

D. Reichenbacher¹, M. Thanheiser², U. J. Weber³, D. Krüger^{4*}¹ Robert Koch-Institut, Referat Bau und Technik, Berlin² Robert Koch-Institut, Angewandte Infektions- und Krankenhaushygiene, Berlin³ Fa. Weber & Partner, Köln⁴ Robert Koch-Institut, Bau- und Nutzerkoordination, Berlin

Inaktivierung von Abluftfiltern in gentechnischen Hochsicherheitslaboren: Verfahrensvalidierung der Wasserstoffperoxid-Begasung

Inactivation of exhaust air filters in ventilation systems of high safety laboratories: process validation using vaporized hydrogen peroxide

Schlüsselwörter

HEPA-Filter Inaktivierung

Prozessvalidierung

Gasförmiges

Wasserstoffperoxid

Keywords

HEPA-filter inactivation

Process validation

Vaporized hydrogen peroxide

Zusammenfassung

Die erfolgreiche Durchführung einer Validierung als dokumentierter Nachweis der Effektivität eines Verfahrens wird für eine praxisbezogene Inaktivierung von seriellen H 14 HEPA-Filtern aus Abluftanlagen gentechnischer Hochsicherheitslabore beschrieben. Dabei kam als Inaktivierungsmittel gasförmiges Wasserstoffperoxid in allen Bauteilen des Innenraums des Filtergehäuses und der Filter zum Einsatz. Mittels gleichmäßiger Aufbringung von Prüfaerosol konnten in derartigen Filtergehäusen die Filter im eingebauten Zustand überprüft und der Abscheidegrad ermittelt werden. Bei einem notwendigen Filterwechsel müssen die Filter allerdings zuvor zwingend inaktiviert werden. Prinzipiell handelt es sich dabei um eine Raumdesinfektion. Der Einsatz geeigneter Chemo- und Bioindikatoren ermöglichte eine quantitative und qualitative Bewertung des Verfahrens. Die detailliert dokumentierte Validierung einer reproduzierbar wirksamen Inaktivierung eines definierten Raums kann in eine Verfahrensanweisung für den konkreten Fall eingehen. Ändern sich aber relevante Prozesszustände, so muss neu validiert werden. Angaben über zu prüfende Parameter bei Raumdesinfektionsverfahren gemäß § 18 Infektionsschutzgesetz (IfSG) werden abschließend als orientierender Überblick aufgeführt.

HygMed 2013; 38 [4]: 147–151

Summary

A successful performance based on documented evidence proving the effectiveness of process was demonstrated for the inactivation of an H 14 HEPA-filter combination in a biosafety laboratory ventilation system. Vaporized hydrogen peroxide was used as a decontaminant to inactivate all components of filter housing and filters. Using a test aerosol it was possible to inspect the installed filters and to check the filtration efficiency. However, when filter replacing is indicated, there is a requirement to inactivate prior to disposal. As usual for room decontamination, the process can be controlled quantitatively and qualitatively with chemical and biological indicators. A detailed documentation of the testing procedures and their results can be the basis for a standard operation procedure. Nevertheless, changing of any essential process parameter necessitates repeated validation. Finally, an overview is given on the requirements under §18 of the German Law on the Prevention of Infection concerning room decontamination.

Einleitung

Verstärkt werden national und international Forschungsvorhaben vorangetrieben, bei denen mit Erregern der Risikogruppen 3 und 4 gearbeitet wird [1]. Beim Umgang mit hochpathogenen Erregern in Laboren

*Korrespondierender Autor:

Dr. rer. nat. Dominique Krüger

Robert Koch-Institut

BK Baukoordination

Nordufer 20

13353 Berlin

E-Mail: kruegerd@rki.de

ist die Möglichkeit einer sicheren Inaktivierung von Rückständen oder Kontaminationen im Laborbereich ein zentrales Erfordernis. International standardisierte Vorgehensweisen gibt es allerdings nicht. Die Notwendigkeit des dokumentierten Nachweises der Effektivität eines Verfahrens zur Dekontamination von derartigen Bereichen bzw. den dazu gehörenden technischen Anlagen in Forschungseinrichtungen und Tierversuchshaltungen ist in Deutschland eine zentrale Forderung der Genehmigungsbehörden bei der Erteilung von Betriebsgenehmigungen. Die Allgemeingültigkeit eines solchen Verfahrens kann idealerweise durch eine Prozessvalidierung nachgewiesen werden [2].

