



Культивация клеток без контаминации

Стерилизация горячим воздухом и другие средства контроля контаминации в CO₂ инкубаторах – сравнение принципов с точки зрения пользователя

Предисловие

В культивации клеток нет другой такой же проблемы как микробная контаминация. Чтобы ее избежать, большое значение имеют хорошие методы стерилизации и тщательное обращение с культурами. Кроме того, большую роль играет и сам инкубатор CO₂, так как он обеспечивает оптимальные условия роста не только для клеточных культур, но и для различных нежелательных микробов. Принимая это во внимание, каждый высококачественный инкубатор имеет несколько функций для того, чтобы избежать загрязнения. Тем не менее, для разумного решения о покупке того или иного инкубатора требуется больше, чем просто изучить технические детали. В самом деле, и система в целом, и особенно принципы анти-контаминации нужно сравнить и оценить. Очевидно, что сама по себе сложность системы не приведет к росту безопасности. Инкубатор должен скорее обеспечивать оптимальное предотвращение контаминации без больших затрат рабочего времени, сохраняя при этом низкий уровень эксплуатационных расходов.

Содержание

2 Предисловие

4 Значение контроля контаминации при работе с клеточными культурами

5 Терминология:
деконтаминация, дезинфекция, стерилизация

6 Меры для предотвращения заражения клеточных культур в инкубаторе

10 Безопасность и эффективность и стоимость разных способов деконтаминации

13 Концепция BINDER по минимизации риска контаминации

14 Выводы

15 Ссылки

Значение контроля контаминации при работе с клеточными культурами

Микробиологическая контаминация, вызванная бактериями, грибами или вирусами, представляет собой серьезную угрозу в культивировании клеток. Так как загрязнение не всегда распространяется быстрее, чем растут культивируемые клетки, они могут оставаться незамеченными в течение длительного времени. Скрытые процессы, такие как потеря необходимых питательных веществ и появление микробных метаболитов, могут вызвать сдвиг уровня pH, который, в конечном итоге, ставит под угрозу клеточную пролиферацию. Наиболее опасные бактерии микоплазмы могут изменять морфологию клетки-хозяина и даже вызывать хромосомные aberrации. Иногда один микроб может превратить недели или месяцы научно-исследовательских работ в ничто.

Существует множество путей попадания загрязнений: использование клеточных линий, сред, сывороток или других реагентов с невыявленными загрязнениями; переносимые по воздуху споры, ненадлежащая дезинфекция лабораторного оборудования, или случайно привнесенная лаборантами контаминация. Так как доказательство отсутствия микробов включает сложные и утомительные процедуры, то должны быть установлены критерии контроля загрязнения. Учитывая значительный прогресс в области использования чувствительных клеточных культур, таких как тканевая инженерия, регенеративная клеточная и тканевая терапии, выросли требования гигиены для CO₂ инкубаторов. Таким образом, высочайшие стандарты применяются к совершенству и надежности всей технологической цепочки, где ключевую роль играет CO₂ инкубатор. Проблемой, присущей всем терапиям на основе клеток, например, суспензиям культивированных аутологических хондроцитов для реимплантации в тело пациента, является то, что конечный продукт нельзя стерилизовать. По этой причине руководства, такие как 1) «Надлежащая производственная практика» (GMP); 2) проект руководства «Практика надлежащих клеточных культур» (GCCP); 3) Европейская директива о тканях человека, рекомендуют использовать стерильное одноразовое и / или стерилизуемое оборудование для обработки человеческих клеток и тканей. Стерильные условия должны быть гарантированы для всех клеточных культур в течение всего периода выращивания не только для того, чтобы снизить риск распространения загрязнения, но и, что более важно, избежать инфекций, угрожающих жизням пациентов.

Терминология борьбы с микробами: деконтаминация, дезинфекция, стерилизация

Термин деконтаминация (обеззараживание) четко не определен. Он описывает удаление опасных материалов, таких как биологического, химического или радиоактивного загрязнения, и не подразумевает какую-либо количественную оценку его эффективности.

Дезинфекция играет важную роль в асептических методах в здравоохранении. В определенных тестовых сценариях он предусматривает сокращение некоторых тестовых микробов на пять порядков, т.к. 1 из 100000 тестовых микробов может выжить при дезинфекции.

Стерилизация предполагает полную ликвидацию или дезактивацию жизнеспособных микроорганизмов. Так как 100% защита не может быть практически осуществлена, различные национальные фармакопеи неизменно допускают риск загрязнения 1 к 1000000, т.е. один жизнеспособный микроорганизм на один миллион стерилизованных.

