



IN ZUSAMMEN-
ARBEIT MIT

Systec



OMNILAB
WISSEN KOMPAKT

Richtig und sicher Autoklavieren

FLEXIBEL. VERLÄSSLICH. PERSÖNLICH.

Einfach, sicher, genau, reproduzierbar und validierbar sterilisieren

Der Sterilisationsprozess in einem Autoklaven (Dampfsterilisator) kann sehr diffizil sein. Werden zum Beispiel Flüssigkeiten oder Festkörper (Instrumente, Glaswaren, Filter, Textilien) für die spätere Verwendung im Labor sterilisiert, muss der Sterilisationsprozess ein reproduzierbar steriles Produkt sicherstellen. Die Produkte können nicht auf Sterilität geprüft werden, da sie durch die Prüfung kontaminiert werden und somit nicht mehr im Labor verwendbar sind. Die Validierung von Dampfsterilisationsprozessen ist somit ein zunehmend wichtiges Thema, um nachweislich reproduzierbare Ergebnisse sicherzustellen. Des Weiteren sind bei der Dampfsterilisation generell, insbesondere aber bei der Sterilisation von Flüssigkeiten, Sicherheitsaspekte zu beachten. In der Regel wird bei einer Temperatur von 121 °C sterilisiert. Dies entspricht einem Dampfdruck von ca. 2 bar. Diese hohen Temperaturen mit dem damit verbundenen Druck können ein erhebliches Gefahrenpotenzial für den Anwender bergen, wenn der Dampfsterilisationsprozess fehlerhaft ausgelegt ist beziehungsweise fehlerhaft ausgeführt wird.

Sterilisieren von Flüssigkeiten und flüssigen Abfällen in Flaschen

Das Sterilisieren von Flüssigkeiten ist eine der anspruchsvollsten Aufgaben im Labor. Die Sterilisationsprozesse können mitunter sehr lange dauern, Flaschen müssen offen oder zumindest angelüftet sein, ein Teil der Flüssigkeit verkocht, Flüssigkeiten können überkochen und Flaschen können sogar bersten. Vorab ist zu klären, ob die Flüssigkeiten in den Flaschen überhaupt die gewünschte Sterilisationstemperatur erreichen und wann diese nach Beendigung des Sterilisationsprozesses sicher dem Autoklaven entnommen werden können.

Der Sterilisationsprozess für Flüssigkeiten besteht aus drei Phasen:

1. Aufheizphase und Ausgleichzeit (H)
2. Sterilisierphase, z.B. 121 °C für 20 Minuten (S)
3. Kühlphase auf eine sichere Entnahmetemperatur (C)

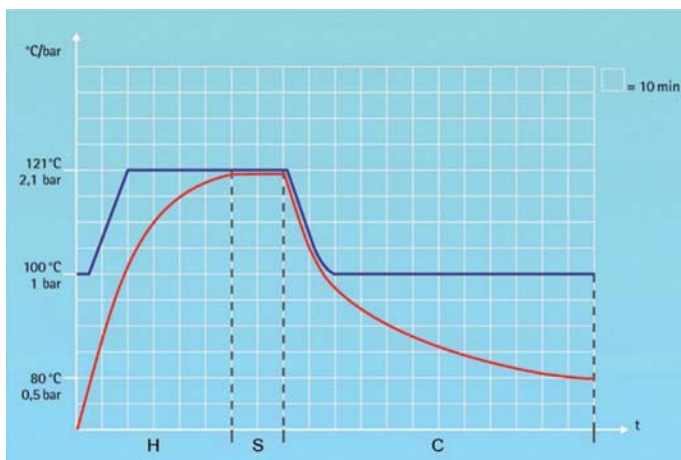


Abb. 1: Phasen des Sterilisationsprozesses
Blaue Linie: Temperatur in der Kammer (Druckbehälter) des Autoklaven
Rote Linie: Temperatur gemessen in der Flüssigkeit