HEPA-Filter aus raumluftechnischen Anlagen von Sonderisolerstationen oder Hochsicherheitslaboren stellen infektiösen, ggf. mit gentechnisch veränderten Mikroorganismen kontaminierten Abfall dar. Die sichere und gefahrlose Entsorgung ist eine hygienische und technische Herausforderung. Als ideale Lösung wird dabei eine In-situ-Inaktivierung der Filter angesehen, die alle relevanten Erreger einschließlich resistenter Sporen erfasst, und möglichst auf vergleichbare Anlagen übertragen werden kann. Für diesen speziellen Einsatz ist eine Validierung des Verfahrens erforderlich. Die vorliegende Arbeit beschreibt die Vorgehensweise bei der Validierung einer Inaktivierungsmethode von HEPA-Abluftfiltern mittels H_2O_2 -Begasung zum Beweis einer vollständigen und gesicherten Keimreduktion in einem definierten Raum.

In Berlin wird seit dem Frühjahr 2010 für das Robert Koch-Institut (RKI), der zentralen Forschungs- und Referenzeinrich-

tung des Bundes auf dem Gebiet der biomedizinischen Wissenschaften [3], ein neues Labor- und Bürogebäude errichtet, welches Labore bis zur Sicherheitsstufe S4 enthält [4]. Dieser Bereich wird räumlich wie technisch redundant erstellt. Einmal pro Jahr muss sukzessive jeweils eine Laborkomponente zu Wartungszwecken außer Betrieb genommen werden. Die Durchführung von Reparatur- und Kontrollarbeiten, wie beispielsweise das Wechseln der Hochleistungsschwebstofffilter (HEPA-Filter) in den Abluftanlagen ist aber nur nach deren vorheriger Desinfektion sicher durchzuführen. In der Vergangenheit kam dazu gasförmiger Formaldehyd (CH_2O) zum Einsatz welcher bei dieser Anwendung allerdings nur einen eingeschränkten Wirkungsbereich aufweist. Eine Begasung mit verdampftem Wasserstoffperoxid erscheint allerdings aus mehreren Gesichtspunkten (z. B. Materialverträglichkeit oder Rückstände) vorteilhafter [2, 5, 6, 7].

Material und Methoden

Zur Etablierung eines sicheren Desinfektionsverfahrens mittels gasförmigem Wasserstoffperoxid wurde eine serielle H13/14-Gehäusefilterkombination, wie sie zur Abluftfilterung in gentechnischen Hochsicherheitslaboren der Sicherheitsstufe 4 verwendet wird, eingesetzt (Abbildung 1). Um die Anforderungen an das Verfahren zu erhöhen, wurden in den hier beschriebenen Versuchen zwei H14 Filter (nach DIN EN 1822-1, Glasfaser, eine Filterfläche ca. 34 m^2) seriell kombiniert eingesetzt.

Die H_2O_2 -Begasungen wurden an allen Funktionseinrichtungen der Filter und des Filtergehäuses durchgeführt. Die jeweiligen Ausgangsbedingungen im Raum waren im Mittel $23 \pm 0,6\text{ }^\circ\text{C}$ bei $50 \pm 8\%$ relativer Luftfeuchte. Damit alle Anschlussstutzen des Gehäuses vom Gas erreicht werden konnten, musste die Gaseinführung parallel über mehrere Leitungen erfolgen (Abbildung 2). Um im Filtergehäuse die Flächen um das Filterelement mit Desinfektionsmittel zu begasen, musste der Desinfektionsprozess in zwei Phasen mit gespannten und entspannten Filterelementen unterteilt werden.

