, Aldehydabspalter, Alkohole, Alkylamine oder Alkylaminderivate, Amphotenside, chlor-, brom-, iodabspaltende Verbindungen, Chloramine, Glykolderivate, Guanidine bzw. Guanidinderivate, Laugen, Peroxidverbindungen, Phenole, Phenolderivate, Phenoether, Pyridinderivate, quaternäre Verbindungen⁴⁹, anorganische Säuren, organische Säuren und Schwermetallverbindungen.⁵⁰ Substanzen aus diesen Stoffgruppen sind teilweise stark gesundheits- und/oder umweltbelastend und können Mensch und Umwelt gefährden. Alkohole stellen bei nicht sachgemäßem Einsatz ein Brand- und Explosionsrisiko dar.

Aus Gründen des Gesundheits- und des Umweltschutzes sollten chlor- und phenolhaltige Desinfektionsmittel wenn möglich gemieden werden. Aldehyde sollten aus denselben Gründen nur dort eingesetzt werden, wo es keine gleichwertigen Alternativen gibt.

Die Sicherheitskennzeichnung⁵¹ eines Produktes bietet eine gewisse Hilfestellung für eine erste Beurteilung bei der Auswahl eines Mittels zur chemischen Inaktivierung. Dabei ist zu bedenken, dass sich die Kennzeichnung auf das Produkt im Behälter bezieht. Das bedeutet, dass ein Desinfektionsmittel ohne Gefahrenstoffkennzeichnung und für die unverdünnte Anwendung unter Umständen stärker gesundheits- und/oder umweltbelastend sein kann, als ein Mittel, welches eine Gefahrenstoffkennzeichnung enthält, aber stark verdünnt angewendet wird.⁵² Für eine vertiefte Bewertung sind human- und ökotoxikologische Kenntnisse notwendig.

Entsprechend ihres Anwendungsbereiches müssen die Substanzen auf Haut- bzw. Schleimhautverträglichkeit getestet sein. Sie sollten möglichst keine oder eine niedrige akute orale, dermale bzw. inhalative Toxizität aufweisen.

⁴⁸ <http://www.bag.admin.ch/anmeldestelle/13604/13869/13880/index.html?lang=de>; BAG Startseite > Biozidprodukt > Desinfektionsmittel

⁴⁹ Zu beachten: Quaternäre Verbindungen in Desinfektionsmitteln können für die Ausbildung von Antibiotikaresistenzen mitverantwortlich sein.

⁵⁰ Desinfektionsmittelliste des Verbund für Angewandte Hygiene (VAH), Stand: 1. April 2014; ©mhp-Verlag 2015; http://www.vah-online.de/uploads/PDF/vorwort_deutsch_mhp.pdf

⁵¹ Die Sicherheitszeichen sind in der SUVA Merkblatt „Sicherheitskennzeichnung“ (Bestellnummer 44007.D) im Detail beschrieben. (PDF)

⁵² Hinweis auf Anwendungssicherheit: bei Verdünnungen – insbesondere bei grossen Volumina – ist auf eine gute Durchmischung zu achten.

9 Schlussfolgerungen

Laboratorien oder Betriebe, die flüssige Abfälle chemisch inaktivieren und danach via Abwasser entsorgen wollen, müssen mindestens folgende Bedingungen erfüllen:

1. Kontaminierte flüssige Abfälle können chemisch inaktiviert und via Abwasser entsorgt werden, wenn die Wirksamkeit der Inaktivierung mit dem Autoklavieren vergleichbar ist.
2. Die standardisierten Inaktivierungsbedingungen für Worst-case Situationen sind definiert und in einer Arbeitsanweisung SOP festgehalten.
3. Die maximal mögliche Organismenzahl (Obergrenze Menge und Konzentration) vor und nach der Inaktivierung muss in der Grössenordnung bekannt sein.
4. In einer Risikoabschätzung ist zu darzulegen, dass es beim Entweichen von möglicherweise unvollständig inaktivierten Organismen via Abwasser zu keiner Gefährdung und Beeinträchtigung von Mensch, Tier und Umwelt kommen kann.

Die vollständige Inaktivierung, wie sie per Definition beim Sterilisieren durch Autoklavieren erreicht wird, kann bei der chemischen Inaktivierung als Ziel zwar angestrebt werden, ist letztendlich aber praktisch nicht beweisbar. Dies ist damit zu erklären, dass eine Overkill-Rate, wie sie bei der thermischen Dampfsterilisation extrapolierbar ist (siehe Abbildung 12), bei der chemischen Desinfektion nicht oder kaum berechnet werden kann, weil meist keine mathematisch ableitbare Inaktivierungskinetik vorliegt. Deshalb lässt sich das Ziel der vollständigen Inaktivierung mit chemischen Mitteln in der Praxis nur indirekt nachweisen.

Die Overkill-Rate bei der Inaktivierung mit Chemikalien kann so definiert werden, dass als sichere Einwirkzeit die vierfache Zeitdauer, welche für die Inaktivierung bis hin zum extrapolierten Nullwachstum notwendig ist, akzeptiert wird.

Als Formel dargestellt:

$$t_{SI} \text{ (Einwirkzeit Sichere Inaktivierung)} = 4 t_{exN} \text{ (Einwirkzeit bis zum extrapolierten Nullwachstum)}$$

Die Einwirkzeit bis zum extrapolierten Nullwachstum (t_{exN}) ist aufgrund des Inaktivierungsverlaufs – ausgehend von der Ausgangszahl bis zur Nachweisgrenze der Organismen – herzuleiten.

Einen grossen Stellenwert hat die situationsbezogene Risikobewertung, in der aufgezeigt wird, dass die Entsorgung von flüssigen Abfällen nach der chemischen Inaktivierung ohne Gefährdung von Mensch, Tier und Umwelt möglich ist. Im Vollzugsbereich der ESV ist ein Wirksamkeitsnachweis für die angewendete chemische Inaktivierung von flüssigen Abfällen zu erbringen und aufzuzeigen, dass Mensch, Tier und Umwelt vor Gefährdungen und Beeinträchtigungen durch die möglicherweise verbleibende Menge und Konzentration der Organismen geschützt

sind. Als Referenzmassstab für die *vollständige* Inaktivierung zur sicheren Entsorgung von Abfällen gilt das Autoklavieren bei Standardbedingungen (siehe Kapitel 1.2 und 6.2).

Wo der erforderliche Aufwand für den Wirksamkeitsnachweis und die Risikobewertung nicht erbracht werden will oder erbracht werden kann, ist das Autoklavieren nach wie vor die Methode der Wahl für die Inaktivierung von Organismen in Flüssigkeiten. Auch aus Gründen der Wirksamkeit und der Umweltverträglichkeit ist dem Autoklavieren der Vorrang zu geben. Und verglichen mit dem Aufwand für die Auswahl des Desinfektionsmittels inklusive Nachweis der Wirksamkeit einer chemischen Inaktivierungsmethode ist das Autoklavieren in der Regel die einfachere Alternative.

10 Definitionen, Normen und ergänzende Dokumente

10.1 Definitionen

Bezug auf Definitionen in der Norm EN 12740:1999

	Begriff	Definition
1.	Autoklavieren	Die Bedingungen während ≥ 15 Minuten bei einer Temperatur von $\geq 121^\circ\text{C}$ bei ≥ 1.05 barü Druck erfüllen den SAL von 10^{-6} für die allermeisten Organismen.
2.	Dekontamination (EN-Norm*)	Beseitigung mikrobieller Kontaminationen oder Reduzierung auf ein <i>akzeptables Niveau</i> .
	<i>Kommentar</i>	<i>Der Begriff „akzeptables Niveau“ erfordert eine präzisierende Definition.</i>
3.	Desinfektionsmittel (EN-Norm*)	Chemisches Mittel, das in er Lage ist, die Anzahl lebensfähiger Mikroorganismen zu <i>reduzieren</i> .
4.	Desinfektion (EN-Norm*)	Verfahren zur Reduzierung der Anzahl lebensfähiger Mikroorganismen mit Hilfe verschiedener physikalischer und chemischer Methoden.
	<i>Kommentar</i>	<i>Im Hygienebereich bedeutet Desinfektion die Abtötung oder Inaktivierung von pathogenen Mikroorganismen, sodass keine Gefährdung mehr von ihnen ausgeht. Es ist eine Massnahme zur gezielten Verminderung der Keimzahl, die normalerweise nicht zur Sterilität führt.</i>
5.	Dezimal-Reduktionswert (D-Wert)	Der Dezimal-Reduktionswert gibt bei einer bestimmten Temperatur die Zeit in Minuten an, die erforderlich ist, um die Keimzahl um eine Zehnerpotenz zu senken, was einer Abtötungsrate von 90% entspricht.
6.	Inaktivierung (EN-Norm*)	<i>Teilweise oder vollständige Zerstörung</i> einer gegebenen Aktivität bis hin zur Zerstörung des mikrobiologischen Systems.
	<i>Kommentar</i>	<i>Nur die „vollständige Inaktivierung“ bedeutet die Abwesenheit von infektiösem und übertragbarem genetischem Material (Plasmide, RNA)</i>
7.	Mikroorganismus (EN-Norm*)	Zelluläre und nichtzelluläre mikrobiologische Einheit, die fähig ist, sich zu vermehren oder genetisches Material zu übertragen.
8.	Mikroorganismus ESV, Art. 3, Bst. b	Mikrobiologische Einheiten, insbesondere Bakterien, Algen, Pilze, Protozoen, Viren und Viroide; ihnen gleichgestellt sind Zellkulturen, Prionen und biologisch aktives genetisches Material.
9.	Steril (EN-Norm*)	Ein von lebensfähigen Mikroorganismen freier Zustand.
	<i>Kommentar</i>	<i>Siehe dazu ANMERKUNG 1⁵³ und ANMERKUNG 2⁵⁴</i>

⁵³ ANMERKUNG 1: In der Praxis kann eine solche Festlegung der absoluten Abwesenheit von lebensfähigen Mikroorganismen nicht getroffen werden. Der Zustand „steril“ kann jedoch durch Anwendung zugelassener oder allgemein anerkannter Verfahren der Sterilisation als erwiesen angesehen werden.

⁵⁴ ANMERKUNG 2: Das Verfahren der Inaktivierung lebensfähiger Mikroorganismen während des Sterilisationsablaufs wird üblicherweise durch eine empirische mathematische Funktion beschrieben, üblicherweise durch eine Exponentialfunktion. Durch ihren mathematischen Verlauf können solche Funktionen auf einen sehr kleinen Wert verringert werden, jedoch niemals auf Null. Diese empirischen Funktionen können jedoch zur Überwachung oder zur Bewertung der Verfahrenspa-

	Begriff	Definition
10.	Sterilisation (EN-Norm*)	Verfahren zum Erreichen eines sterilen Zustandes.
	<i>Kommentar</i>	<i>Sterilisation bezieht sich auf lebensfähige Organismen, während Inaktivierung auch nichtzelluläre biologische Agenzien einschliesst.</i>
11.	Sterility Assurance Level (SAL-Wert)	Für die Definition von „steril“ ist ein Sterility Assurance Level von 10^{-6} erforderlich, was die Wahrscheinlichkeit bedeutet, dass in einer Million gleichbehandelter Einheiten des Sterilisierguts maximal ein vermehrungsfähiger Mikroorganismus enthalten ist.
12.	Validierung (EN-Norm*)	Dokumentiertes Verfahren zur Aufzeichnung und Auswertung der Ergebnisse, die für den Nachweis gebraucht werden, dass ein Verfahren kontinuierlich ein Produkt ergibt, das mit den vorgegebenen Eigenschaften übereinstimmt.
13.		Validierung ist ein dokumentiertes Verfahren zum Erbringen, Aufzeichnen und Interpretieren der Ergebnisse, die für das Erarbeiten der Aussage benötigt werden, dass ein Verfahren ständig Produkte liefert, die den vorgegebenen Spezifikationen entsprechen (SN EN ISO 17665-1, 3.60).

* Definitionen gemäss Norm EN 12740:1999-10⁵⁵

10.2 Ausgewählte Normen im Bereich Desinfektion

DIN EN 12740:1999-10: Biotechnik - Laboratorien für Forschung, Entwicklung und Analyse - Leitfaden für die Behandlung, Inaktivierung und Prüfung von Abfällen; Deutsche Fassung

DIN EN 13610: Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der viruziden Wirkung gegenüber Bakteriophagen von chemischen Desinfektionsmitteln in den Bereichen Lebensmittel und Industrie. Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/ Stufe 1). European Committee for Standardization (CEN) 2003

parameter eines Sterilisationsablaufs angewandt werden, um einen Sollgrad der Inaktivierung lebensfähiger Mikroorganismen zu realisieren.