Abb. 1 veranschaulicht die einzelnen Phasen des Sterilisationsprozesses. Die blaue Linie stellt die Temperatur im Druckbehälter des Autoklaven dar, die rote Linie die in der Flüssigkeit gemessene Temperatur. Es ist deutlich zu sehen,

dass im Druckbehälter des Autoklaven die gewünschte Temperatur von 121 °C sehr schnell erreicht wird, während die Flüssigkeiten in den Flaschen deutlich länger benötigen, um die Sterilisationstemperatur zu erreichen. Die Wärmeenergie des Dampfes wird in der Aufheizzeit durch Kondensation des Dampfes auf die Flaschen übertragen. Dieser Kondensationsprozess und der damit verbundene Wärmeübergang benötigt einige Zeit, was den Zeitunterschied zwischen dem bloßen Aufheizen des Druckbehälters und dem Aufheizen der Flüssigkeit selber erklärt. Die Zeit, die benötigt wird, gleiche Temperaturen im Druckbehälter des Autoklaven und in den Flüssigkeiten zu erreichen, wird als Ausgleichzeit bezeichnet.

Viele heute im Labor verwendeten Autoklaven sind nach wie vor nicht mit einer Temperaturmessung in einem Referenzgefäß ausgestattet. Die genaue Temperatur der zu sterilisierenden Flüssigkeit wird also nicht erfasst und kann somit auch nicht zur Regelung des Sterilisationsprozesses herangezogen werden. Diese Autoklaven starten die Sterilisierzeit, wenn die gewünschte Temperatur im Druckbehälter des Autoklaven erreicht ist. Die Ausgleichzeit wird hierbei nicht berücksichtigt. Die Flüssigkeiten erreichen demnach nie die Sterilisationstemperatur von z.B. 121 °C. Die biologische Wirksamkeit des Sterilisationsprozesses ist nicht mehr gegeben. Je nach Resistenz der zu inaktivierenden Mikroorganismen werden diese nur teilweise oder gar nicht inaktiviert.

Temperaturmessung in einem Referenzgefäß

Durch Messung der Temperatur in einem Referenzgefäß mittels eines Temperatursensors kann die genaue Temperatur der zu sterilisierenden Flüssigkeit ermittelt und zur Regelung des Sterilisationsprozesses herangezogen werden.

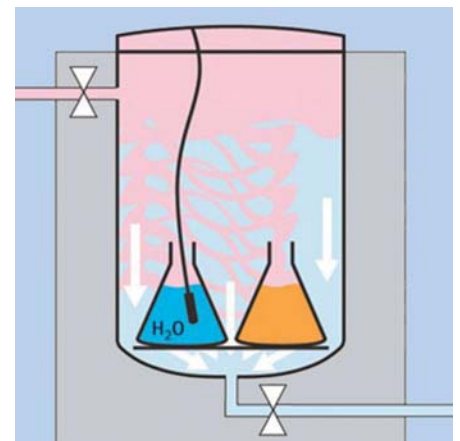


Abb. 2:
Temperaturmessung
in einem Referenzgefäß

Die Sterilisierzeit startet erst dann, wenn die gewünschte Sterilisationstemperatur in der Flüssigkeit erreicht ist.

Das Referenzgefäß wird hierfür mit Wasser gefüllt. Wichtig ist dabei, dass Größe und Füllstand des Referenzgefäßes dem des größten Gefäßes inkl. der zu sterilisierenden Flüssigkeit entsprechen.

Sichere Entnahmetemperatur

Der Temperatursensor wird nicht nur zur Sicherstellung der Sterilisationstemperatur benötigt, sondern auch um eine sichere Entnahmetemperatur nach erfolgter Sterilisation zu gewährleisten. In einem Autoklaven werden Flüssigkeiten deutlich über den normalen Siedepunkt (100 °C) aufgeheizt. Durch die in die Flüssigkeit eingetragene Wärme, verbunden mit dem dazugehörigen Überdruck, können erhebliche Gefahren für den Bediener entstehen. So kann es zum Beispiel zu einem Siedeverzug kommen. Dabei fängt die Flüssigkeit