Begast wurden eine saubere Filterkombination und eine Kombination mit einem künstlich, durch langsam dosierte Aufgabe eines Kunststaubs (Alumina Silikat) verschmutzten Vorfilter. Der Druckverlust dieses beladenen Filters betrug gegenüber dem Reinzustand 80% . Als praxisnaher Versuchsaufbau entsprach dies dem Vorwarnwert für die Veranlassung eines Filterwechsels in derartigen Anlagen.

Zur Beurteilung der Verteilung des gasförmigen Wasserstoffperoxids im Filtergehäuse wurden handelsübliche chemische Indikatoren mit Farbumschlag in der inneren Konstruktion eingesetzt. Zur quantitativen Beurteilung des Desinfektionserfolgs wurden Sporen des *Geobacillus stearothermophilus* in einer Menge von 10^6 Sporen auf Papierträgern verwendet (gke-steri-Record[®], Abbildung 3). Das Verteilschema der Bioindikatoren im Filtergehäuse während der Begasung mit Wasserstoffperoxid ist in Abbildung 4 dargestellt. Als sicherer Desinfektionserfolg galt, wenn eine vollständige Inaktivierung der Sporen in drei Begasungszyklen mit gleichen Prozesspa-

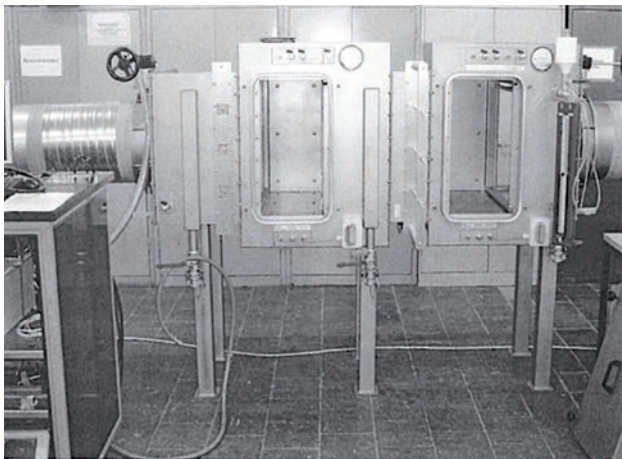


Abbildung 1: Filtergehäuse (Typ SCFhightec, Volumen $0,45\text{ m}^3$, Foto: YIT Germany GmbH), mit geöffneten Filterstufen 1 (links) und 2 (rechts) zur Aufnahme der HEPA-Filtereinsätze.

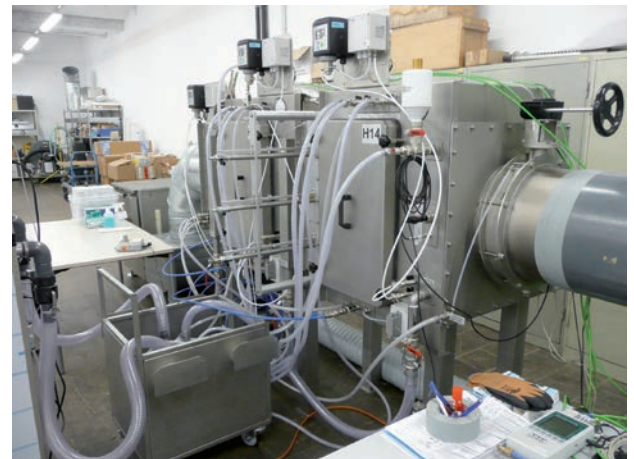


Abbildung 2: Filtergehäuse Typ SCF während der H_2O_2 -Begasung mit paralleler Gaseinführung in die verschiedenen Anschlussstutzen über mehrere Leitungen (Foto: YIT Germany GmbH).