⁵⁵ Norm EN 12740:1999: Diese Norm gibt Anleitungen zu Verfahren der Behandlung, Inaktivierung und Prüfung von Abfällen, die Organismen enthalten, welche bei Tätigkeiten und Prozessen in biotechnischen Laboratorien entstehen. Sie behandelt Verfahren zur Reduzierung der Risiken, die bei der Exposition gegenüber Abfallstoffen aus Tätigkeiten im Labormaßstab entstehen, die Organismen enthalten, welche eine Gefährdung oder potentielle Gefährdung für Menschen, Tiere, Pflanzen oder die Umwelt darstellen können. Zu derartigen Abfällen können sowohl mit Organismen belastete feste, flüssige oder gasförmige Nebenprodukte oder Abwässer gehören, als auch Gegenstände oder Ausrüstungen, die entsorgt werden müssen und die mit Organismen kontaminiert sein können. Abfälle können in biotechnischen, klinischen, molekularbiologischen, mikrobiologischen und anderen Laboratorien bei Tätigkeiten entstehen, bei denen Organismen gehandhabt, gentechnisch veränderte Organismen erzeugt oder verwendet werden, wie auch bei Laboratoriumsarbeiten, bei denen menschliches, tierisches oder pflanzliches Material verwendet wird. Sonstige Abfälle und Abfälle aus der gesundheitlichen Betreuung von Menschen oder sonstiger medizinischer Tätigkeit sind nicht Gegenstand dieser Norm.

- DIN EN 14476: Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Suspensionsversuch Viruzidie in der Humanmedizin verwendete chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 1). European Committee for Standardization (CEN) 2005
- DIN EN 14675: Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der viruziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel und Antiseptika – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/ Stufe 2). European Committee for Standardization (CEN) 2006
- DIN EN 14885: Leitfaden für die Anwendung der Europäischen Normen für chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika 2007-01. European Committee for Standardization (CEN) 2006
- DVG. Richtlinien für die Prüfung chemischer Desinfektionsmittel. In: e.V. DVG, ed. Verlag der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V. Gießen; 2007

10.3 Referenzen

- Aktueller Stand zur Viruzidieprüfung – ein Überblick Hygiene & Medizin 37 (7/8)*; Ingeborg Schwebke; Holger F. Rabenau (2012)
<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:0257-10026059> oder
http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Krankenhaushygiene/Desinfektionsmittel/Virusinaktivierung/Viruzidiepruefung.pdf?__blob=publicationFile
- Desinfektionsmittelliste des Verbund für Angewandte Hygiene (VAH)*, Stand: 1. April 2014;
©mhp-Verlag 2015; http://www.vah-online.de/uploads/PDF/vorwort_deutsch_mhp.pdf
- Leitlinie der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten (DVV) und des Robert Koch-Instituts (RKI) zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren in der Humanmedizin*; Fassung vom 1. August 2008; Seite 941;
DOI 10.1007/s00103-008-0615-5)
- „Liste der vom Robert Koch-Institut geprüften und anerkannten Desinfektionsmittel und -verfahren“; Online Bezugsquelle:
http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Krankenhaushygiene/Desinfektionsmittel/Desinfektionsmittelliste.pdf?__blob=publicationFile

Anhang

Guidelines for the validation and application of alternative inactivation methods to heat inactivation using an autoclave

(01/07/2016/v21); 2016; Kantonales Laboratorium Basel-Stadt;

Auftraggeber: Bundesamt für Gesundheit BAG

Guidelines for the validation and application of alternative inactivation methods to heat inactivation using an autoclave

Auftraggeber:

Bundesamt für Gesundheit BAG

Auftragnehmer:

Kantonales Laboratorium Basel-Stadt (Vertrag: "Nachweis von gefährlichen Organismen im Zusammenhang mit ESV-relevanten Tätigkeiten und B-Ereignissen", Vertrag-Nr. 14.008571 /604.0001 /-398)

Datum/Version:

01/07/2016/v21

1. Table of Contents

1.	Table of Contents	2
2.	Introduction.....	3
2.1	Context	3
2.2	Aim of this manual.....	3
2.3	Definition of important terms and fundamentals.....	3
3.	Steps during the validation process of alternative inactivation methods	7
3.1	Work flow for validation and routine application	7
3.2	Factors affecting the validation process.....	8
4.	Alternative inactivation methods.....	9
5.	Conclusion	12
5.1	Minimal requirements.....	12
5.2	Critical factors for process validation	12
6.	Examples for the validation of alternative inactivation methods	13
6.1	NaOH for the inactivation of bacteria	13
6.1.1	Inactivation resistance and killing kinetic.....	13
6.1.2	Interfering factors of sodium hydroxide inactivation.....	14
6.1.3	Testing a worst-case scenario using GS spores	15
6.2	Ultraviolet light (UVC_{254nm}) for the inactivation of GS spores	16
6.3	Combined approach: NaOH and UVC_{254nm}	17
6.4	Chlorine to inactivate viruses and phages	18
6.4.1	Inactivation resistance and killing kinetic.....	18
6.4.2	Interfering factors of chlorine inactivation	19
6.4.3	Testing of a worst case scenario using MS2 Bacteriophages.....	20
6.4.4	Testing of the worst-case scenario using Adenovirus in a cell culture system.....	21
6.5	Testing chemical indicators for UVC_{254nm} and chlorine inactivation	24
6.5.1	Potential for using erythrosine B as chemical indicator for UVC _{254nm} inactivation	24
6.5.2	Potential for using DPD as chemical indicator for chlorine inactivation.....	24
7.	Resources for process validation protocols.....	27
8.	FAQs.....	29
9.	References	30

2. Introduction

2.1 Context

When handling organisms in a laboratory, liquid and solid cultures containing living organisms are generated. According to the Containment Ordinance (CO¹), disposal of these cultures has to be performed in such a way that they do not represent a hazard to the population or the environment after being released from the 'contained' system into the sewage or the public waste disposal system. The preferred method of liquid and solid culture inactivation is heat inactivation using an autoclave. However, the CO allows the inactivation and disposal of solid cultures by external companies. Liquid cultures may be inactivated using alternative inactivation processes. Nevertheless, the commentaries on the CO state that the alternative process needs to be tested and validated by the user and must be approved by the federal authorities. Federal authorities are receiving increasing numbers of applications for approval, since autoclaves are expensive and alternative inactivation processes at a first glance can appear easier and more cost effective. However, there are many aspects and parameters to consider for a proper validation and the routine application of these methods.

2.2 Aim of this manual

In this manual, we aim to provide guidelines for the validation and (routine) application of alternative inactivation methods. This is essential, because various factors may determine the success of both the validation and the application of alternative inactivation methods. This manual will outline challenges during the validation process and highlight specific minimal requirements that should be fulfilled. The manual is intended to support laboratory users and the cantonal and federal authorities in deciding whether certain minimal requirements are met.

2.3 Definition of important terms and fundamentals

In order to understand the basics of inactivation, we will first provide an overview of important terms used in combination with the inactivation of organisms if not provided in the CO¹. The overall aim of inactivation is to obtain a sterile product, which can be disposed of safely.

Inactivation: Partial or full destruction of a given activity up to destruction of the microbiological system².

Sterile: State of being free from viable microorganisms². (See also section of sterility assurance level: SAL).

Sterilization: Process used to reach a sterile product².

Disinfection: Process of reducing the number of viable microorganisms by various physical and chemical methods. Disinfection usually does not lead to sterility³.

Decontamination: Removal of microbiological contamination or reduction to an acceptable level³.

¹ Ordinance on Handling Organisms in Contained Systems (Containment Ordinance); legally binding version: Verordnung über den Umgang mit Organismen in geschlossenen Systemen vom 9. Mai 2012 (Stand am 1. Juni 2015)

² Biotechnology – Laboratories for research, development and analysis. Guidance for handling, inactivation and testing of waste (EN12740:1999)

³ See footnote 2

Validation: Documented procedure for obtaining, recording and interpreting the results needed to show that a process will constantly yield a product complying with pre-determined specifications³.

Killing kinetic

A killing kinetic curve results from the connection of data points obtained by measuring the number of surviving organisms after a specific incubation time or radiation dose exposed to a specific inactivation method.

The example shows surviving *Geobacillus stearothermophilus* spores and vegetative *Staphylococcus aureus* after autoclaving for specific time intervals. In these cases, the killing kinetic curves are linear and therefore the D-value can be defined as the time to reduce the number of a specific microorganism by 1 log cycle i.e. $N_0/N_t = 10$. The D-value is specific to a temperature. When indicating D-values for an organism, the temperature at which the organism was tested must also be stated. This is usually done as a subscript of 'D' (Figure 1).

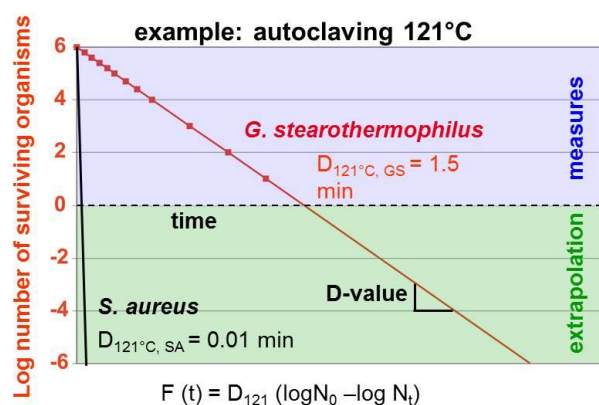


Figure 1: Killing kinetic of *G. stearothermophilus* spores and vegetative *S. aureus* inactivated by autoclaving at 121°C. Over time, samples are taken and cultured to monitor the log number of surviving organisms. The D-value is defined as the time it takes to reduce the number of organisms by 1 log cycle. The figure also shows that spores of *G. stearothermophilus* are more resistant to autoclaving than *S. aureus*, as indicated by a less steep killing kinetic curve.

Sterility assurance level (SAL)

Sterility means the absence of all viable microorganisms including viruses (Sharp 1995). At present, a sterility assurance level (SAL) of 10^{-6} is desired for sterilization procedures, i.e., a probability of not more than one viable microorganism in an amount of one million sterilized items of the final product. Since a SAL of 10^{-6} is difficult to measure experimentally, model situations need to be created, with the help of which conclusions can be drawn regarding the treatment conditions necessary to attain sterility meeting the SAL of 10^{-6} (see below). These are done using the reduction rate (D-value: Figure 1).

By extrapolating the reduction after sterilization, a theoretical overall performance of the procedure of 12 log increments (overkill conditions) is demanded to verify an SAL of 10^{-6} (see Figure 1). By comparison, other recommendations for thermal sterilization procedures demand only evidence that the difference between the initial contamination and the number of test organisms at the end of the process amount to more than six orders of magnitude. A practical proof of the required level of sterility assurance of 10^{-6} is not possible. For more details on sterility assurance levels, see von Woedtke and Kramer (2008).

Deviations from the sterility concept

Theoretically, when using non-thermic inactivation methods (anything other than the autoclave), killing kinetic curves are not linear and result in a so called 'tailing' (Lambert and Johnston 2000; Kramer and Assadian 2008). There are many hypotheses for this, but one

reasonable explanation for the tailing effect of killing kinetic curves with chemical disinfectants is 'quenching' i.e. the depletion of the disinfectant resulting in a reduced concentration (Johnston et al. 2000). In some cases, e.g. when excess chemical is used, nearly linear killing kinetic curves can be achieved. Nevertheless, it is important to note that a SAL of 10^{-6} cannot be guaranteed for the inactivation methods with non-linear killing kinetic curves.

Biological indicators

A biological indicator is a characterized preparation of a specific microorganism with a defined concentration that provides a defined and stable resistance to a specific inactivation process. If the inactivation resistance to a specific process is not known, it has to be demonstrated that it is more resistant than the organisms present in the unit of material to be sterilized. Biological indicators are usually viewed as a model for biological load to simulate the most resistant biological indicator organism⁴. Spore-forming microorganisms (e.g. *G. stearothermophilus*, *Bacillus atrophaeus* and *B. pumilus*) are widely used as biological indicators, because these microorganisms are highly resistant to inactivation compared to other microorganisms (Figure 2). The inactivation resistance hierarchy of microorganisms depicted below represents a rough guide and may also depend on the inactivation method.

There are three conditions for the use of an organism as biological indicator:

1. The inactivation resistance of the specific microorganism should be as high as possible towards the inactivation method. The inactivation of such highly resistant microorganisms encompasses all less resistant organisms, including most pathogens.
2. The specific microorganism ideally should not be pathogenic.
3. The specific microorganism needs to be culturable without great effort.