beim Öffnen des Autoklaven spontan an zu kochen. Dieses spontane Kochen erzeugt eine Druckwelle aus Dampf und heißer Flüssigkeit, die ähnlich einem Geysir aus den Gefäßen schießt. 1 Liter Wasser erzeugt 1000 Liter Dampf. Aufgrund dieses erheblichen Gefährdungspotenzials unterliegen Dampfsterilisatoren, die für das Sterilisieren von Flüssigkeiten eingesetzt werden, entsprechenden Regularien. Die DIN EN 61010-2-040 fordert, dass Dampfsterilisatoren für die Sterilisation von Flüssigkeiten mit Sicherheitseinrichtungen ausgestattet sein müssen, die ein Öffnen des Autoklaven verhindern, solange die Flüssigkeiten nicht auf eine für den Anwender sichere Entnahmetemperatur abgekühlt sind. Eine sichere Entnahmetemperatur definiert die Norm mit 20 K unterhalb des Siedepunktes von Wasser bei atmosphärischem Umgebungsdruck. Dies entspricht einer sicheren Entnahmetemperatur von 80 °C. Moderne Autoklaven sind mit einer temperatur- und druckabhängigen Türverriegelung ausgestattet. Diese verhindert ein Öffnen des Autoklaven, solange der Druckbehälter unter Druck steht und solange die in der Flüssigkeit gemessene Temperatur oberhalb der geforderten 80 °C liegt.

Das Kühlen der Flüssigkeiten auf die sichere Entnahmetemperatur kann sehr lange dauern. Eine häufig verwendete Größe für Autoklaven in Laboren ist ein Gerät mit einem Fassungsvermögen des Druckbehälters von ca. 150 Litern. Wird ein solcher Autoklav voll mit Flaschen beladen, in denen sich die zu sterilisierende Flüssigkeit befindet, kann ein gesamter Sterilisationszyklus bis zu 10 Stunden dauern. Das bedeutet, dass an einem Arbeitstag nicht mal ein Sterilisationsprozess vollständig durchgeführt werden kann. Daher empfiehlt es sich, den Autoklaven mit einem Rückkühlsystem auszustatten, wodurch die gesamte Chargenzeit erheblich reduziert und weitere Gefahren und Nachteile bei der Sterilisation von Flüssigkeiten beseitigt werden.

Schnellrückkühlung - Produktivität und Sicherheit maximieren

Bei Rückkühlssystemen für Autoklaven lassen sich grundsätzlich zwei Arten von Kühlsystemen unterscheiden.

1. Kühlung durch Evaporation - durch Kochen der Flüssigkeit in der Kühlphase.
2. Kühlung durch Radiation - durch Abstrahlung der Wärme aus der Flüssigkeit. Ein Kochen der Flüssigkeit findet bei diesem Kühlsystem nicht statt.

Die Kühlung durch Evaporation ist die am häufigsten verwendete Art der Kühlung in einem Autoklaven. Dies können z.B. sein:

- Selbstabkühlung durch langsamen Dampfabblass,
- Ventilationskühlung - kalte Raumluft wird mittels eines Ventilators von außen an den Druckbehälter geblasen,
- Wasserkühlung ohne Stützdruck.

Alle oben genannten Arten der Kühlung durch Evaporation haben gravierende Nachteile bei der Sterilisation von Flüssigkeiten und können, wenn der Sterilisationsprozess nicht richtig durchgeführt wird, ein erhebliches Gefahrenpotenzial beinhalten, da diese Art der Kühlung ein Kochen der zu kühlenden Flüssigkeit erfordert:

1. Durch das Kochen der Flüssigkeit in der Kühlphase geht ein Teil der Flüssigkeit verloren. Der zu erwartende Flüssigkeitsverlust liegt in der Regel zwischen 3 und 10 %, kann aber deutlich höher ausfallen, je nach Inhaltsstoffen in der Flüssigkeit. Insbesondere wenn der Proteingehalt in der Flüssigkeit hoch ist, neigt diese zu stärkerem Kochen, was wiederum den Flüssigkeitsverlust steigert lässt.