Tabelle 1: Dauer der verschiedenen Phasen bei den Begasungszyklen mit beiden eingesetzten Gasgeneratoren. In Klammern die maximalen Konzentrationen (ppm) des H_2O_2 vor der ersten Filterstufe.

Phasen (min)	Generator 1	Generator 2
Entfeuchtung	10	10
Konditionierung	15	15
Dekontamination Filterelemente gespannt	(700 ppm H_2O_2) 180	(1100 ppm H_2O_2) 40
Dekontamination Filterelemente entspannt	420	80
Belüftung	60	60
Gesamtzeit	685	205

rametern reproduziert werden konnte. Die Sporenträger wurden jeweils nach Versuchsende eines Begasungszyklus in ein Röhrchen mit steriler Nährlösung (Caso Bouillon, Heipha) überführt, das zusätzlich Katalase (10^3 Einheiten, Roche) enthielt, um eventuell restliches am Papierstreifen adhärierendes H_2O_2 zu inaktivieren. Anschließend wurde die Suspension 7 Tage bei 55 bis 60 °C bebrütet und dabei täglich visuell auf bakterielles Wachstum überprüft. Positivkontrolle war dabei die parallele Kultur eines nicht begasten Sporenträgers. Die Auswertung der Bioindikatoren erfolgte durch ein unabhängiges, zertifiziertes Labor.

Die Konzentration des H_2O_2 wurde während jedes Begasungszyklus vor der ersten Filterstufe, zwischen den Filtern und nach der zweiten Filterstufe aufgezeichnet. Eine kontinuierliche Erfassung von Volumen-

strom, Druck, Luftfeuchtigkeit und Temperatur jeweils vor und nach den Filterelementen fand durch geeichte Messgeräte während des gesamten Begasungsvorgangs statt.

Zum Einsatz kamen zwei Gasgeneratoren unterschiedlicher Fabrikate, in beiden Fällen war das zu verdampfende Ausgangsmaterial 35%iges H_2O_2 . Beide Systeme unterteilten die Begasung in Entfeuchtungs-, Konditionierungs-, Dekontaminations- und Belüftungsphasen [2, 6].

Ergebnisse

Zunächst erfolgte unabhängig für beide Filter in der Gehäusefilterkombination eine Abscheidegradmessung durch definierte Aufgabe des Prüfaerosols Bis(2-Ethylhexyl)-Sebacat mit der Partikelgröße 0,1–0,3 μm

in die einströmende Zuluft über Aerosollanzen. Damit konnten in Anlehnung an die DIN EN 1822-1, -4 und -5 durch Messung der Partikel auf den Roh- und Reinfluftseiten sowohl der Abscheidegrad der Filter ($\geq 99,995\%$) als auch der relative Beaufschlagungsquerschnitt gemessen, und eventuelle Leckagen ausgeschlossen werden.

Die technischen Prozessgrößen beider Begasungssysteme unterschieden sich in den Versuchsreihen, was die Dauer der Dekontaminationsphasen und die erreichten Konzentrationen des H_2O_2 angingen (Tabelle 1).

Beim Inaktivierungsergebnis gab es nach der Begasung aber keine Unterschiede zwischen den beiden Generatoren: über 6 log-Stufen wurde eine reproduzierbare Abtötung der eingesetzten Bioindikatoren in allen Testreihen erreicht, so dass man von einer sicheren Inaktivierung aller Bauteile im Innenraum des Filtergehäuses, einschließlich der Filterelemente und aller mit dem Innenraum direkt in Verbindungen stehenden Hohlräumen und Anschlussstutzen ausgehen konnte.

Jeder Prozessschritt wurde dokumentiert und alle zu messenden Parameter sowie abgeleitete Einzelhandlungen, Aufbauten und Konstruktionen gingen in ein abschließendes Validierungsprotokoll ein. Ein derartiges Dokument wäre dann bei der konkreten Anwendung die Arbeitsgrundlage bei der Abstimmung mit hauseigenen Sicherheitsfachkräften oder den zuständigen Genehmigungsbehörden.