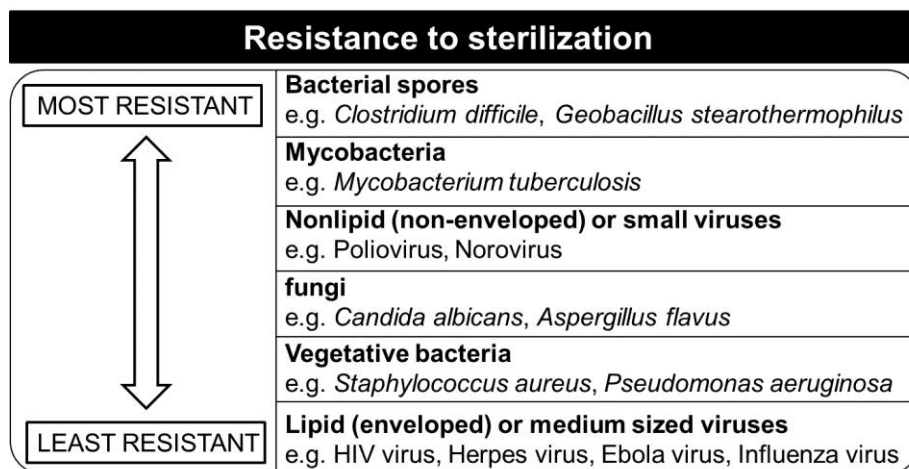


Figure 2: Order of inactivation resistance. This hierarchy considers broad classifications of microbial categories and it is considered a rough guide to general susceptibility patterns of microorganisms to sterilization. The hierarchy may depend on the inactivation method. Figure adapted from Favero and Bond (1991).

A biological indicator can be used to assist the process development and process validation steps of an alternative inactivation method (Figure 3) or to assess the performance of the inactivation equipment during routine monitoring.

⁴ For more information on requirements for biological indicators, see EN 11138: Sterilization of health care products - Biological indicators - Part 1: General requirements (ISO 11138-1:2006)

Types of biological indicators

There are three types of biological indicators. Each type incorporates a known species of a microorganism of a known inactivation resistance.

Type 1: Spores that are already added to a carrier (disk, strip, filter paper, glass, plastic or other material), packaged to maintain integrity and viability of the inoculated carrier. Carriers should not be degraded by the inactivation process. This type of biological indicator mimics a surface and can be used to validate surface sterilization processes.

Type 2: Spore suspensions consist of a known concentration and are directly inoculated on or into a unit of material to be sterilized. The stock spore suspension contains dormant (non-germinating) spores and is held in a non-nutritive liquid, e.g. 40% ethanol. Spore suspensions are probably the best option for validating the efficacy of chemical disinfectants.

Type 3: Self-contained indicators consist of a spore suspension in its own medium in ampules. They often contain a dye, which indicates positive or negative growth following incubation. This type is not suitable for testing chemical inactivation methods, because the chemical disinfectant cannot penetrate the ampules (no contact with the biological indicator).

G. stearothermophilus, *B. atrophaeus* and *B. pumilus* spores can be purchased from different companies, e.g. BAG Healthcare⁵.

Chemical indicators and physical sensors^{6,7}

Chemical indicators and physical sensors are used to monitor the inactivation process. Chemical indicators are designed to respond with a characteristic chemical change to one or more of the physical conditions during the inactivation process. In contrast, physical sensors are usually a piece of equipment (e.g. pH meter) indicating that a certain condition has been fulfilled. Consequently, the chemical indicator/physical sensor is process-specific and each inactivation method requires the use of different chemical indicators or physical sensors. For example, when using an acid for inactivation, it is not possible to use the same chemical indicator for acids as for bases (Table 1). Chemical indicators are designed to detect potential inactivation failures, but they do not test for sterility.

Chemical indicators have been classified by the Food and Drug Administration (FDA) into six classes depending on their action.

Class I: process indicators. They are intended to be used with individual items to demonstrate that the items have been exposed to the inactivation process and to distinguish between processed and unprocessed items. An example is autoclave tape.

Class II: dynamic air removal test (formerly called the Bowie-Dick test)

Class III: single parameter indicators (measure only one of the parameters of the inactivation process)

Class IV: multi-parameter indicators. These indicators reveal a change in one or more predefined process parameters based on a chemical or physical change resulting from exposure to a process. They provide much more information about the inactivation cycle than a Class III indicator.

Class V: chemical indicators. These are designed to react to all of the critical parameters over a specified range of inactivation cycles. Their performance has been correlated to the performance of the relevant biological indicator under the labeled conditions of use. This means that chemical integrators closely resemble biological indicators, but cannot be used to replace them.

⁵ <http://www.bag-healthcare.com/hygiene-monitoring/sterilisationsindikatoren/biologische-indikatoren>
http://www.spdceus.com/monitoring_sterilization_process.htm
http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_c1035.html

⁶ For a good overview of chemical indicators, see: <http://www.sterislife.com/Products/Process-Indicators/Chemical-Indicators.aspx>

⁷ For more information on requirements for chemical indicators, see EN 11140: Sterilization of health care products - Chemical indicators - Part 1: General requirements (ISO 11140-1:2005)

Class VI: Emulating Indicators. These are designed to confirm the presence or absence of specific time and temperature parameters during a cycle, and integrate all the critical parameters of the inactivation cycle (temperature, saturated steam and exposure time).

Interfering factors

Several physical and chemical factors influence the efficacy of an inactivation method. These include, for example external factors such as temperature, humidity or light exposure, and internal factors such as pH, water hardness or organic load (Cremieux 1986). Depending on the inactivation process, there is a specific set of interfering factors which applies. In general, the activity of inactivation methods increases as the temperature increases, but there is a point at which e.g. chemical inactivation agents can degrade, if heated too much. The temperature at which chemical inactivation agents degrade can be defined as an exclusion factor. Concerning pH, there are different mechanisms. For example, an increased pH improves the antimicrobial activity of agents containing aldehydes (Table 1), but decreases the activity of others such as hypochlorites. Relative humidity influences the activity of gaseous agents such as ethylene oxide. Water hardness reduces the reduction rate of some chemical inactivation processes, because divalent cations (e.g. Mg^{2+} and Ca^{2+}) interact with soap to form insoluble precipitates.

Organic load (proteins) such as serum, blood or fecal material may interfere with the activity of the inactivation process in at least two ways: First, a chemical reaction between the disinfectant and the organic load may result in a complex that is less germicidal or non-germicidal leaving less of the active agent to attack the microorganisms. Secondly, organic material may protect microorganisms from attack by acting as a physical barrier. For the same reason, another interfering factor can be biofilm formation. Biofilms are formed by bacteria and fungi and their presence make it more difficult disinfectants to penetrate the microbial matrix.

3. Steps during the validation process of alternative inactivation methods

3.1 Work flow for validation and routine application

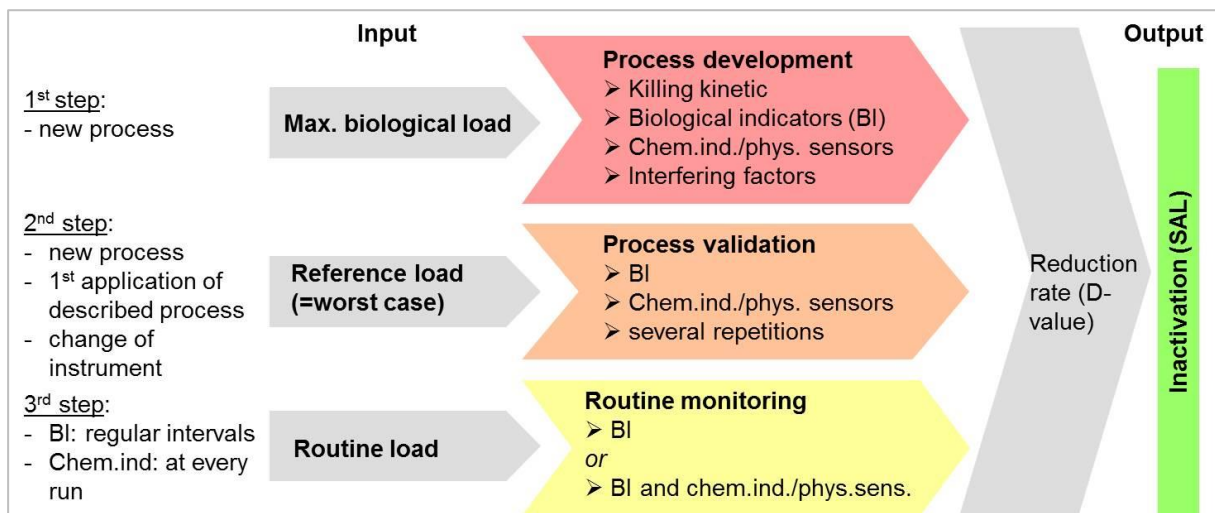


Figure 3: Workflow and involved factors during process development, process validation and routine application of inactivation methods.

1st step: Process development

During the process development of a new process phase, it is important to assess the killing kinetic curve ([Figure 1](#)) of the inactivation method using the maximal biological load. Suitable biological indicators (see 1.2) should be used to demonstrate that the process is leading to the desired reduction rate (e.g. SAL of 10^{-6}). Suitable chemical indicators and/or physical sensors should be used to monitor the chemical/physical inactivation conditions. Different interfering factors (see 1.2, 5.1.2 and 5.4.2) need to be assessed. Process development only needs to be done once for an entirely new inactivation method. The result of the process development phase is a definition of the worst case scenario which is based on the worst possible combination of interfering factors. Therefore, all interfering factors first need to be identified during this step, although discovering all possible interfering factors is not always feasible. Using this worst case scenario, the validation process can be performed for new processes.

2nd step: Process validation

During the process validation, a reference load (=worst case scenario) is tested with biological indicators. The physical and chemical conditions are also monitored. Process validation needs to be done for new processes or first-time applications of a previously described (published) process. It is especially done when a new setup or a new instrument has been purchased.

3rd step: Routine monitoring

During routine monitoring of an inactivation method, a routine load is inactivated and biological and chemical indicators are used to assure functionality of the equipment and verify the physical and chemical conditions. Especially chemical indicators or physical sensors are used at every inactivation cycle. Inactivation of biological indicators needs to be verified at regular intervals.

3.2 Factors affecting the validation process

During all steps of process development and validation, the success of the inactivation method depends on whether **liquids or solids** are being inactivated. Therefore, different systems and different requirements are valid for solid and liquid wastes and these parameters need to be verified. The biological indicators and chemical indicators

Since microorganisms also differ in their inactivation resistance ([Figure 2](#)), it is necessary to keep in mind **what types of organisms** are being inactivated: **bacteria, spores, viruses or fungi**. The parameters used during process validation will differ depending on the organism. It is also important to keep in mind that published D-values are always organism and inactivation method specific and results are not transferable. Therefore, D-values must be determined for each species and at varying conditions considering interfering factors.

During all validation steps, the following treatment parameters may need to be monitored:

For most inactivation methods:

- Exposure time
- Volume of unit

For some inactivation methods:

- Concentration: important for chemical inactivation agents
- Temperature: important for chemical inactivation agents, but not so important for e.g. UV
- Pressure: important for gaseous agents
- Surface texture: important when sterilizing surfaces

4. Alternative inactivation methods

The selection of an appropriate alternative inactivation method may be determined by a number of criteria. These include:

1. Effectiveness of the alternative inactivation method
2. Applicability of the method to different organisms and media (solids or liquids)
3. Detoxification requirements and lack of toxic byproduct formation
4. Occupational and environmental hazards associated with the alternative inactivation method
5. Ease of handling and application
6. Operational costs

In this chapter, we provide a catalogue of different alternative inactivation methods considering the criteria mentioned above.

Table 1: Different inactivation methods and their mode of action, cost and advantage/disadvantage.