Что касается механизмов и проверки эффективности методов стерилизации и дезинфекции⁴, то во всем мире существует множество различных руководств и стандартов, в частности, для использования в фармацевтической промышленности и в клиническом секторе. В фармакопеях обычно указывают стерилизацию в автоклаве, стерилизацию горячим воздухом, этиленоксидную дезинфекцию, а также стерильную фильтрацию как методы стерилизации. Пригодность конкретного способа зависит от области применения и требует валидации с определенными тестовыми организмами.

Меры для предотвращения заражения клеточных культур в инкубаторе

Требование стерильных условий к среде, где живут клеточные культуры внутри CO₂ инкубатора является важной технической проблемой, потому что оптимальные условия роста для клеточных культур также оптимальны и для нежелательных микроорганизмов.

Следует рассмотреть следующие важные аспекты для создания последовательной концепции контроля контаминации:

- Пригодность камеры инкубатора к частому распылению / протиранию дезинфицирующими веществами, что является стандартным процессом снижения микробиологической нагрузки в системе инкубатора CO₂.
- Полная дезактивация потенциальных загрязнителей, которые будут проводится регулярно или по требованию с помощью прямых процессов стерилизации.
- Предотвращение усложнения внутренних систем, таких как стеллажные системы, вентиляторы или воздуховоды, которые могут служить укромным местом для загрязняющих веществ и требуют утомительной разборки для очистки и дезинфекции.
- Управление конденсатом для того, чтобы избежать мокрых мест, которые могли бы служить питательной средой для микробов внутри инкубатора.
- Предотвращение передачи по воздуху микроорганизмов, которые до некоторой степени вездесущи.

Меры для предотвращения заражения клеточных культур в инкубаторе

Производители CO₂ инкубаторов разработали или приняли ряд мер для контроля контаминации с более или менее сложным процессом. Мы должны различать процессы деконтаминации, которые будут регулярно или по требованию выводить инкубатор из эксплуатации, и методы, которые постоянно снижают риск заражения в рабочей зоне инкубатора. В таблице 1 приведены наиболее распространенные методы.

Деконтаминация по требованию	Непрерывный контроль загрязнения
Сухой нагрев 160°C - 180°C	Минимизация площади поверхности
Сухой нагрев 120°C - 140°C	Контроль влажности
Влажный нагрев 90°C - 95°C	Бактерицидные свойства поверхностей
Обработка паром перекиси водорода	Фильтрация воздуха через HEPA-фильтр
УФ облучение	УФ облучение

Таб. 1: Меры по минимизации риска контаминации

Стерилизация горячим воздухом при температуре 160°C - 180°C является единственным из перечисленных методов, которые соответствуют стандартам стерилизации медицинских устройств (см. таблицу 2). Программа стерилизации инкубатора состоит из трех этапов: 1) нагреть до максимальной температуры; 2) подвергнуть максимальному нагреву; 3) остудить до температуры инкубации, например, до 37°C. Успешная дезактивация тестовых микробов в соответствии с фармакопеей Соединенных Штатов (USP) была доказана программой стерилизации горячим воздухом⁵.

Различные национальные стандарты и фармакопеи определяют температуру стерилизации 160°C - 180°C и время от 30 минут до двух часов. Соответственно, все стандарты подтверждают стерилизацию при 180°C или в течение двух часов.

Меры для предотвращения заражения клеточных культур в инкубаторе

Стандарт	Температура, °C	Время экспозиции, мин.
Британская фармакопея	160	60
Европейская фармакопея	160	120
Японская фармакопея	160 – 170	120
	170 – 180	60
	180 – 190	30
Фармакопея Скандинавских стран	180	30
Фармакопея США	170	120
Американская стоматологическая ассоциация	160	120
ANSI/AAMI ST50	160	120
DIN EN 556 (Стерилизация медицинских приборов)	160	120
	180	30

Таб. 2: Международные стандарты процесса стерилизации горячим воздухом

Дезинфекция горячим воздухом при температуре от 120°C до 140°C не представляет собой истинную стерилизацию с точки зрения фармакопеи, но значительно снижает количество микробов. При сухой стерилизации при 140°C 6-ти кратное снижение было отмечено⁶ для спор сенной палочки var. Niger, ATCC#93725.

Дезинфекция паром при 90°C несравнима с эффективностью истинной автоклавной стерилизации паром при 121°C. Было доказано, что эффективность температурных резистентных спор видов Сенная палочка и *Bacillus stearothermophilus* является неудовлетворительной^{5,10}.