Abbildung 3: Sporen des *Geobacillus stearothermophilus* auf gke-steri-Record[®] Papierträgern. Weißer Balken entspricht 1 μm . Rasterelektronenmikroskopische Präparation und Aufnahme von Dr. K. Madela, Robert Koch-Institut, ZBS 4).

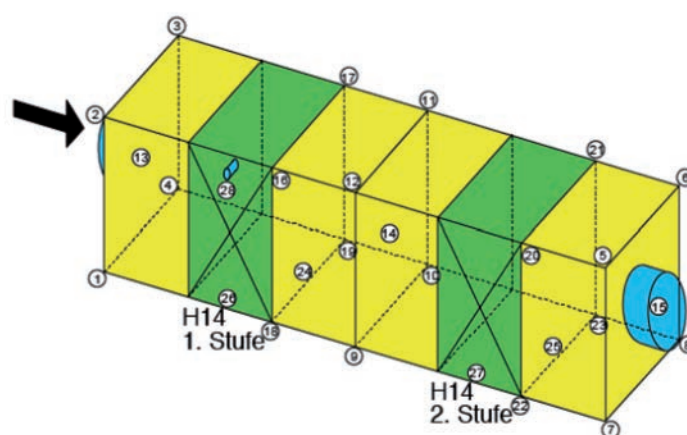


Abbildung 4: Belegungsplan für 28 Bioindikatoren (BI) im Filtergehäuse. Pfeil markiert die Strömungsrichtung. 1 bis 15: BI im Filtergehäuse; 16 bis 19: BI direkt hinter Filterelement 1. Stufe; 20 bis 23: BI direkt hinter Filterelement 2. Stufe; 24 und 26: BI unterhalb Filterelement 1. Stufe; 25 und 27: BI unterhalb Filterelement 2. Stufe. BI 26 und 27 konnten nur bei entspannten Filterelementen durch das gasförmige Wasserstoffperoxid inaktiviert werden. 28: BI im Messstutzen.

Diskussion

Seit dem Jahr 2004 befasst sich das RKI im Rahmen von Antragsverfahren zur Aufnahme in die „Liste der vom Robert Koch-Institut geprüften und anerkannten Desinfektionsmittel und -verfahren“ (RKI-Liste [8]) gemäß § 18 IfSG mit den Sonderverfahren zur Behandlung von Filtern in Sicherheitswerkbanken durch Begasung. Laut § 18 IfSG müssen bei einer behördlich angeordneten Entseuchung Mittel bzw. Verfahren aus der oben genannten RKI-Liste angewendet werden.

Für eine Eintragung in die RKI-Liste muss immer sowohl durch unabhängige Gutachten als auch durch eigene Prüfungen belegt werden, dass das Verfahren reproduzierbar in den angegebenen Grenzen wirksam ist. Die Begasung von Werkbänken zählt dabei zu den Raumdesinfektionsverfahren, bei denen der Raum durch die Geometrie der Werkbank exakt definiert ist. Dies kann so auch für den oben beschriebenen Versuchsansatz auf die Geometrie eines Filtergehäuses für serielle HEPA-Filterkombinationen übertragen werden.

Grundsätzlich kann man bei derartigen Desinfektionsverfahren davon ausgehen, dass es immer um zu begasende, dicht abzuschließende Räume geht. Dabei ist es unerheblich, ob es sich um Filtergehäuse mit Filtern, um Autoklaven, Materialschleusen oder auch ganze Laborräume handelt. In der Regel stellen Laborräume aufgrund unterschiedlicher Kubaturen, verschiedener raumluftechnischer und thermischer Gegebenheiten und uneinheitlicher Materialeigenschaften die größte Herausforderung für eine Validierung dar. Der zu vali-