	Method	Active component	Spec-trum ⁸	Activity range	Mechanism	Known inter-fering factors	Combination options	costs	Comments Environmental/safety concerns
Physical approaches	Autoclave	Hot water vapor	Ba, Vi, Fu, Sp, *	100% rF	Denaturation	Not suitable for large volumes	not necessary	\$\$\$	High energy costs, not suitable for large volumes
	Ultraviolet Light (UV)	Energy-rich photons	Ba, Vi, Fu, Sp, *	250-300nm, 400J/m ²	Physical DNA damage	Turbidity (tailing effect)	all	\$\$	High energy costs, not effective against Listeria and Ameba
	Micro-/Ultra-Filtration	Sand filter, plastic filter membranes	Ba, Vi, Fu, Sp, *	NA	Mechanic separation	Turbidity, filters can clog	all	\$\$	Disposal of filter necessary, spectrum depends on pore size of filter. Spores are very small, only recommended when combined with other approaches, only small volumes
	Ultrasound	Low frequency Ultra-sound (20-35kHz)	Ba, Vi, Fu, Sp, *	500-5000 J/L	Cavitation, mechanic shearing forces on cells		all	\$\$	High energy costs, only for combined use

⁸ Abbreviations: Ba: bacteria, Vi: viruses, Sp: spores, Fu: fungi, *: reduced or no efficacy towards Prions

	Method	Active component	Spec-trum ⁸	Activity range	Mechanism	Known inter-fering factors	Combination options	costs	Comments Environmental/safety concerns
	Ionized radiation	β - and γ -radiation (⁶⁰ Co, ¹³⁷ Cs)	Ba, Vi, Fu, Sp, *	10 ⁴ J/m ²	Protein and DNA damage		NA	\$\$\$	Radiation emitters are very expensive and process generates radioactive waste
Chemical approaches	Ozone	O ₃ , H ₂ O ₂	Ba, Vi, Fu, Sp, *	0.1mg/L	Oxidation	Organic compounds	UV	\$\$\$	Requires a lot of energy, generates toxic compounds, formation of hydroxyl-radicals in water, no storage possible, residual O ₃ has to be removed
	Chlorine (halogens)	Cl ₂ , NaClO, Ca(ClO) ₂ , ClO ₂	Ba, Vi, Fu, Sp, *	1-5%	Oxidation	Organic and reactive compounds, light	filtration, Ultrasound, UV	\$	unstable, not biodegradable, corrosive
	Bases	NaOH	Ba, Vi, Fu, Sp, Prions	>1 Molar	Protein denaturation	Acids (neutralization)	heat, filtration, chem.	UV, \$	Not effective against Mycobacteria, low pollution potential, can be neutralized using acids, significant safety concern for user when handling product
	Acids	H ₂ SO ₄ , C ₆ H ₈ O ₇ ,	Ba, Vi, Fu, Sp, *	1 Molar	Protein denaturation	Bases (neutralization)	heat, filtration, chem.	UV, \$	Low pollution potential, can be neutralized using bases, significant safety concern for user when handling product
	Aldehyde	Formaldehyde, Glutaraldehyde, Glyoxal	Ba, Vi, Fu, Sp, *	0.5-5%	Protein denaturation	Development of resistance	heat, filtration, chem.	UV, \$	Stable, non-polluting, some compounds carcinogenic, irritating to mucosa
	Per-compounds	H ₂ O ₂ , Peracetic acid (PAA), Potassium-peroxomonosulfate	Ba, Vi, Fu, Sp, *	0.02-35%	Oxidation	Unstable compounds, activity reduced by catalases and peroxidases	heat, filtration	UV, \$	Biodegradable, broad spectrum of activity
	Phenol-derivatives	p-Chlor-m-Kresol, p-Chlor-m-xyleneol, o-Phenyl-phenol	Ba, Vi, Fu, *	0.1-5%	Protein denaturation	Organic compounds	Heat, filtration, chem	UV, \$	Safety hazard (neurotoxicity, carcinogenic), not biodegradable and toxic, not recommended.
	quaternary ammonium compounds	Benzalkonium chloride, Cetylpyridinium chloride, Didecyl-dimethyl-ammonium chloride	Ba, Vi, Fu, *	2-7%	Surface active, partially denaturing	Organic compounds, anionic soaps, CaCO ₃ , iron	UV filtration, chem. Ultrasound	\$	Not biodegradable, "esterquats" are more easily biodegradable, especially the fatty acids

	Method	Active component	Spec-trum ⁸	Activity range	Mechanism	Known inter-fering factors	Combination options	costs	Comments Environmental/safety concerns
Combined approaches	Advanced Oxidation	UV (182nm), Ozone, H ₂ O ₂ , catalysators	Ba, Vi, Fu, Sp, *		Cleavage of H ₂ O ₂ to hydroxyl-radicals	See individual approaches	Is combined		Superior to individual approaches, optimization of energy and chemical input, reduction of chlorine concentration possible
	Ultrasound chlorine	+ Ultrasound first or simultaneously	Ba, Vi, Sp		See individual approaches	See individual approaches	Is combined		Superior to individual approaches, optimization of energy and chemical input
	Ultrasound + UV	Ultrasound first for reduction of turbidity, UV penetration more effective	Ba, Vi, Fu, Sp		See individual approaches	See individual approaches	Is combined		Superior to individual approaches, optimization of energy and chemical input, tailing-effect reduced. UV dose or exposure time can be reduced
	Combination of different chemical approaches	Different combinations possible	Improved spectrum		See individual approaches	See individual approaches	Is combined		Additive, synergistic and antagonistic interactions possible, broader spectrum of activity towards different organisms
	UV + chemical approaches	UV first or simultaneously	Improved spectrum		See individual approaches	See individual approaches	Is combined		Superior to individual approaches, optimization of energy and chemical input
	Chemo-thermic disinfection	NaOH, heat and chlorine	Improved spectrum		See above (individual approaches)	See above (individual approaches)	Is combined		Chemical doses can be reduced by heat.

5. Conclusion

5.1 Minimal requirements

- Determination of a worst-case scenario for the unit to be inactivated (BI or suitable test organism with high inactivation resistance, interfering factors present in the unit).
- Process validation ([Figure 3](#), step 2) needs to be performed for all alternative inactivation methods and for new equipment using the worst-case scenario. Step 1 can be omitted for published killing kinetic curves for BI using known chemical indicators.
- If killing kinetic curves of an inactivation method are not linear, it has to be demonstrated that no organism of a 10^8 CFU/PFU suspension of a BI survives (this is just a suggestion...).
- If a waste contains several different microorganisms, inactivation data need to be obtained for each of the biological agents of concern using the identical conditions.

5.2 Critical factors for process validation

- Non-linear killing kinetic curves → SAL cannot be guaranteed
- Assessment of all possible interfering factors
- Availability of biological indicators for a given inactivation method
- Availability of chemical indicators for a given inactivation method

6. Examples for the validation of alternative inactivation methods

In order to outline in more detail the different steps of process validation and to highlight some challenges to be encountered when developing and validating a new alternative inactivation method, we provide experimental data for three alternative inactivation methods, two chemical methods:

- sodium hydroxide (NaOH, see Chapter 6.1),
- free chlorine as in sodium hypochlorite (Javel) or sodium dichloroisocyanurate (NaDCC, see Chapter 6.4),

and one physical method:

- Ultraviolet light (UVC_{254nm}, see Chapter 6.2),

and one combination of two methods (NaOH and UVC_{254nm}, see Chapter 6.3).

We outline some strategies for process development and validation of these three inactivation methods.

Nevertheless, if you plan to use one of the same inactivation methods, our data do not replace process development or validation in your laboratory. Interfering factors and test organisms may vary leading to a different worst-case scenario in your laboratory.

6.1 NaOH for the inactivation of bacteria

Sodium hydroxide (NaOH, base, see [Table 1](#)) was used to inactivate two different organisms: bacterial spores of *G. stearothermophilus* (GS) and vegetative cultures of *Staphylococcus aureus* (SA). *G. stearothermophilus* spores were chosen, because they are also used as biological indicators and are very difficult to inactivate by autoclaving.

6.1.1 Inactivation resistance and killing kinetic

In a first step of process development, it is essential to assess the killing kinetic and inactivation resistance of both the biological indicator and the test organism to demonstrate that the biological indicator is more resistant to the inactivation process than the test organism. In our example with NaOH as chemical disinfectant, we first assessed the inactivation resistance of GS spores and vegetative SA. Different concentrations of NaOH were incubated with GS spores or vegetative SA for different time intervals, i.e. 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60 and 120 minutes and tested for the number of surviving organisms. By 120 minutes, the number of surviving organisms of GS and SA was below the detection limit for the chosen sodium hydroxide concentrations ([Figure 4](#)). After incubation, the chemical disinfectant has to be neutralized in order to eliminate residual antimicrobial activity⁹. Since sodium hydroxide is a base, it can be neutralized with the acid HCl-HEPES. Neutralization (pH=7) was verified using pH-indicator strips.

For the validation of chemical disinfectants, a catalogue of potentially suitable neutralization media can be found in the corresponding European Norms (EN, see Chapter 7).

⁹ EN13727 – Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity in the medical area.

After neutralization, the inactivated bacterial suspension is serially diluted and plated on the appropriate medium and enumerated.

Using this approach, we found that GS spores and vegetative SA exhibited a different inactivation resistance to sodium hydroxide (Figure 4). GS spores were more resistant than vegetative SA. A 0.1M solution was sufficient to inactivate vegetative SA cultures, but the GS spores required at least a 4M solution and a longer incubation time to reach the desired SAL of 10^{-6} . Nevertheless, for the chosen organisms and within the tested range of sodium hydroxide concentrations, inactivation of GS and SA follows a linear killing kinetic. This means that an extrapolation is possible and the desired SAL of 10^{-6} is likely eventually reached. For GS this is after around 205 minutes and for SA around 130 minutes (Figure 4).

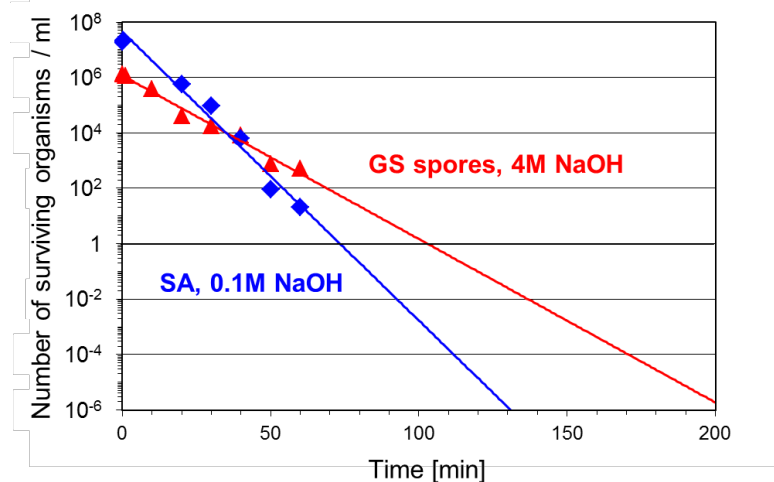


Figure 4: Linear killing kinetic.

Killing kinetic of the inactivation of *G. stearothermophilus* (GS, red) spores using 4M NaOH and vegetative *S. aureus* (SA, blue) using 0.1M NaOH. At the indicated time points a sample was removed and analysed for surviving bacterial entities. Plotting the number of surviving organisms in a logarithmic way, the killing kinetics are linear and can be extrapolated up to a SAL-value of 10^{-6} .

6.1.2 Interfering factors of sodium hydroxide inactivation

In a second step of process development, different interfering factors for the inactivation with NaOH were tested. The first one was inactivation **temperature** (Figure 5). Depending on where the inactivation is performed (at room temperature in a laboratory or in a colder room of 10°C or 15°C), other killing kinetic curves are monitored. In the case of 2M NaOH solution, we showed that decreasing temperatures reduce the efficacy of the disinfectant as chemical inactivation method against GS spores and much longer incubation times (>800 minutes compared to around 300 minutes) are required to achieve the desired SAL of 10^{-6} .

Organic load is another interfering factor. We simulated the presence of organic load in a test solution by the addition of bovine serum albumin (BSA) to a 2M NaOH solution (Figure 6). By the addition of 0.3% BSA, the incubation time is doubled (300 minutes compared to around 600 minutes), meaning that organic load also reduces the efficacy of sodium hydroxide inactivation.

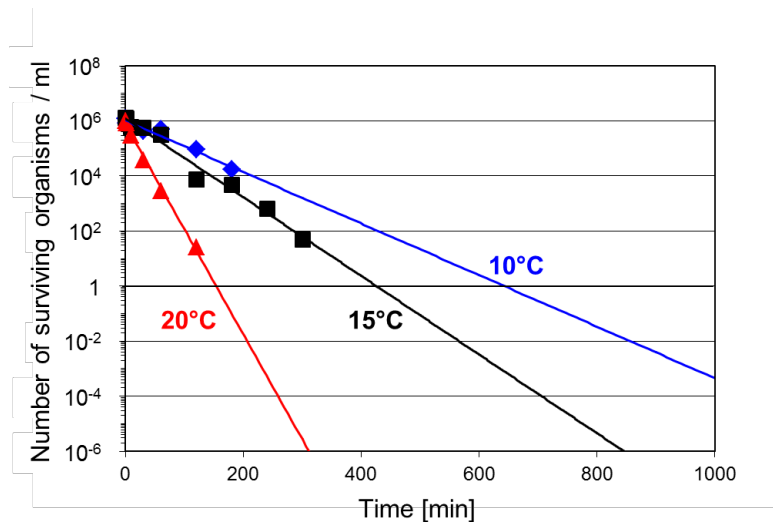


Figure 5: Influence factor "temperature".

Inactivation of GS spores using 2M NaOH at different temperatures as interfering factors. At the indicated time points a sample was removed and analysed for surviving bacterial entities. At the lower temperature of 15°C (black), an increased incubation time of just under threefold was needed to reach the SAL-value of 10^{-6} as compared to the higher temperature of 20°C (red).