2. Da die Flüssigkeiten zur Abkühlung kochen müssen, ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass sie überkochen. Um dies zu verhindern, werden die Flaschen nur zu einem Drittel oder halb gefüllt. Zum einen ist dies ein erheblicher Produktivitätsverlust, da 50 bis 70 % der verfügbaren Kapazität (in den Flaschen) verloren geht. Zum anderen kann das Überkochen nicht zuverlässig verhindert werden. Kochen die Flüssigkeiten über, muss der Autoklav aufwendig gereinigt werden. Gelangen z. B. Agar-basierte Flüssigkeiten in das Rohrsystem (Abfluss) des Autoklaven und werden dort fest, verstopft dieses. Eine Reinigung des Rohrsystems ist dann oft nur sehr aufwendig durch den Hersteller möglich.
3. Ein Kochen der Flüssigkeit ist nur aus offenen Flaschen heraus möglich. Daher müssen die Flaschen offen oder zumindest angelüftet (Deckel wird leicht geöffnet) sein. Wird das Anlüften der Flaschen vergessen oder nicht richtig durchgeführt, kann die enthaltene Flüssigkeit in der Rückkühlphase nicht kochen und kühlt somit nicht ab. Hat das Referenzgefäß die Kühltemperatur von 80 °C erreicht und erlaubt somit das Öffnen des Autoklaven, sind die fest verschlossenen Flaschen noch immer auf Sterilisationstemperatur mit dem dazugehörigen Druck, z.B. 121 °C, 2 bar. Dies stellt ein erhebliches Risiko dar, da diese Flaschen beim Entladen des Autoklaven explodieren können und die darin enthaltene Flüssigkeit, ähnlich dem Siedeverzug, spontan verdampfen kann.

Es empfiehlt sich daher, bei der Beschaffung eines Autoklaven genau zu definieren, für welche Applikationen dieser genutzt werden und wie dieser in Bezug auf Produktivität und Sicherheit ausgestattet sein soll.

Die Kühlung durch Radiation hat erhebliche Vorteile gegenüber der Kühlung durch Evaporation. Bei der Schnellrückkühlung mit Stützdruck, wird der Druckbehälter durch außenliegende Kühlschlangen vollflächig mit kaltem Wasser gekühlt. Bevor die Kühlung nach der Sterilisierphase aktiviert wird, wird der im Druckbehälter befindliche Dampf durch steril-filtrierte Druckluft ersetzt. Die Druckluft verhindert in der Kühlphase zuverlässig das Kochen der Flüssigkeit. Die Wärme wird aus der Flüssigkeit durch Radiation an die kalten Wandungen des Druckbehälters abgegeben und die Flüssigkeit somit abgekühlt.

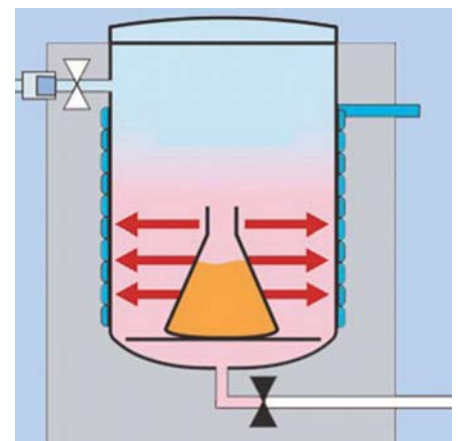


Abb. 3:
Kühlung mit Stützdruck

Die Schnellrückkühlung mit Stützdruck erlaubt einen erheblichen Produktivitätsgewinn, da die Prozesszeiten im Vergleich zur Selbstabkühlung deutlich verringert werden. Während die Selbstabkühlung bis zu 10 Stunden für einen gesamten Autoklavier-Vorgang benötigt, kann die Rückkühlzeit mit der Schnellrückkühlung mit Stützdruck, um bis zu 60 % reduziert werden.

Darüber hinaus werden alle bei der Evaporationskühlung beschriebenen Gefahren und Nachteile (Siedeverzug, Flüssigkeitsverlust, Überkochen, keine Kühlung bei fest verschlossenen Flaschen) zuverlässig beseitigt, da kein Kochen der Flüssigkeit mehr stattfindet. Bei dieser Art der Kühlung dürfen die Flaschen bis zum maximalen Füllstand gefüllt werden (Produktivitätsgewinn um 50 bis 70 %) und es können fest verschlossene Flaschen verwendet werden.

Prozesszeiten weiter optimieren

Moderne Autoklaven bieten die Möglichkeit, die Kühlung von Flüssigkeiten in Modulen weiter zu optimieren. Dies erhöht die Produktivität zusätzlich, hat aber auch Einfluss auf die Qualität der zu sterilisierenden Flüssigkeiten. Viele Flüssigkeiten enthalten Inhaltsstoffe, die nicht sehr hitzestabil sind. Die Flüssigkeiten sollen zwar sterilisiert werden, die Zeit, in der die Flüssigkeiten der Hitzeeinwirkung ausgesetzt werden, soll aber so gering wie möglich gehalten werden, um hitzlabile Inhaltsstoffe nicht negativ zu beeinflussen.