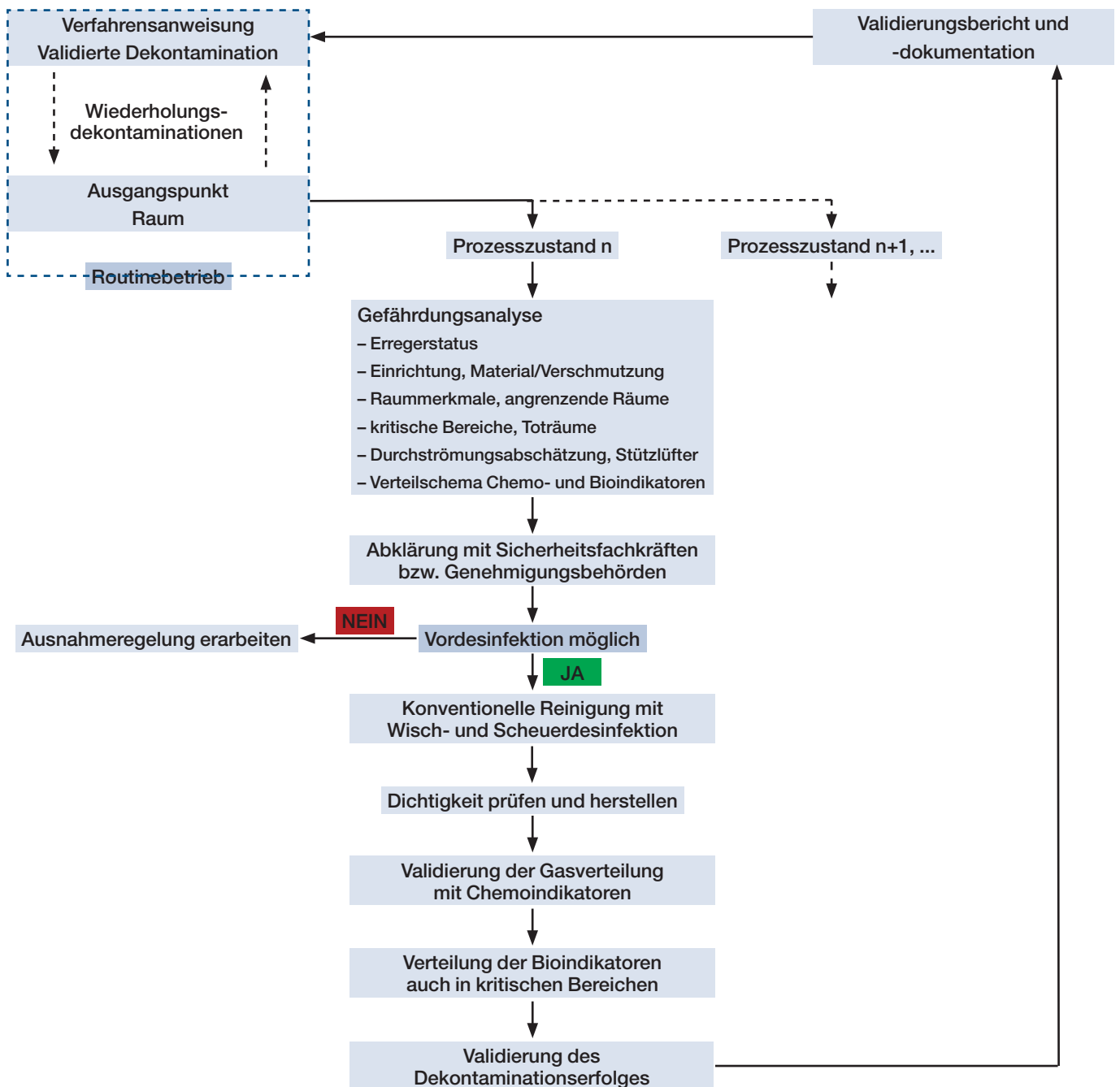


Abbildung 5: Schematische Zusammenfassung des prinzipiellen Vorgehens bei der Validierung einer Raumdegasung zu Inaktivierungszwecken.

dierende Begasungsfall gilt nach unserer Auffassung deshalb immer nur für den konkreten Einrichtungs- und Ausstattungsfall. Ändern sich bei einem zu betrachtenden Begasungsraum die konstruktiven Gegebenheiten, sind wechselnde Einrichtungen und Materialien zu betrachten oder hat man unterschiedliche Verschmutzungsgrade, kann das zu anderen Prozessansätzen führen und erfordert immer einen neuen Validierungszyklus (vgl. in Abbildung 5, Prozesszustand $n+1 \dots$).