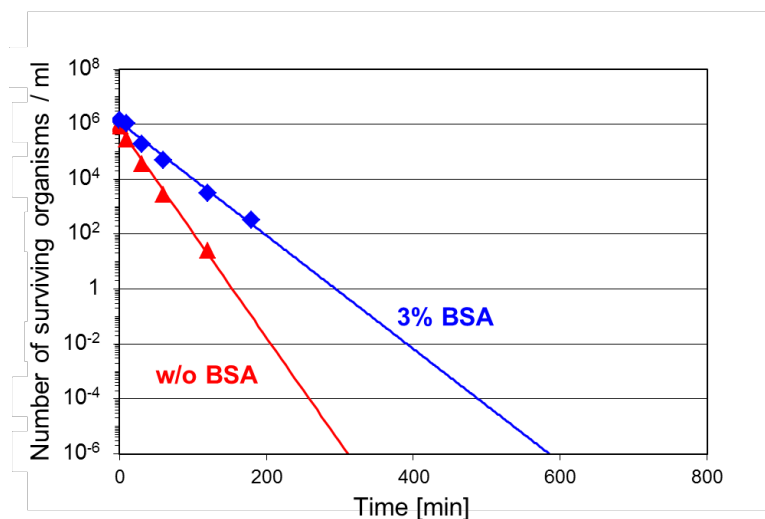


Figure 6: Influence factor "organic load".

Inactivation of GS spores using 2M NaOH (at 20°C) in the absence (red) or presence of organic load (3% BSA, blue). At the indicated time points a sample was removed and analysed for surviving bacterial entities. The reduction rate is reduced thus leading to a twofold increase in the required time to reach a SAL of 10^{-6} .

6.1.3 Testing a worst-case scenario using GS spores

A worst-case scenario most likely consists of a combination of interfering factors. Below, we provide an experimental example for the cumulative effect of interfering factors (Figure 7). We tested organic load combined with a reduced temperature (15°C). Combined interfering factors (0.3% BSA and reduced temperature) slow down the inactivation process even more than when only one interfering factor such as temperature is present.

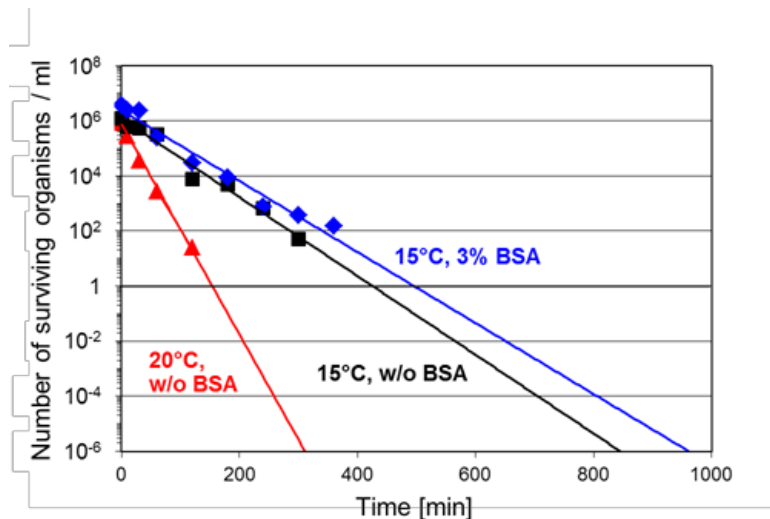


Figure 7: Worst-case.

Effect of combined interfering factors (lower temperature, 15°C and organic load, 3% BSA, blue) on the inactivation of GS spores with 2M sodium hydroxide (NaOH). At the indicated time points a sample was removed and analysed for surviving bacterial entities. The reduction rate is reduced thus leading to a 3.5-fold increase in the required time to reach a SAL of 10^{-6} (as compared with the higher temperature of 20°C and without organic load, red). Interestingly, the effect of organic load was less pronounced on the inactivation if it was performed at lower temperature of 15°C (blue vs black; as compared with blue vs red in Figure 6).

It is important to note that the interfering factors presented here are only examples of the most obvious interfering factors. Not all interfering factors have been determined for the inactivation of GS spores by sodium hydroxide. Therefore, a final worst-case scenario applicable for all lab situations cannot be defined yet based on these data.

6.2 Ultraviolet light (UVC_{254nm}) for the inactivation of GS spores

UV light (UVC_{254nm}) kills by inducing DNA damage. This DNA damage is different in vegetative bacteria compared to bacterial spores, thus affecting inactivation resistance. When vegetative bacteria are exposed to UV light, thymine dimers are formed between adjacent thymine molecules in the same DNA strand ultimately leading to DNA damage. This DNA damage is very difficult to repair, but some bacteria are capable of it, e.g. *Deinococcus radiodurans*. In contrast, bacterial spores form a photoproduct called 5-thymine-5,6-dihydrothymine (TDHT) upon UV light exposure and resistance to UV light has been shown to be linked to TDHT removal (Munakata and Rupert 1972) or the presence of DNA coating small, acid-soluble spore proteins, for example present in *B. subtilis* (Setlow 1992). Therefore, bacterial spores are far more resistant to UV light compared to vegetative bacteria.

We exposed GS spores to different doses of UV light and the number of surviving GS spores was monitored. When combining the measurements of the number of surviving organisms and UV dose, there are two different extrapolation possibilities resulting in different reduction rates (Figure 8). Compared to sodium hydroxide inactivation, the UVC_{254nm} killing kinetic curve is not linear.

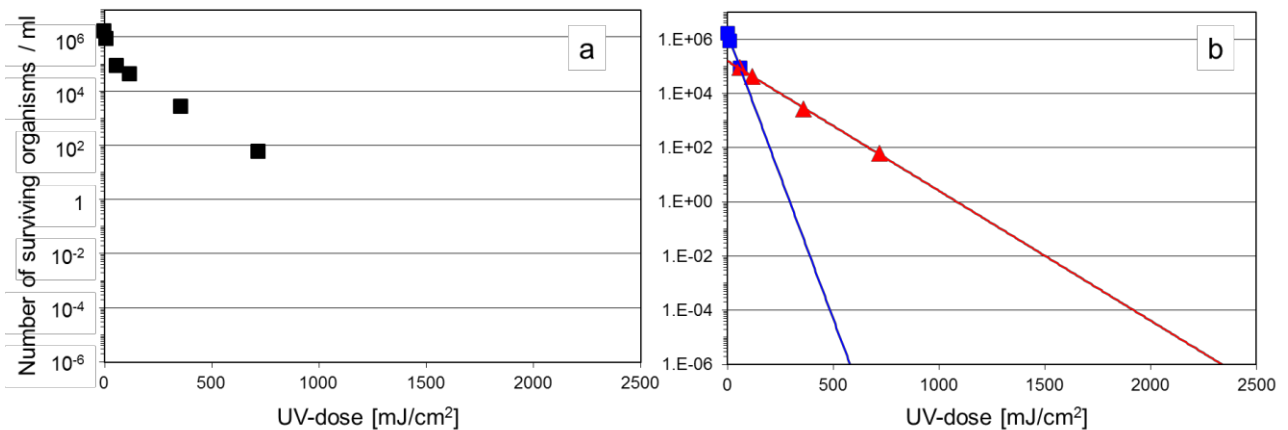


Figure 8: Ambiguous killing curve.

Inactivation of GS spores using different doses of UVC_{254nm}. At the indicated time points a sample was removed and analysed for surviving bacterial entities resulting in an ambiguous killing kinetic (a). There are two possibilities to extrapolate the killing kinetic curve (b; blue and red) resulting in different reduction rates.

6.3 Combined approach: NaOH and UVC_{254nm}

Another promising alternative inactivation approach is the combination of two different inactivation methods (Table 1). Especially radiation-based inactivation approaches are easily combined with e.g. chemical inactivation agents. Therefore, we also tested the two former inactivation methods, NaOH and UVC_{254nm}, together (Figure 9). The combination of a 0.1M NaOH solution with 0.2mW/cm² UVC_{254nm} resulted in a much steeper killing kinetic curve demonstrating that the combination of methods can be very effective.

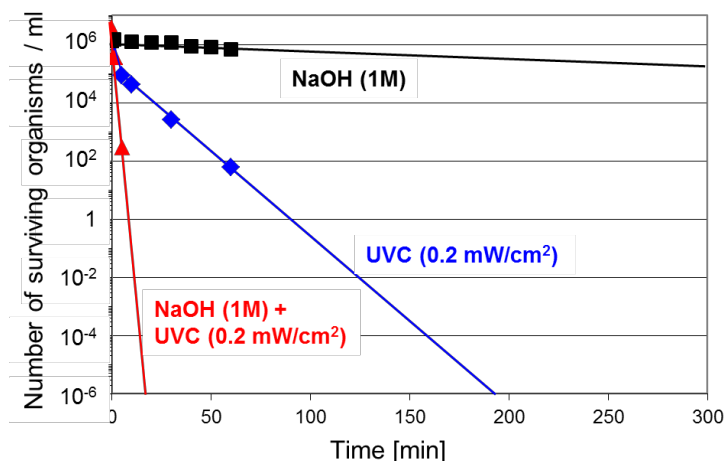


Figure 9: Increase of efficacy by combined methods.

Killing kinetic curves of GS spores using UVC_{254nm} combined with NaOH (red) compared to both inactivation methods alone (black and blue). At the indicated time points a sample was removed and analysed for surviving bacterial entities. The resulting killing kinetic curve is much steeper for the combined method compared to UVC alone (blue), i.e. the combined treatment is more effective thus needing an incubation time 10-times shorter to reach the SAL-value of 10⁻⁶.

6.4 Chlorine to inactivate viruses and bacteriophages

6.4.1 Inactivation resistance and killing kinetic

The third tested inactivation method was based on the action of free chlorine ions, as in sodium dichloroisocyanurate (NaDCC, Haztab, Guest Medical). Other widely used products that act via free chlorine are sodium hypochlorite (household bleach or Javel), chlorine dioxide and chloramines-T. Sodium hypochlorite was compared with NaDCC solutions and performed equally well for the inactivation of bacteriophages. Nevertheless, the advantage of NaDCC tablets over hypochlorite solutions is that they can be stored for a longer time without losing activity. However, once in solution, NaDCC loses free chlorine faster (Coates 1985). We confirmed this by measuring the amount of free available chlorine in NaDCC and sodium hypochlorite solutions. Chlorine products have a broad spectrum of antimicrobial activity, but the exact mechanism by which free chlorine destroys microorganisms has not been elucidated in detail. It may result from a number of factors including: oxidation of sulfhydryl enzymes and amino acids, ring chlorination of amino acids, loss of intracellular contents, inhibition of protein synthesis, oxidation of respiratory components, decreased adenosine triphosphate production, breaks in DNA and depressed DNA synthesis (Dychdala 2001).

The aim of these experiments was to test the efficacy of virus inactivation using a chlorine releasing product. Since experiments with tissue cultures and viruses (e.g. adenovirus) are very laborious and quantification relies on quantitative PCR, we chose the *E. coli* bacteriophage MS2 as a surrogate test organism. Bacteriophage MS2 was ideal, because it is easy to propagate, handle and count, and it exposes a high inactivation resistance to chemical disinfectants compared to other viruses and bacteriophages (Lehmann and Bansemir 1987). Nevertheless, bacterial spores were shown to be more resistant to chlorine inactivation than MS2 bacteriophage (Clevenger et al. 2007; Oie et al. 2011).

The efficacy of NaDCC was tested using a similar experimental setup compared to GS spore inactivation using sodium hydroxide. NaDCC solutions were incubated with MS2 bacteriophage suspensions for 5 to 120 minutes and neutralized using a sodium-thiosulphate based neutralization medium (Woolwine and Gerberding 1995). The number of plaque forming units (PFU) was enumerated on an *E. coli* soft agar overlay at different time intervals after addition of NaDCC. First, different concentrations of NaDCC were tested (Figure 10).

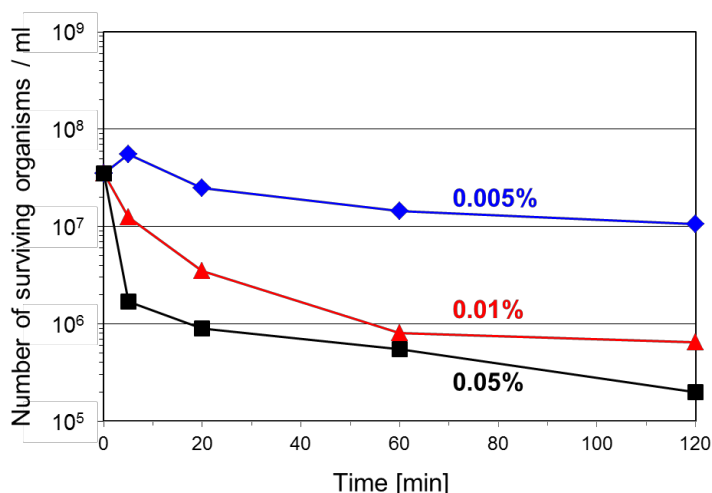


Figure 10: Non-linear or ambiguous killing kinetic.

Killing kinetic of MS2 bacteriophage in response to three different concentrations of sodium dichloroisocyanurate (NaDCC, 0.05% black, 0.01% red, 0.005% blue). Higher concentrations reduced the number of surviving organisms below the detection limit (2.5×10^5 PFU/ml). At the indicated time points a sample was removed and analysed for surviving phage entities resulting in a non-linear or ambiguous killing kinetic and no sufficient inactivation.