Обработка перекисью водорода (H₂O₂) является стандартной процедурой обеззараживания чистых помещений⁷. Адаптированный для CO₂ инкубаторов метод требует безопасной и полной дезактивации коррозионного и цитотоксического действия H₂O₂, например, УФ-облучением.

Меры для предотвращения заражения клеточных культур в инкубаторе

УФ-обработка путем применения неозонового УФ-излучения с длиной волны 253,7 нм. Мутагенное действие УФ-излучения было доказано⁸, однако, его эффективность зависит непосредственно от прямого облучения, так как оно имеет ограниченное проникновение, а, следовательно, пригодно только для обработки поверхностей. Доктор Валлхебер (Wallhäußer) в своей работе⁴ отметил убывающий эффект УФ излучения при значениях влажности окружающей среды более, чем 80% относительной влажности. Тем не менее, была описана эффективность очистки воды в системах увлажнения инкубаторов CO₂ при определенных условиях.

Использование HEPA-фильтров (высокоэффективных сухих воздушных фильтров) для того, чтобы уменьшить концентрацию частиц в чистых помещениях и на столах, является признанным процессом с подтвержденной эффективностью. В CO₂ инкубаторе вентилятор во внутренней камере протягивает воздух через HEPA-фильтр, который эффективно собирает загрязняющие вещества определенного размера⁹.

Поверхности внутренней камеры, сделанные из меди, выделяют бактерицидные ионы меди. Однако этот способ не является эффективным для некоторых видов бактерий, грибковых спор и вирусов. Эффективность сплавов медь / нержавеющая сталь на тестовых организмах была продемонстрирована в серии экспериментов⁸, но более низкое содержание меди в сплавах демонстрирует пониженное бактерицидное действие¹².

Контроль уровня влажности поддерживают относительную влажность при высоких уровнях (~95 %), для того, чтобы избежать пересыхания сред, но ниже точки росы для предотвращения неконтролируемой конденсации. Микробы не могут расти на сухих поверхностях.

Гладкая конструкция: Усилия по очистке и риск загрязнения растут вместе с увеличением поверхности и усложнением конструкции. Соответственно, небольшую площадь поверхности и простоту конструкции можно рассматривать как непрерывную меру по контролю контаминации.

Безопасность и эффективность процесса, и затраты на разные принципы деконтаминации

Когда дело доходит до контаминации, конечный пользователь явно фокусируется на технологической безопасности, эффективности понимания затрат. Соответствующая пригодность описанных процессов и функций в сочетании с типичными концепциями рынка (см. таблицу 3) CO₂ инкубаторов в целом будут сравниваться далее.

	Деконтаминация по требованию		Деконтаминация непрерывная	Риск контаминации обусловлен		
				Вентилятором	Воздухопроводом	Полками
Концепция 1	180°C (сух) воздух	10 -12 ч	—	Нет	Нет	Нет
Концепция 2	90°C влажный	25 ч	—	Да	Нет	Да
Концепция 3	140°C (сух) воздух	12 -14 ч	HEPA-фильтр	Да	Да	Да
Концепция 4	H ₂ O ₂	3 ч	УФ-облучение, медь	Да	Да	Да

Таб. 3: Концепции контроля контаминации

Концепция 1: является единственной концепцией, которая отражает истинный процесс стерилизации. После выполнения автоматической процедуры стерилизации (~10 ч), инкубатор действительно очищен от всех микроорганизмов. Прочие технические особенности и детали для деконтаминации не были включены в конструкцию, а риск заражения в настоящее время дополнительно снижается за счет минимизации площади поверхности, подверженной загрязнению и скрытым местам. Вентилятор тоже отсутствует, что приводит к сокращению воздушных потоков и делает HEPA-фильтр излишним. В целом, концепция не требует никаких расходных материалов, что держит затраты на низком уровне.

Безопасность и эффективность процесса, и затраты на разные принципы деконтаминации

Концепция 2: Очистка с помощью пара при 90-95°C гораздо менее эффективна, чем истинная стерилизация в автоклаве. Этот процесс требует более 24 часов, а затем повторной калибровки CO₂ датчика. Во время фазы остывания генерируется конденсат, что представляет потенциальную опасность повторного загрязнения уже обработанных внутренних поверхностей из нержавеющей стали. Таким образом производитель рекомендует последующее распыление / стирание дезинфектанта. В целом процесс не является таким эффективным как полная обработка, в то время как сама обработка является громоздкой и трудоемкой.