Die zum allgemeinen Antrag auf Aufnahme von chemischen Desinfektionsverfahren in die RKI-Liste notwendigen ergänzenden Unterlagen für Raumdesinfektionsverfahren sind nachstehend aufgeführt und geben einen orientierenden Überblick über die zu prüfenden Parameter bei diesen Sonderverfahren.

- a) Angaben zum Desinfektionsverfahren.
 - Bezeichnung und Beschreibung des Desinfektionsverfahrens.
 - Direkte Messung der einwirkenden Gaskonzentration.
 - Angaben zu verfahrensbeeinflussenden Faktoren (z. B. Luftfeuchtigkeit, Temperatur).
 - Angaben zur Inaktivierung des Wirkstoffes nach Abschluss der Desinfektion.
- b) Bezeichnung, Beschreibung und Bedienung des Gerätes zur Durchführung des Verfahrens.
- c) Angaben zur Wirksamkeit des Desinfektionsmittels.

Die Unterlagen des Antrags müssen darüber hinaus beinhalten:

- Auswahl eines hochresistenten Bioindikators. Als geeigneter Bioindikator für die Prüfung der Wirksamkeit haben sich bei der H_2O_2 -Begasung von Sicherheitswerkbänken einschließlich der HEPA-Filter 10^6 Sporen von *G. stearothermophilus* auf Papierträgern erwiesen [9]. Allerdings kann es durchaus auch vegetative Formen von Mikroorganismen mit einer hohen Katalase-Aktivität geben, die eine vergleichbare oder sogar größere Resistenz gegen gasförmiges Wasserstoffperoxid aufweisen könnten als Sporen [10]. Essenziell für die standardisierte Auswertung der Bioindikatoren ist der Einsatz von Katalase im Bebrütungsmedium, um restliches H_2O_2 zu entfernen [11].
- Ermittlung der Grenzen des Verfahrens. Bei der hier beschriebenen Filterbegasung musste besonders auf die Durchspülung von Toträumen [12], wie etwa

Anschlussstutzen geachtet werden. Die Grenzen können auch ermittelt werden, indem bereits nach einem Teil der Dekontaminationszeit der Zyklus abgebrochen wird und die Bioindikatoren quantitativ ausgewertet werden, oder die Bioindikatoren zusätzlich in eine Matrix, z. B. Blut, eingebettet werden.

- Bestätigung der Reproduzierbarkeit der Desinfektion.

Im Jahre 2009 konnte das erste Sonderverfahren zur Desinfektion von Filtern in Sicherheitswerkbänken im „Nachtrag zur Liste der vom Robert Koch-Institut geprüften und anerkannten Desinfektionsmittel und -verfahren“ aufgenommen werden [13]. Weitere Anträge befinden sich derzeit in der Bearbeitung.

Die aufgeführten Unterlagen und Nachweise können auch orientierend für die Validierung von H_2O_2 -Verfahren außerhalb des Anwendungsbereiches der RKI-Liste, beispielsweise für die Schlussdesinfektion von Laborräumen oder Sonderisolerstationen [14], herangezogen werden.

Schlussfolgerung

Die letztendlich positiv durchgeführte und dokumentierte Versuchsdurchführung der oben beschriebenen Begasung von H 14 HEPA-Abluftfilterkombinationen mit H_2O_2 hat gezeigt, dass man ein derartiges Verfahren für diesen Einsatzbereich als validierten Prozess hinreichend qualifizieren kann.