From these experiments, we conclude that chlorine inactivation of bacteriophage MS2 does not follow a linear killing kinetic, meaning a linear extrapolation is not possible. Therefore, reaching the desired SAL of 10^{-6} cannot be guaranteed for NaDCC, but to achieve satisfactory results, a much higher concentration of NaDCC needs to be used. This, however, can also be problematic especially considering the release of chlorinated products into the environment, which are highly corrosive and not biodegradable.

6.4.2 Interfering factors of chlorine inactivation

Four potential interfering factors of chlorine inactivation were tested. The first one was **organic load** – again simulated by the addition of BSA (Figure 11). Two different concentrations were tested (0.03% and 0.3%). We found that an addition of 0.3% BSA reduces the efficacy of chlorine for bacteriophage inactivation drastically resulting in nearly flat killing kinetic curves (=no killing). Therefore, the addition of 0.3% BSA represents a worst-case scenario in terms of organic load. As a reference, we determined the expected organic load in a typical laboratory waste originating from tissue culture using a Bradford Assay. We found that this typical laboratory waste contains an organic load of around 0.2-0.3% protein. Nevertheless, when validating chlorine releasing products, we recommend either to assume a worst-case scenario (=0.3% organic load) or to measure the organic load of a typical unit to be inactivated using a Bradford or Lowry Assay.

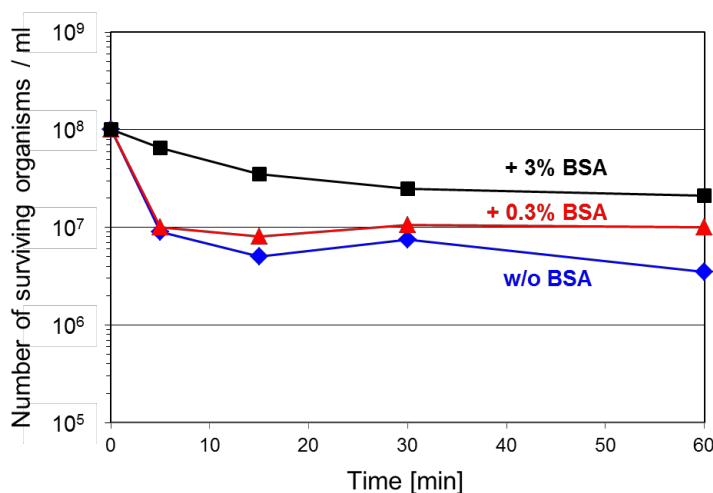


Figure 11: Influence factor "organic load".

Inactivation of MS2 bacteriophage with sodium dichloroisocyanurate (NaDCC 0.05%) in the absence (blue) or presence of organic load (0.3% red and 3% BSA black). At the indicated time points a sample was removed and analysed for surviving phage entities resulting in a non-linear or ambiguous killing kinetic and no sufficient inactivation. The presence of organic load reduced the efficacy of chlorine inactivation even more, especially at 3% BSA.

We then tested the inactivation **temperature** as second interfering factor. We defined that at our laboratory a room temperature of 18°C would represent lowest possible temperature. Comparing room temperatures of 18°C and 25°C, we did not observe any difference in inactivation efficacy of NaDCC and bacteriophage MS2 (data not shown). In a next step, we experimentally showed that a critical interfering factor for NaDCC is **age** (alias **shelf life**). We tested four differentially aged NaDCC solutions (fresh, 2, 7 and 11 week old solutions; Figure 12). While the 7-week old solution still slightly reduced the titer of an MS2 bacteriophage solution, an 11-week old solution did not show any inactivation. We therefore recommend using solutions which are not older than 3-4 weeks and to test for the amount of free available chlorine (FAC) in the solution before and after the experiment using e.g. the Dimethyl-4-phenylenediamine (DPD)-method (see 5.4.3).

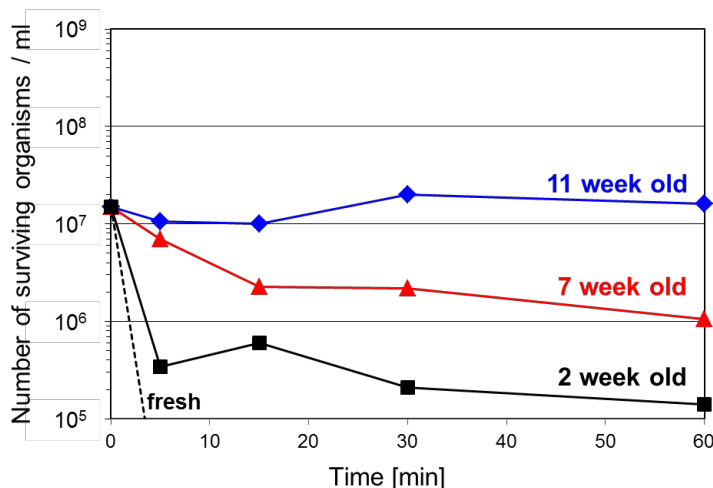


Figure 12: Influence factor "age of solution/shelf life".

Inactivation of MS2 bacteriophage with 0.1% NaDCC of different age (fresh: black stippled; 2, 7 and 11 week old: black, red and blue solid, respectively). At the indicated time points a sample was removed and analysed for surviving phage entities. With the exception of the freshly prepared solution, all older NaDCC resulted in an insufficient inactivation exhibiting non-linear or ambiguous killing kinetics.

At the same time, we tested **light exposure** of these differentially aged solutions. We had stored an aliquot of each solution either exposed to light or in the dark (protected with foil). We found that in the containers used (50ml Falcon tubes), light exposure did not affect the disinfection efficacy of NaDCC (data not shown). Further, we tested whether light protected solutions of NaDCC still lost the same amount of free available chlorine over time and found that they did (data not shown). However, this might be different for other inactivation agents acting via free chlorine. For example, Rutala et al. (1998) found that storage of sodium hypochlorite in brown closed bottles significantly reduced free chlorine loss compared to solutions stored in clear containers. Another factor affecting free available chlorine loss over time is the concentration at which a solution is stored (Rutala et al. 1998). More concentrated solutions (1%) of sodium hypochlorite lose chlorine faster than more diluted ones (0.1%). Therefore, we recommend storing solutions at higher concentrations.

It is important to note that the interfering factors presented here are only examples of the most obvious interfering factors. Not all interfering factors have been determined for the inactivation of bacteriophages by free chlorine based products. Therefore, a final worst-case scenario applicable for all lab situations cannot be defined yet based on these data.

6.4.3 Testing of a worst case scenario using MS2 Bacteriophages

A worst-case scenario was defined as using a 6 week old NaDCC solution that contains organic load (0.3% BSA). We could clearly show that the efficiency of inactivation of MS2 bacteriophages for the old NaDCC solution were lower in the presence of organic load when compared to a freshly made NaDCC solution without organic load (Figure 13).

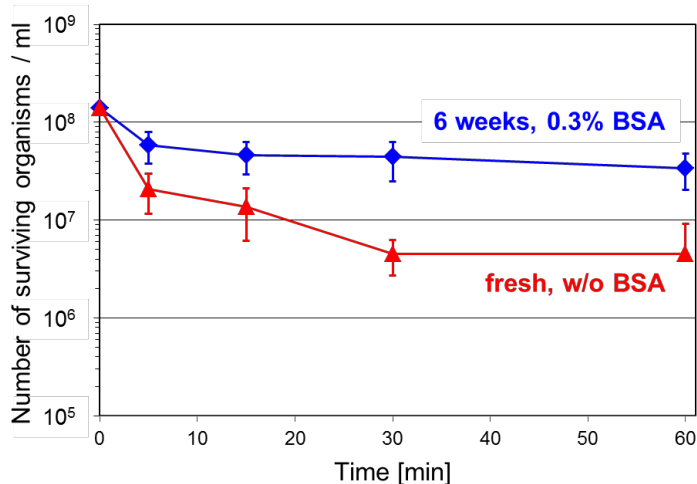


Figure 13: worst-case.

Inactivation of MS2 bacteriophage with 0.05% NaDCC freshly prepared without organic load ("best case") compared to 0.05% NaDCC 6 week old in the presence of 0.3% BSA. At the indicated time points a sample was removed and analysed for surviving phage entities. A more substantial loss in inactivation efficacy for the aged NaDCC solution with organic load (blue) compared to the "best case" (red) was observed as in the case of only organic loaded NaDCC (Figure 11, red curve). However, both cases NaDCC resulted in an insufficient inactivation exhibiting non-linear or ambiguous killing kinetics.

6.4.4 Testing of the worst-case scenario using Adenovirus in a cell culture system

The same worst-case scenario as described in 5.4.3 was used in an adenovirus (Ad5) infection experiment. HEK293 cells were infected with Ad5, which were differentially inactivated using fresh or NaDCC solutions aged in the presence of an organic load at different concentrations. The free chlorine activity was neutralized by cleaning the solution over a Sepharose column (Sephadex LH20; Figure 14). The increase in absolute numbers measured by qPCR of adenovirus genomes for each condition in the supernatant of the cell culture well indicates the presence of infectious adenovirus. For the experiment, we used different times of exposure [5 / 15 / 30 / 60 min], different NaDCC concentrations [1% / 0.1% / 0.01% / 0.001%], fresh vs. aged NaDCC solutions and presence or absence of organic load (0.3% BSA). In addition, several controls were added to test the functionality of the bioassay (Figure 15).

As shown in Figures 15, freshly made solutions are sufficient to completely inactivate the adenovirus at all tested concentrations, while NaDCC solutions aged in the presence of an organic load exhibited a significantly lower inactivation efficacy.

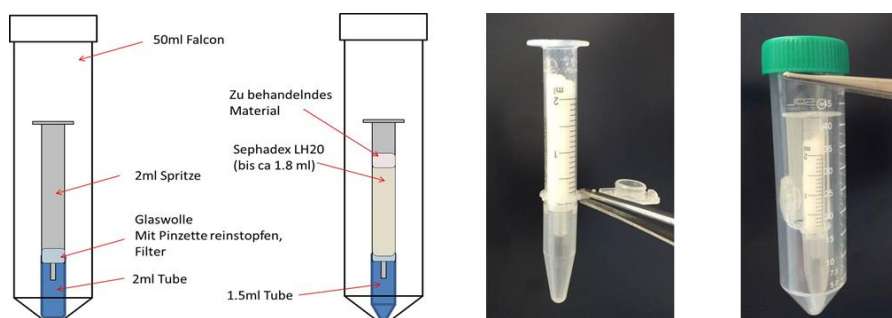


Figure 14: Neutralisation of the toxic effect of the inactivation solution using a Sepharose column.

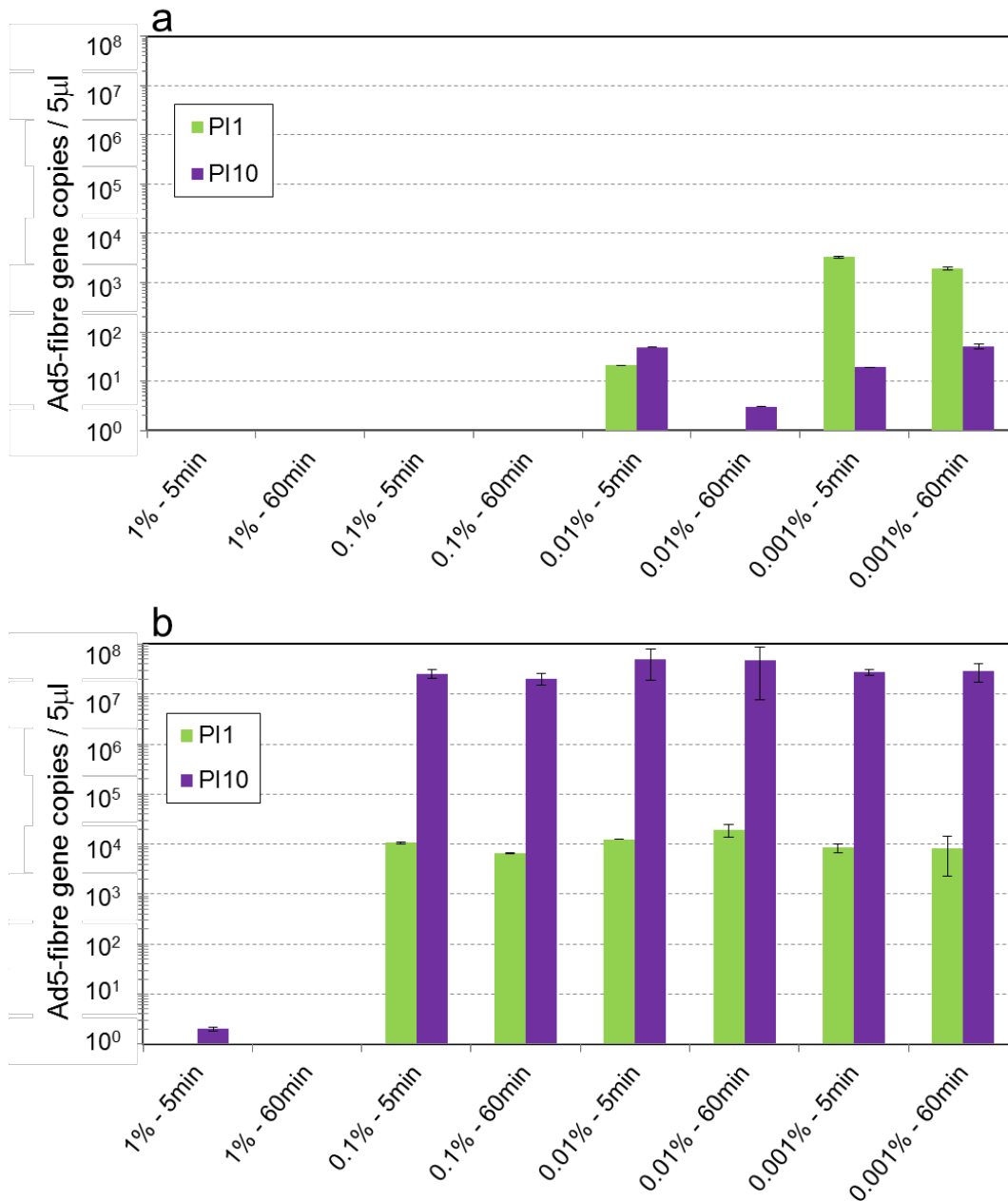


Figure 15: Worst-case.