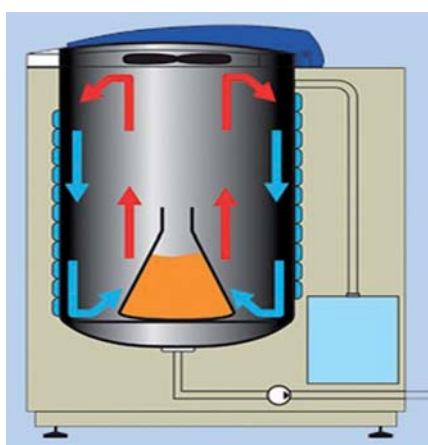


Abb. 4:
Kühlung mit Radialventilator

Modul 1 - Radialventilator

Der Radialventilator erzeugt während der Kühlphase einen Luftstrom im Druckbehälter des Autoklaven. Der Luftstrom zwingt die Wärme aus den Flaschen an die durch die Schnellrückkühlung mit Stützdruck gekühlten Wandungen des Druckbehälters. Durch dieses Verfahren kann die Rückkühlzeit verglichen mit der Selbstabkühlung um bis zu 70 % reduziert werden.

Modul 2 - Ultracooler

Der Ultracooler ist ein zusätzlicher wassergekühlter Wärmetauscher, der direkt im Druckbehälter des Autoklaven integriert ist. Hierdurch kann die Wärme von den Flaschen direkt dort entnommen werden, wo sie sich auch befindet - im Druckbehälter. Durch den deutlich verbesserten Wärmeübergang kann die Rückkühlzeit im Vergleich zur Selbstabkühlung um bis zu 90 % reduziert werden.

Hinweis: Da Radialventilator und Ultracooler im inneren des Druckbehälters installiert werden, ist darauf zu achten, dass diese den verfügbaren Nutzraum des Autoklaven nicht reduzieren.

Sterilisieren von Festkörpern und Abfällen in Vernichtungsbeuteln

Bei der Sterilisation von Festkörpern (z.B. Instrumente, leere Glaswaren, Pipetten-Spitzen in Boxen, Filter und Textilien) sowie bei der Vernichtung von Abfällen in Vernichtungsbeuteln, ist darauf zu achten, dass eine Dampf-

sphäre genau da entsteht, wo sie auch benötigt wird. Nämlich am und im zu sterilisierenden Produkt. Viele Autoklaven entfernen Luft nicht zuverlässig aus dem Autoklaven und aus dem Produkt. Dort wo Luft im Autoklaven und im Produkt verbleibt, gibt es keine sterilisierende Wirkung, da nur Dampf die nötige Wärmeenergie transportiert, die Mikroorganismen zuverlässig inaktiviert.

Ineffektive Entlüftung

Abb. 5 und 6 zeigen die ineffektive Entlüftung am Beispiel einer Box mit Pipetten-Spitzen und am Beispiel eines Vernichtungsbeutelns. Wird der Autoklav einfach aufgeheizt, wird Luft aus diesem verdrängt und im Druckbehälter des Autoklaven entsteht eine Dampf-atmosphäre. Im Produkt selbst verbleibt die Luft jedoch. Dadurch wird verhindert, dass der Dampf dort eindringen kann, wo seine Wärmeenergie für den Sterilisationsprozess benötigt wird.