Концепция 3: В основе этой концепции лежит фильтрация частиц, которая перехватывает загрязняющие вещества в воздухе. Тем не менее, «собранные» микробы и споры должны быть удалены из инкубатора путем замены дорогостоящего фильтра HEPA. Кроме того, эти фильтры не предназначены для условий высокой влажности, что делает его эффективность сомнительной. Операционные расходы увеличиваются вместе с усердием оператора. Технология фильтрации требует потока воздуха, созданного вентилятором и воздуховодами, которые подвержены загрязнению сами по себе. Сопутствующая дезинфекция при 140°C не является истинной стерилизацией.

Безопасность и эффективность процесса, и затраты на разные принципы деконтаминации

В **4 концепции** были объединены две хорошо знакомые процедуры для деконтаминации чистых помещений: дезинфекция H_2O_2 и УФ-облучение. Дезинфекция перекисью водорода является быстрым способом дезактивации, потому что не включает в себя высокотемпературного процесса с требуемым нагревом и охлаждением. Однако его следует проводить обученным персоналом, чтобы избежать опасности для самого персонала и культивируемых клеток. УФ-облучение применяется для дезактивации коррозионного и цитотоксического H_2O_2 . Кроме того УФ-облучение требуется для периодической деконтаминации потока воздуха. Системам необходим вентилятор, что способствует распространению загрязнения. Стойки и воздуховоды предоставляют укромные места для нежелательных микробов.

H_2O_2 + УФ-облучение в сочетании с поверхностью из сплава медь / нержавеющая сталь была описана ранее⁸. Для применения в повседневной практике, которая может потребоваться в любое время, этот процесс кажется относительно дорогим и трудоемким по сравнению с сухожаровой стерилизацией воздуха с помощью ночного цикла. В дезинфекции потока воздуха УФ облучением, как представляется, нет необходимости, если движение воздуха происходит медленно, или если кюветы с водой регулярно чистятся и наполняются стерильной, дистиллированной водой (рекомендация производителя – один-два раза в неделю).

В целом, это самая сложная концепция, доступная для рутинного процесса деконтаминации с самым коротким временем. Сложность системы в целом может привести к неудачам или ошибкам пользователя и включает в себя значительные эксплуатационные затраты денег и времени.

Концепция BINDER по минимизации риска контаминации

Инкубаторы CO₂ компании BINDER предлагают убедительную концепцию по предотвращению контаминации. Это упрощает рутинную процедуру распылить / стереть дезинфектант и обеспечивает автоматическую стерилизацию. Простая конструкция по дезинфекции с минимальными усилиями и (почти) без каких-либо дополнительных затрат на дезинфекцию. Убедительная концепция BINDER содержит следующие основные элементы:

- **Упрощенная процедура дезинфекции:** Глубокая бесшовная внутренняя камера без острых углов или стоек хорошо подходит для простой и удобной дезинфекции типа распыление / протирки химических реагентов.
- **Бескомпромиссная стерилизация:** Хорошо зарекомендовавшая себя автоматическая стерилизация горячим воздухом при 180°C соответствует международным стандартам для медицинских изделий. Даже ИК датчик CO₂ остается в камере (новая серия СВ) во время стерилизации.
- **Минимизация площади поверхности:** Поверхность внутренней камеры, подверженная загрязнению, минимизируется путем исключения избыточных приспособлений, таких как стойки, воздуховоды, вентиляторы, фильтры или УФ-лампы.
- **Контроль конденсата:** Запатентованная система увлажнения с двухзонным поддоном генерирует высокую относительную влажность и ограничивает ее максимумом в 95% путем определения холодной точки. Получающиеся сухие внутренние стены предотвращают размножение микробов воздуха.

Выводы

В последних публикациях¹¹ было обращено внимание на продолжительность процедур деконтаминации и необходимость постоянной очистки. Любой критический обзор также должен принять во внимание практическое время и затраты, необходимые на замену дорогостоящих компонентов, таких как HEPA-фильтры и ультрафиолетовые лампы.

В этом документе делается попытка сравнить различные концепции контроля контаминации для инкубаторов CO₂ с точки зрения пользователя. Нельзя полностью избежать загрязнения, но оборудование для выращивания культур предлагает пользователю более-менее подходящую практику культивирования клеток. Большинство инкубаторов хорошо делают свою работу только когда они новые, но прибор должен быть надежным и должен иметь так же характеристики и безопасность на протяжении многих лет. Для достижения этой цели в долгосрочной перспективе убедительная концепция для контроля загрязнения является ключевым фактором.