Inactivation of Ad5 with (a) freshly made NaDCC solutions of different concentrations (1%, 0.1%, 0.01%, 0.001%) without additional organic load in comparison with (b) NaDCC solutions of different concentrations (1%, 0.1%, 0.01%, 0.001%) aged 36 days in the presence of organic load (0.3% BSA). At the indicated time points a sample was removed and analysed for Ad5 infectivity. Green and violet bars indicate the total amount of Ad5 genomes 1 day (PI1) and 10 days after infection (PI10), respectively. In the worst-case scenario (b), except for the most concentrated solution (1% NaDCC), all concentrations failed to completely inactivate Ad5 exposed to the respective solution whereas in the "best case" (a) all NaDCC concentrations were sufficient to completely inactivate Ad5.

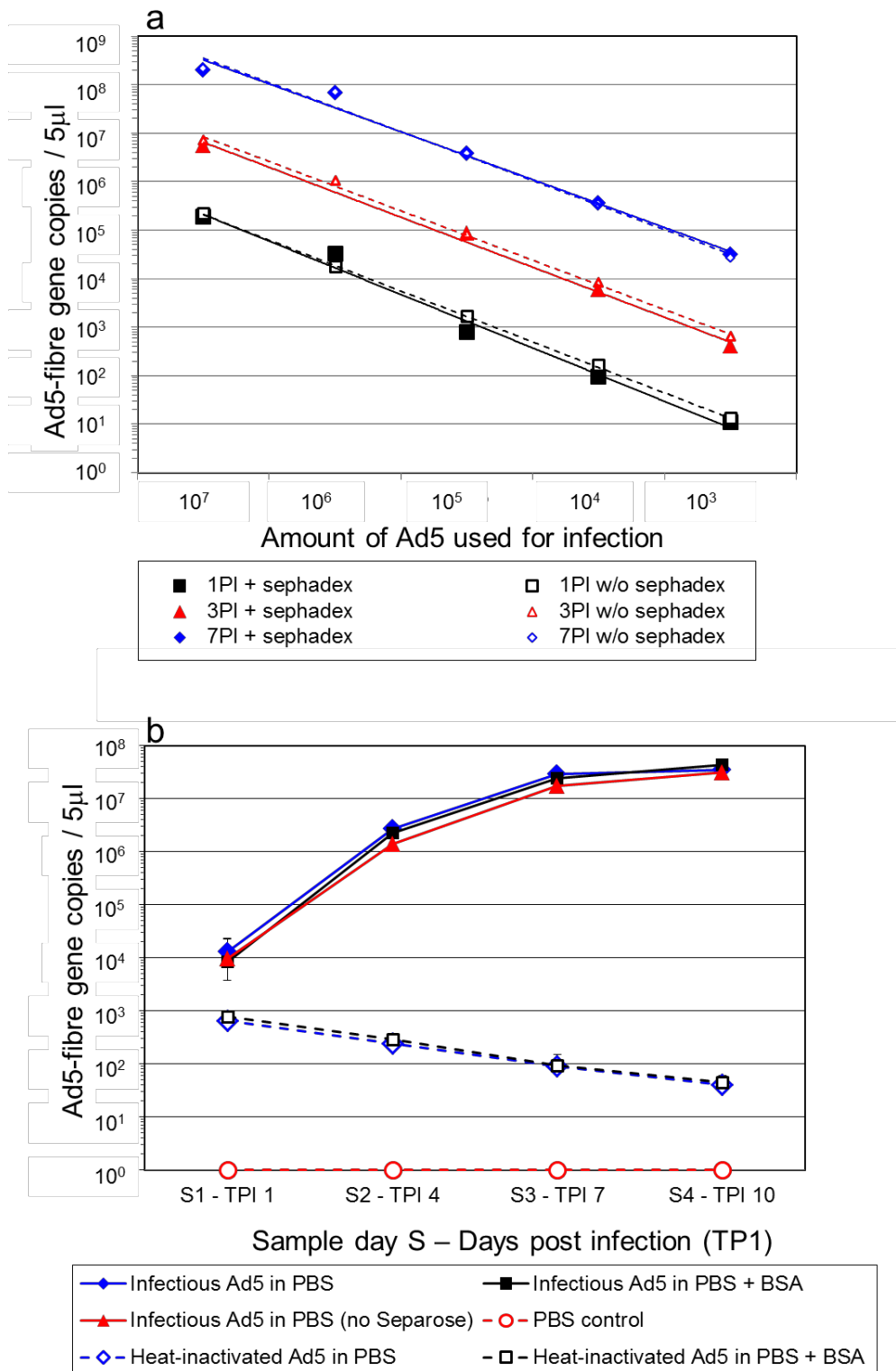


Figure 16: Controls.

(a) To test the linearity of the Ad5 reproduction in the infectivity assay (i.e. Ad5 genome copies in the supernatant) with or without prior Sepharose cleaning, different amounts of Ad5 (10^3 to 10^7) were added to infect HEK293 cells and the Ad5-genome copies in the cell culture supernatant were measured at days 1, 3 and 7 post infection.

(b) To test the functionality of the infectivity assay using infectious Ad5 in PBS (with or without additional organic load, 0.3% BSA) as well as heat-inactivated Ad5 samples or PBS itself were added to HEK293 and the cell culture supernatant was analysed for Ad5 genome copies.

6.5 Testing chemical indicators for UVC_{254nm} and chlorine inactivation

6.5.1 Potential for using erythrosine B as chemical indicator for UVC_{254nm} inactivation

UVC_{254nm} dosage is continuously measured with a radiometer. This radiometer represents an important physical sensor and should be used at every inactivation cycle using UVC_{254nm}. However, the measured dosage may not be the same in the entire load. Therefore, the use of additional indicators is recommended. Erythrosine B was tested as chemical indicator for UVC_{254nm} inactivation. Erythrosine B is traditionally used in the food industry as food coloring, and its absorbance peaks at 525nm (Figure 17 a). This absorbance decreases largely following an exponential function to around 700 mJ/cm² (Figure 17 b; Putt et al. 2012). With higher dosages than 700 mJ/cm², the decrease in percentage of remaining absorbance is not linear anymore. During inactivation, cuvettes containing erythrosine B are placed within the unit. After inactivation with a specific UV dosage, the absorbance at 525 nm is measured using absorptiometry. The color change from red to colorless can also be seen by the naked eye (Figure 17 c).

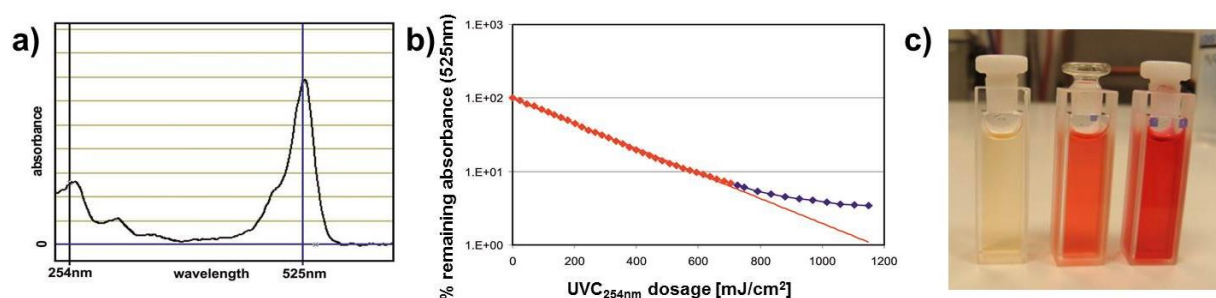


Figure 17: (a) Absorbance spectrum of erythrosine B reaching a maximum at 525nm. (b) Percent of remaining absorbance of erythrosine B exposed to increasing dosages of UVC_{254nm}. The absorbance drops exponentially until to approximately 700 mJ/cm². (c) Color change of erythrosine B upon exposure to UVC_{254nm}.

A major advantage of this system is that different cuvettes can be placed at different positions within a unit yielding values for the emitted UVC_{254nm} dosage at different locations in varying distances to the UVC_{254nm} source. In conclusion, we found that erythrosine B has potential to be used as chemical indicator for UVC_{254nm} inactivation, but still needs to be verified further on a larger scale more closely resembling the laboratory setting (e.g. testing with larger volumes or liquids and solids).

6.5.2 Potential for using DPD as chemical indicator for chlorine inactivation

We evaluated the potential of DPD (N, N-diethyl-p-phenylenediamine sulfate) as chemical indicator to measure the amount of free available chlorine (FAC) in NaDCC or sodium hypochlorite solutions. The amount of FAC is the amount of chlorine which is not bound to nitrogenous compounds (=organic load) and which is able to react with microorganisms. FAC is the determining factor for inactivation. Chlorine reacts with DPD (Oxycon DPD, Figure 18 a) in the presence of a suitable buffer (Oxycon Start, Figure 18 a) to produce a pink color (Figure 18 b, c, d). Depending on the concentration of FAC in a solution, the pink color is more intense, which can then be measured at 520 nm, using an LED-based spectrophotometer (Figure 18 e) yielding the amount of FAC in mg/L. Besides the amount of FAC, the DPD method can also be used to determine the amounts of combined chlorine (i.e. the amount of chlorine bound to a nitrogenous compound) and total chlorine using the Oxycon 2 buffer.

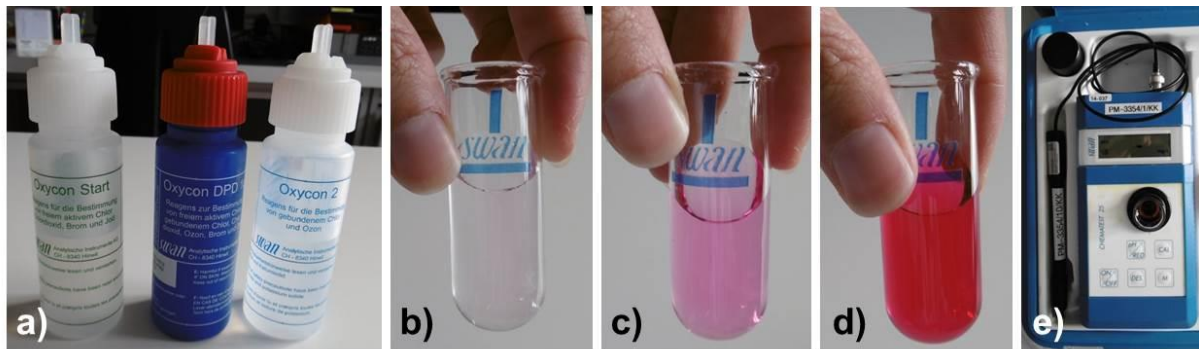


Figure 18: (a) Reagents used for chlorine measurements – Oxycon Start: buffer, Oxycon DPD: DPD for FAC measurements, Oxycon 2: for total and bound chlorine measurements (b) chlorine solution containing small amounts of FAC (<1000 mg/L in a 1% solution) (c) chlorine solution containing intermediate amounts of FAC (4000 mg/L) (d) chlorine solution containing high amounts of FAC (>6000 mg/L) (e) spectrophotometer for FAC measurements.

It has been shown previously that chlorine solutions cannot be stored indefinitely (Rutala et al. 1998), but some compounds lose FAC faster than others. In order to address this question in our NaDCC (Haztab) solutions, we monitored the concentration of FAC over time (for 36 days). We demonstrate that NaDCC solutions lose FAC over time and interestingly, the decline is nearly linear (Figure 19). We additionally monitored the concentration of FAC in NaDCC solutions in the presence of an organic load (0.3% BSA). This simulates the scenario where an inactivation solution is added to a container prior to the input of contaminated liquid waste. With the contaminated liquid waste, the organic load is introduced, and therefore the chlorine solution ages with the organic load. When aged together, a much faster (4x) decrease in FAC can be observed compared to just aging without organic load (Figure 19).