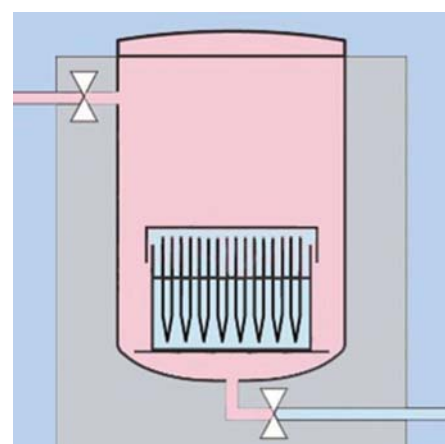


Abb. 5:
Ineffektive Entlüftung
am Beispiel von
Pipetten-Spitzen

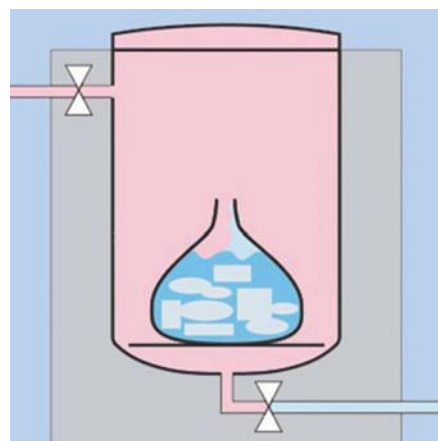


Abb. 6:
Ineffektive Entlüftung
am Beispiel eines
Vernichtungsbeutelns

Luft beinhaltet bei gleicher Temperatur wie Dampf (z.B. 121 °C) ein Vielfaches weniger Wärmeenergie. Für Produkte, die nicht in einer Dampf-atmosphäre sterilisiert werden können, gibt es zwar Heißluftsterilisatoren, diese sterilisieren aber bei höheren Temperaturen (180 bis 250 °C) und für eine sehr viel längere Zeit (bis zu mehreren Stunden Sterilisationszeit). Eine sterilisierende Wirkung von Luft bei typischerweise in Dampfsterilisatoren verwendeten Temperaturen von 121 bis 134 °C und einer Sterilisationszeit von 3 bis 20 Minuten ist also praktisch nicht gegeben.

Effektive Entlüftung

Für die vollständige und reproduzierbare Luftentfernung aus dem Autoklaven und dem zu sterilisierenden Produkt muss ein fraktioniertes Vorvakuum verwendet werden. Hierfür wird der Autoklav mit einem Vakuum-System ausge-

stattet. In der Aufheizphase erfolgen Vakuum-Zyklen, mit denen die Luft aktiv entfernt wird, gefolgt von Dampfstößen. In der Regel wird ein dreifach fraktioniertes Vorvakuum verwendet. Je nach Produkt können auch mehr Fraktionen notwendig sein.

Trocknung für Festkörper - Superdry

Zur Trocknung werden Festkörper, wie Instrumente oder leere Glaswaren, normalerweise nach dem Sterilisationsprozess in einen Trocknungsschrank gegeben. Moderne Autoklaven erlauben das Sterilisieren und Trocknen von Festkörpern in einem Prozess. Ein weiteres Handling des Sterilisationsguts mit Rekontaminations-Gefahr ist nicht notwendig.

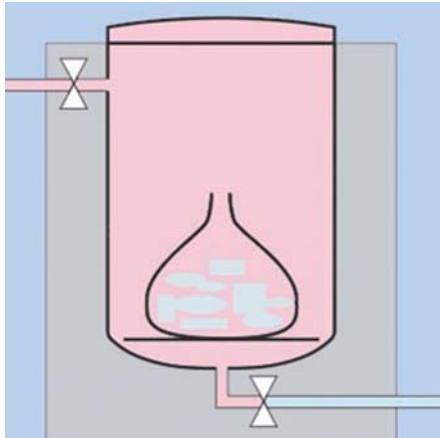


Abb. 7:
Vollständige Entlüftung

Sterilisation von biologischen Gefahrstoffen

Die Sterilisation von biologischen Gefahrstoffen ist eine besondere Herausforderung. Während der Aufheizphase wird die sich im Autoklaven befindliche Luft durch Dampf ersetzt. Hierfür wird die Luft aus dem Autoklaven verdrängt und in den Raum abgegeben. Die TRBA 100 (Technische Regeln für biologische Arbeitsstoffe) fordert, dass Prozessabluft aus einem Autoklaven in Laboren ab der Sicherheitsstufe S2 behandelt werden muss, da diese Abluft durch Mikroorganismen aus dem zu sterilisierenden Produkt kontaminiert sein könnte. Hierfür ist ein geeignetes Verfahren zu verwenden. Für Autoklaven ist dies in der Regel die Filtration. Dabei wird der Autoklav mit einem Abluftfilter ausgestattet. Sämtliche aus dem Autoklaven verdrängte Luft wird über den Filter geleitet und Mikroorganismen bleiben zurück. Der Filter wird während des Sterilisationsprozesses „in-line“ mit sterilisiert werden, um die darin zurückgehaltenen Mikroorganismen zu inaktivieren.