Выходные данные

| Автор

Доктор Йенс Тильман (Jens Thielmann) биолог и продукт-менеджер оборудования для роста и хранения компании BINDER GmbH. Он отвечает за различные инкубаторы, используемые в медицине, науке и фармацевтических исследованиях для инкубации бактерий или клеточных культур млекопитающих, а также низкотемпературных морозильников для долгосрочного стабильного хранения чувствительных образцов.

| О компании

BINDER является крупнейшим в мире специалистом в области испытательных камер для научно-производственных лабораторий. Внедряя в жизнь передовые технические решения, компания вносит значительный вклад в улучшение здоровья и безопасности людей. Наша продукция подходит для стандартных лабораторных манипуляций, узкоспециализированной работы в области исследования и разработки, производства и обеспечения качества.

Около 400 сотрудников по всему миру, доля экспорта составляет 80%. В 2013 году объем продаж BINDER составил более 60 миллионов евро.

| Контакты

BINDER GmbH
Im Mittleren Ösch 5
78532 Tuttlingen

Выходные данные

| Ссылки на международные стандарты

Методы стерилизации комиссии британской фармакопеи (British Pharmacopoeia Commission Methods of Sterilization), Лондон, Великобритания: App. X VIII, 2003

Европейская фармакопея (Pharmacopoeia Europea), 7-ая редакция, 2010

Японская фармакопея (Japanese Pharmacopoeia), www.jpdb.nihs.go.jp/jp14e

Фармакопея Скандинавских стран (Pharmacopoeia Nordica Online Reference) via www.dekker.com

Фармакопея США (US Pharmacopoeia) www.usp.com

американская стоматологическая ассоциация (American Dental Association) www.ada.org

ассоциация продвижения медицинских инструментов (Association for the Advancement of Medical Instrumentation) (AAMI) www.aami.org

Немецкий институт (Deutsches Institut für Normung e.V.) (DIN) www.din.de

| Источники

- 1 Leitfaden für die Gute Herstellungspraxis, EU-GMP Leitfaden ISBN-10: 3-934971-24-5
Maas & Peither GMP-Verlag
- 2 S. Coecke et. al., Guidance on Good Cell Culture Practice, A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture (GCCP), ATLA 33, 261-287, 2005
- 3 EU-Richtlinie zur Zell- und Gewebespende: Europäische Kommission 29/03/2005:
Zur Festlegung von Qualitätsstandards für die Spende, Beschaffung, Te stung, Verarbeitung, Konservierung, Lagerung und Verteilung von menschlichen Zellen und Geweben
- 4 K.H. Wallhäußer Praxis der Sterilisation, Desinfektion – Konservierung, Keimidentifizierung – Betriebshygiene, 5. Auflage, 1995
- 5 P. Distler, 180 °C Hot air sterilization: a safe method against microbiological contamination in CO2 incubators Lab Asia, November 2003, p. 11

Impressum

ИСТОЧНИКИ

- ⁶ J. Dalamasso, APEX Laboratories, Effective Heat Sterilization in CO₂ Incubators, Vol. 4, Nr. 3, Thermo Electron Corporation's Heat Sterilization White Paper, 2003
- ⁷ D.M.Carlberg, Cleanroom Microbiology for Non-Microbiologists, CRC Press, 2005
- ⁸ H. Basujima, D. Mistry, Technical Development Report, Sanyo Electric Biomedical Co., Ltd. A Comparative Analysis of Ultraviolet Light Decontamination versus High-Heat Sterilization in the Cell Culture CO₂ Incubator, with the Use of Copper-Enriched Steel Construction to Achieve Background Contamination Control™, 2007
- ⁹ A. Campbell, D. Figel, Importance of Class 100 Air in a CO₂ Incubator, Vol. 4, Nr. 1, Thermo Electron Corporation's Class 100 Air White Paper, 2003
- ¹⁰ Bio safety Investigation Unit, CAMR, Efficacy of a CO₂ incubator heat disinfection cycle on dried microbes, 1998
- ¹¹ Schaffung eines sicheren Umfelds für Zellkulturen in biopharmazeutischen Anwendungen, White Paper Panasonic, Laborpraxis September 2013
- ¹² H.T. Michels, Anti-Microbial Characteristics of Copper; ASTM Standardization News, Oktober 2006; www.tellurex.com