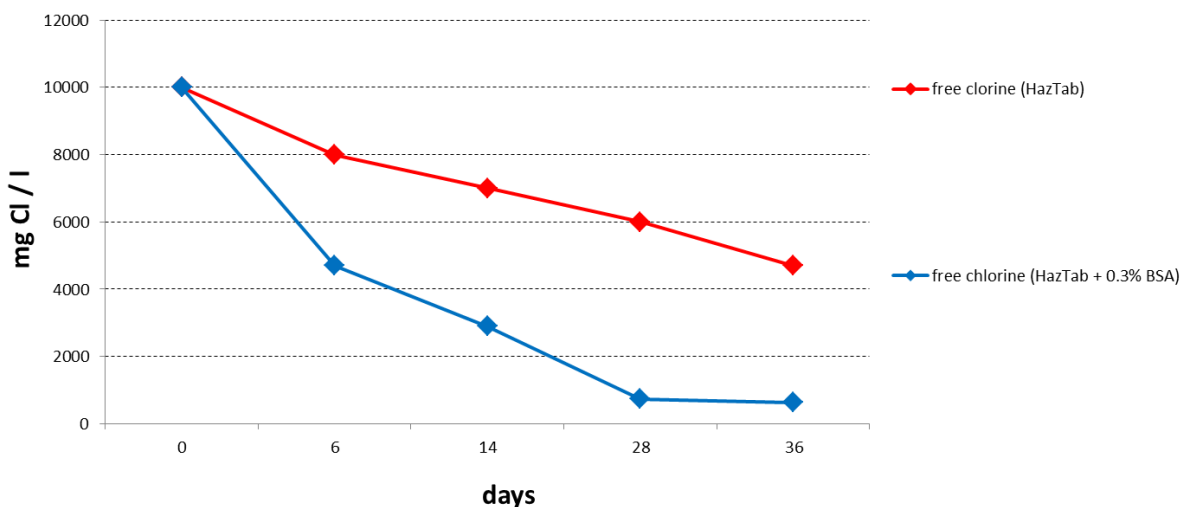


Figure 19: Process monitoring.

Free available chlorine in NaDCC (HazTab) solutions over time. The red line represents aging of a NaDCC solution without organic load added. The blue line indicates aging of a NaDCC solution in the presence of organic load (0.3% BSA).

NaDCC used here is only one example of chlorine solutions, normal household bleach (aka Javel, sodium hypochlorite) is frequently used in laboratories for the inactivation of contaminated liquid waste. To compare NaDCC with sodium hypochlorite solutions, we evaluated the amount of FAC and their inactivation efficacy. We measured equal starting concentrations of FAC in NaDCC and sodium hypochlorite solutions, but did not observe a decay of FAC (aged sodium hypochlorite solutions still had the same concentration of FAC after 36 days, data not shown). Nevertheless, they differed slightly in their inactivation efficacy (Figure 20).

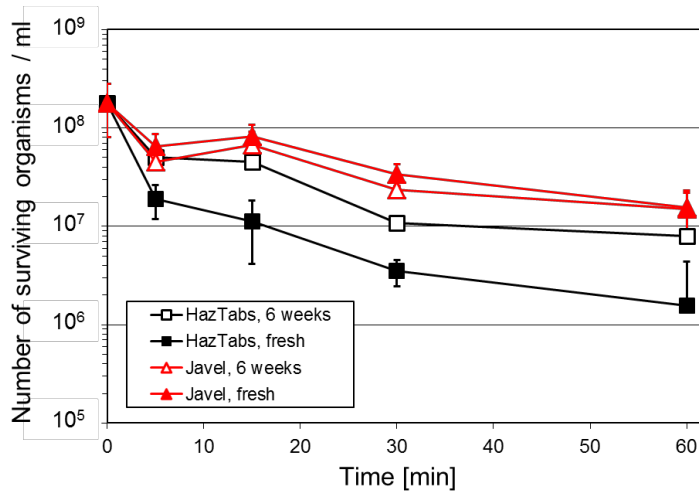


Figure 20: Inactivation efficiency of a NaDCC solution and sodium hypochlorite solution (Axxel Javel: purchased from pharmacy) both diluted to a working concentration of 0.01%.

In conclusion, the DPD method can be used to quantify the amount of FAC in a solution. It is recommended to measure the amount of FAC in a solution prior to inactivation. When diluting chlorine solutions, the final concentration can be adjusted with the measurements obtained for FAC. Nevertheless, a disadvantage of the DPD method is that swimming pools contain far less FAC and thus, chlorine solutions need to be diluted. Depending on the amount of FAC, this can be up to 10^{-5} . Creating a dilution series can introduce errors in FAC measurements and subsequent calculation of FAC amounts.

7. Resources for process validation protocols

There are European Norms (EN), i.e. certified standard procedures which can assist during the validation process. They provide detailed protocols and represent helpful guidelines for the validation of different chemical disinfection methods and different organisms. They can be purchased for around CHF 150.00 from the publisher "Beuth" (www.beuth.de).

List of potentially useful European norms:

EN12740 – Biotechnology – Laboratories for research, development and analysis - Guidance for handling, inactivating and testing of waste (EN 12740:1999)

EN 11138 – Sterilization of health care products – Biological indicators – Part1: General requirements (ISO 11138-1:2006)

EN 11140 – Sterilization of health care products – Chemical indicators – Part 1: General requirements (ISO 11140-1:2005)

EN 1040 – Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative suspension test for the evaluation of basic bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics-Test method and requirements (phase1)

EN 1275 – Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative suspension test for the evaluation of basic fungicidal or basic yeasticidal activity of chemical disinfectants and antiseptics – Test method and requirements (phase 1)

EN 1650 – Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative suspension test for the evaluation of fungicidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in food, industrial, domestic and institutional areas – Test method and requirements (phase 2, step 1)

EN 1656 – Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in veterinary field-Test method and requirements (phase 2, step 1)

EN 1657 – Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative suspension test for the evaluation of fungicidal or yeasticidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in veterinary area – Test method and requirements (phase 2, step 1)

EN13610 – Chemical disinfectants – Quantitative suspension test for the evaluation of virucidal activity against bacteriophages of chemical disinfectants used in food and industrial areas (phase 2/step 1)¹⁰

EN 13624 – Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative suspension test for the evaluation of fungicidal activity of chemical disinfectants for instruments used in medical area – Test method requirements (phase 2, step 1)

EN 13697 – Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative non-porous surface test for the evaluation of bactericidal and/or fungicidal activity of chemical disinfectants used in food and industrial, domestic and institutional areas – Test method and requirements without mechanical action(phase 2,step 2)

EN 13704 – Chemical disinfectants – Quantitative suspension test for the evaluation of sporidicidal activity of chemical disinfectants used in food, industrial, domestic and institutional areas – Test method and requirements (phase 2, step 1)

¹⁰ This EN was used as a guideline for the validation of Javelle as chemical disinfectant.

EN13727 – Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity in the medical area (phase 2/step 1)¹¹

EN 14204 – Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative suspension test for the evaluation of mycobactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in veterinary area – Test method and requirements (phase 2, step 1)

EN 14347 – Chemical disinfectants and antiseptics – Basic sporicidal activity - Test method and requirements (phase 1)

EN 14348 – Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative suspension test for the evaluation of mycobactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics in the medical area including instrument disinfectants – Test method and requirements (phase 2, step 1)

EN14476 – Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative suspension test for the evaluation of virucidal activity in the medical area – Test methods and requirements (phase 2/step 1)

EN 14562 – Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative carrier test for the evaluation of fungicidal or yeasticidal activity for instruments used in medical area – Test method requirements (phase 2, step 2)

EN 14885 – Chemical disinfectants and antiseptics – Application of European Standards for chemical disinfectants and antiseptics

¹¹ This EN was used as a guideline for the validation of NaOH as chemical disinfectant.

8. FAQs

Q: If data concerning killing kinetic and reduction rate of my desired inactivation method with my desired organism is already published, do I have to redo these experiments?

A: As long as the same organisms, the same experimental conditions and the same interfering factors were present in the published dataset, the process development step can be skipped and directly proceeded to the process validation step to demonstrate validity at your laboratory.

Q: What do I have to do, if the killing kinetic of my desired inactivation method is not linear?

A: In this case, a much higher concentration of disinfectant and/or a much longer incubation time need to be followed in order to assure sterility. A SAL of 10^{-6} can never be guaranteed in this case, but absence of viable microorganisms needs to be demonstrated using biological indicators and validated assuming a worst-case scenario.

Q: How do I determine the organic load in my liquid waste, which I want to inactivate?

A: A Bradford Assay can be done to determine the protein quantity in your waste. A typical tissue culture waste contains around 0.2-0.3% protein.

Q: What is important when choosing biological indicators?

A: First you have to show that the biological indicator is more resistant than the organisms you want to inactivate. We would recommend using bacterial spores and comparing these results with the organisms most likely present in your inactivation material. This will show whether you can use commercially available biological indicators.

Q: What do I do, if there are no biological indicators for my desired inactivation method?

A: You cannot use this method.

Q: What do I do, if there are no chemical indicators for my desired inactivation method?

A: This is definitely not an ideal situation. Either you have to show that it is a validated product stored under the correct condition (always containing a concentration of XYZ). In addition, you have to use biological indicators at every inactivation cycle.

Q: How long do process development and process validation (as shown in Figure 2) take?

A: You should anticipate 6 months of experimental work to assess killing kinetic, test the interfering factors and test the chemical and biological indicators. Make sure to start with the latter two, so you do not waste time with the first two and then figure out that there are no chemical/biological indicators for your desired inactivation method.

9. References

- Clevenger, T., et al. (2007). "Comparison of the inactivation of *Bacillus subtilis* spores and MS2 bacteriophage by MIOX, ClorTec and hypochlorite." J Appl Microbiol **103**(6): 2285-2290.
- Coates, D. (1985). "A comparison of sodium hypochlorite and sodium dichloroisocyanurate products." J Hosp Infect **6**(1): 31-40.
- Cremieux, A. (1986). "Factors affecting the bactericidal action of disinfectants. Implications for selection of resistant strains." Drugs Exp Clin Res **12**(11): 899-903.
- Dychdala, G. R. (2001). Chlorine and chlorine compounds. Disinfection, sterilization and antisepsis in healthcare. S. S. Block. Philadelphia, Williams & Wilkins: 135-157.
- Favero, M. S. and W. W. Bond (1991). Chemical disinfection of medical surgical material. Philadelphia, PA, Lea & Febiger.
- Johnston, M. D., et al. (2000). "One explanation for the variability of the bacterial suspension test." J Appl Microbiol **88**(2): 237-242.
- Kramer, A. and O. Assadian (2008). Wallhäussers Praxis der Sterilisation, Desinfektion, Antiseptik und Konservierung. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- Lambert, R. J. and M. D. Johnston (2000). "Disinfection kinetics: a new hypothesis and model for the tailing of log-survivor/time curves." J Appl Microbiol **88**(5): 907-913.
- Lehmann, L. H. and K. P. Bansemir (1987). "Bakteriophagen als Testviren für die Desinfektionsmittel-Prüfung - 1. Mitteilung: Quantitativer Suspensionstest mit Desinfektionswirkstoffen." Hygiene + Medizin **12**: 9-12.
- Munakata, N. and C. S. Rupert (1972). "Genetically controlled removal of "spore photoproduct" from deoxyribonucleic acid of ultraviolet-irradiated *Bacillus subtilis* spores." J Bacteriol **111**(1): 192-198.
- Oie, S., et al. (2011). "Disinfection methods for spores of *Bacillus atrophaeus*, *B. anthracis*, *Clostridium tetani*, *C. botulinum* and *C. difficile*." Biol Pharm Bull **34**(8): 1325-1329.
- Putt, K. S., et al. (2012). "The use of chromophore and fluorophore degradation to quantitate UV dose: FD&C dyes as chemical indicators for UV sterilization." J Microbiol Methods **91**(2): 215-221.
- Rutala, W. A., et al. (1998). "Stability and bactericidal activity of chlorine solutions." Infect Control Hosp Epidemiol **19**(5): 323-327.
- Setlow, P. (1992). "I will survive: protecting and repairing spore DNA." J Bacteriol **174**(9): 2737-2741.
- Sharp, J. (1995). "What do we mean by "sterility"?" PDA J Pharm Sci Technol **49**(2): 90-92.
- von Woedtke, T. and A. Kramer (2008). "The limits of sterility assurance." GMS Krankenhhyg Interdiszip **3**(3).
- Woolwine, J. D. and J. L. Gerberding (1995). "Effect of testing method on apparent activities of antiviral disinfectants and antiseptics." Antimicrob Agents Chemother **39**(4): 921-923.