Die TRBA 100 behandelt nur die aus dem Autoklaven abgegebene Abluft, nicht aber das anfallende Kondensat. Während des Sterilisationsprozesses kondensiert Dampf auf dem Produkt und wird somit wieder zu Wasser (Kondensat). Dieses Wasser kann potenziell ebenfalls durch Mikroorganismen kontaminiert sein. Daher muss das Kondensat während des Sterilisationsprozesses im Autoklaven verbleiben und ebenfalls „in-line“ sterilisiert werden, bevor es nach erfolgreicher Sterilisation in den Abfluss gegeben wird.

Qualifizierung und Validierung

Bei der Qualifizierung wird geprüft, ob ein Gerät für seine vorgesehene Verwendung geeignet ist und ob ein Prozess, z.B. ein Sterilisationsprozess, unter Berücksichtigung des zu sterilisierenden Produktes mit dem immer gleichen (reproduzierbaren) Ergebnis, einem sterilen Produkt, durchgeführt werden kann. Grundsätzlich gliedert sich der Qualifizierungsprozess in drei Teile:

1. IQ - Installation Qualifizierung
Prüfung, ob ein Gerät entsprechend den Spezifikationen hergestellt und installiert wurde.
2. OQ - Funktions-Qualifizierung (Operational Qualification)
Prüfung, ob ein Gerät grundsätzlich entsprechend den Spezifikationen funktioniert.
3. PQ - Leistungs-Qualifizierung (Performance Qualification)
Prüfung, ob ein Gerät mit dem zu verarbeitenden Produkt entsprechend den Spezifikationen funktioniert.

Ziel der Qualifizierung und Validierung ist der dokumentierte Nachweis, dass ein Gerät für seine vorgesehene Nutzung geeignet ist.

Die sterilisierende Wirkung eines Dampfsterilisationsprozesses wird hierbei in der OQ (leere Kammer) und PQ (mit Produkt) durch externe Messmittel für Temperatur und Druck sowie unter Zuhilfenahme von Bioindikatoren, basierend auf *Bacillus Stearothermophilus*, nachgewiesen. Während externe Messmittel für Temperatur und Druck den Nachweis bringen, dass die Steuerung des Autoklaven verlässliche Werte anzeigt und den Sterilisationsprozess innerhalb der zu definierenden Toleranzen durchführt, bringen Bioindikatoren den biologischen Wirksamkeitsnachweis.

Für die Platzierung der Bioindikatoren ist zu bestimmen, in welchen Bereichen des Sterilisiergutes es am schwierigsten ist, die biologische Wirksamkeit zu erreichen. Genau in diesen Bereichen müssen Bioindikatoren platziert werden, um sozusagen den „worst case“ abzudecken. Alle Schritte einer IQ, OQ und PQ sind detailliert zu dokumentieren. In jedem Fall ist für die Durchführung einer IQ, OQ und PQ eine enge Abstimmung zwischen Anwender und Hersteller notwendig.



Gerne stehen wir Ihnen auch persönlich für eine Beratung zur Verfügung.

Berlin
Telefon 034299 / 7 56 91

Hamburg
Telefon 040 / 65 90 95-0

Magdeburg
Telefon 039292 / 6 56 51

Rostock
Telefon 038455 / 2 23 29

Braunschweig
Telefon 05308 / 69 38 64

Hannover / Gehrden
Telefon 05108 / 91 67-0

München
Telefon 089 / 6 92 57 18

Ruhrgebiet
Telefon 01520 / 1 66 98 00

Essen
Telefon 0201 / 1 05 46 34

Heidelberg
Telefon 0151 / 18 00 02 90

Münster
Telefon 0421 / 17 59 93 24

Ulm
Telefon 089 / 6 92 57 18

Frankfurt
Telefon 0160 / 90 89 82 56

Kiel
Telefon 040 / 65 90 95 40

Nürnberg
Telefon 089 / 6 92 57 18

Göttingen
Telefon 0551 / 6 94 02 16

Leipzig / Markkleeberg
Telefon 034299 / 7 56 91

Osnabrück
Telefon 0421 / 17 59 93 21



OMNILAB

Robert-Hooke-Straße 8 · 28359 Bremen · Telefon 0421 / 1 75 99-0
www.omnilab.de · info@omnilab.de