Danksagung

Sämtliche Messinstrumente, Filtergehäuse und Filter wurden freundlicherweise von Fa. YIT Germany GmbH (Aachen) zur Verfügung gestellt. Die Autoren bedanken sich bei den Mitarbeitern der Fa. YIT Germany GmbH (Aachen), Dipl.-Ing. Mario Andres, Reinhold Göttgens, Dr. Ing. Peter Hausch und Dipl.-Ing. Claus Schweinheim für das Engagement bei der Durchführung der Filterbegasungen als reales Validierungsverfahren.

Interessenkonflikt

Der Autor U. J. Weber ist Geschäftsführer der Fa. Weber & Partner, Ingenieurgesellschaft für technische Gesamtplanung mbH.

Literatur

1. Nisii C, Castilletti C, Di Caro A, Capobianchi MR, Brown D, Lloyd G, Gunther S, Lundkvist A, Pletschette M, Ippolito G, Euronet-P4 Group. The European network of Biosafety-Level-4 laboratories: enhancing European preparedness for new health threats. *Clin Microbiol Infect* 2009;15:720–726.
2. Vanhecke P, Sigwarth V, Moirandat C. A potent and save H_2O_2 fumigation approach. *PDA J Pharm Sci Technol* 2012;66:354–370.
3. <http://www.rki.de>
4. RKI Ausbau - Informationen zum Baugeschehen. Flyer zur Baumaßnahme des Robert Koch-Instituts 2012; http://www.rki.de/DE/Content/Institut/BSL_4_Labor/BSL4_node.html
5. Reichenbacher D, Thanheiser M, Krüger D. Aktueller Stand zur Raumdekontamination mit gasförmigem Wasserstoffperoxid. *Hyg Med* 2010;35:204–208.
6. Unger-Bimczok BKL. Dekontamination von pharmazeutischen Isolatoren mit verdampftem Wasserstoffperoxid: Charakterisierung von Einflussparametern und Optimierung des Maschinendesigns. Dissertation Universität Hohenheim 2010; http://opus.ub.uni-hohenheim.de/volltexte/2011/574/pdf/Dissertation_BUngerBimczok.pdf
7. Gesellschaft für Versuchstierkunde, GV-SOLAS, Ausschuss für Hygiene. Desinfektion von Tierräumen mittels Formaldehyd oder Wasserstoffperoxid. http://www.gv-solas.de/assets/files/PDFs/pdf_PUBLIKATION/hyg_Raumdesinfektion_1210.pdf
8. Liste der vom Robert Koch-Institut geprüften und anerkannten Desinfektionsmittel und -verfahren. *Bundesgesundheitsbl* 2007;50:1335–1356.
9. Sigwarth V, Stärk A. Effect of carrier materials on the resistance of spores of *Bacillus stearothermophilus* to gaseous hydrogen peroxide. *PDA J Pharm Sci Technol* 2003;57:3–11.
10. Pottage T, Macken S, Walker JT, Bennett AM. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* is more resistant to vaporized hydrogen peroxide than commercial *Geobacillus stearothermophilus* biological indicators. *J Hosp Infect* 2012; 80: 41–45.
11. Malik DJ. Assessing the viability of bioindicators following inactivation by aerosolized hydrogen peroxide decontamination process. *J Hosp Infect* 2013;83:171–172.
12. Unger-Bimczok B, Kosian T, Kottke V, Hertel C, Rauschnabel J. Hydrogen peroxide vapor penetration into small cavities during low-temperature decontamination cycles. *J Pharm Innov* 2011; 6: 32–46.
13. Nachtrag zur Liste der vom Robert Koch-Institut geprüften und anerkannten Desinfektionsmittel und -verfahren. *Bundesgesundheitsbl* 2010; 53: 1312–1315.
14. Passaretti CL, Otter JA, Reich NG, Myers J, Shepard J, Ross T, Carroll KC, Lipsett P, Perl TM. An evaluation of environmental decontamination with hydrogen peroxide vapor for reducing the risk of patient acquisition of multidrug-resistant organisms. *Clin Infect Dis* 2013;56:27–35.