

## DEPARTEMENT GESUNDHEIT UND SOZIALES

Amt für Verbraucherschutz

### Lebensmittelkontrolle

Dr. med. vet. Christoph Müller, Sektionsleiter  
Obere Vorstadt 14, 5000 Aarau  
Direkt 062 835 30 61, Telefon 062 835 30 20  
Fax 062 835 30 19  
christoph.a.mueller@ag.ch  
www.ag.ch/verbraucherschutz

iNLABTEC AG  
Dr. E. Freydl  
Oberstrasse 149  
9000 St. Gallen

21. Oktober 2016 Mü/Bericht Evaluierung Nutzen Pipettenfilter

### Bericht über die Evaluierung des Nutzens von iNLABTEC Pipettenfilter

Sehr geehrter Herr Dr. Freydl

Gemäss Ihrem Auftrag untersuchten wir ausserhalb des akkreditierten Bereiches als Lehrlingsarbeit, ob die von Ihnen zur Verfügung gestellten iNLABTEC Pipettenfilter als Hilfe zur Vermeidung von Kontaminationen von der Pipette her nützlich sind.

### Zusammenfassung

Das Ziel dieses Projektes war es herauszufinden, ob sich iNLABTEC Filter für grösservolumige Pipetten als Schutz vor Kontaminationen eignen. Die zur Verfügung gestellten Filter wurden in zwei 1000 µl Pipetten eingesetzt und künstlich mit 5 bis 50 µl einer Staphylococcus aureus Suspension in der Konzentration von  $5.4 \cdot 10^7$  KBE/mL kontaminiert. Danach wurde untersucht, ob beim Ansetzen von sterilen Wasserproben Rückkontaminationen auftreten. Von einem Filter wurde am selben Tag eine Keimzählung gemacht. Mit der zweiten Pipette wurden nach einem Tag Trocknungszeit nochmals Sterilproben angesetzt. Bei der optischen Kontrolle der Filteroberflächen vor dem Ansetzen der Sterilproben wurden keine Veränderungen (Tropfen oder Verkrustungen) festgestellt. Obwohl die bakteriologischen Untersuchungen der kontaminierten Filter Keimzahlen von  $1.9 \cdot 10^6$  respektive  $1.1 \cdot 10^6$  KBE/Filter erbrachten, waren bei den Sterilproben keine Kontaminationen feststellbar. Die Filter hatten somit die Kontaminationsflüssigkeit zurückgehalten und können als sinnvolles Hilfsmittel zur Vermeidung von Kontaminationen in der mikrobiologischen Routineanalytik eingesetzt werden.

### Einleitung

Bei unvorsichtigem Aufsaugen von Flüssigkeit mit grösservolumigen Pipetten können feine Spritzer entstehen, die sich auf der Innenseite der Pipette ablagern und später sporadisch das Pipettiergut kontaminieren können. In der Molekularbiologie werden deswegen in der Regel Pipettenspitzen mit Filter verwendet, die jedoch wesentlich teurer sind als solche ohne eingelassene Filter. Die Firma iNLABTEC vertreibt Filtereinsätze, die in die Öffnung von 1000 µl Pipetten passen. Ziel dieser Arbeit war es, den Nutzen, respektive das Rückhaltevermögen dieser Filter in der Praxis zu testen.

## Vorgehen

Als Kontaminant wurde ein *Staphylococcus aureus* Isolat aus der Stammsammlung des Labors genommen und damit eine Lösung von  $5.4 \cdot 10^7$  KBE/mL hergestellt. Für alle Keimzahlbestimmungen wurde das horizontale Verfahren zur quantitativen Bestimmung der aeroben mesophilen Keime (ISO 4833-1:2013) angewandt.

Ein iNLABTEC Filter wurde so in eine 1 Kanal Eppendorf Research plus Pipette mit 1000  $\mu$ l Fixvolumen eingesetzt, dass er noch etwa 1 mm über den Rand der Pipettenöffnung herausragte. Anschliessend wurde der Filter mit 5  $\mu$ l der Kontaminationsflüssigkeit beimpft. Unmittelbar danach wurde mit dieser Pipette 3 mal je 1 ml steriles Wasser in eine Petrischale gegossen, diese gemäss ISO 4833-1:2013 angesetzt, bebrütet und ausgewertet. Die selbe Prozedur erfolgte nach weiteren Kontaminationen von 5  $\mu$ l (Gesamtkontamination: 10  $\mu$ l), 10  $\mu$ l (Gesamtkontamination: 20  $\mu$ l) und 30  $\mu$ l (Gesamtkontamination: 50  $\mu$ l). Eine zweite Pipette wurde ebenso, aber direkt mit 50  $\mu$ l Kontaminationsflüssigkeit behandelt und damit eine Serie von 3 Sterilkontrollen angesetzt.

Der Filter der ersten Pipette wurde mit einer spitzen sterilen Pinzette entfernt, mit 100 ml gepuffertem Peptonwasser im Bagmixer (Interscience) auf Stufe 2 während 1 Minute gestomachert und einer Keimzahlbestimmung unterworfen. Die zweite Pipette wurde zur Trocknung der Kontaminationsflüssigkeit in der Steril-Bench gelagert und damit am nächsten Tag eine weitere Serie von 3 Sterilproben angesetzt. Anschliessend wurde analog dem ersten Filter die Keimzahl des zweiten Filters bestimmt.

Die auf den Sterilkontrollen gewachsenen Kolonien wurden abgeimpft und mittels Gramfärbung weiterdifferenziert. Zusätzlich wurden Sukkulturen auf Kaninchenplasma/Fibrinogen-Agar Platten (RPF, ThermoFisher Diagnostics) angelegt. Eine Kolonie aus der Verdünnungsstufe  $10^{-5}$  der Keimzählung des ersten Filters, wurde als Vergleich ebenfalls fraktioniert auf RPF Platten ausgestrichen und 2 Tage bei 37 °C inkubiert.

## Ergebnisse

Die Rohdaten und Ergebnisse der Keimzahlbestimmungen sind in der Tabelle 1 dargestellt. Die aus der Kontaminationsdosis berechnete theoretische Keimzahl der Filter beträgt 2.7 Millionen KBE. Somit lagen die Wiederfindungsraten bei 70 % respektive 41 %.

Tabelle 1: Rohdaten und Ergebnisse der Keimzahlbestimmungen

Bezeichnung	Verdünnungsstufe							KBE
	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	
Kontaminationsflüssigkeit	+++	+++	+++	+++	+++	53	6	54 Millionen/ml
Filter 1		+++	+++	187	24	1	0	1.9 Millionen/Filter
Filter 2		+++	+++	100	15	2	0	1.1 Millionen/Filter

Die Rohdaten der Sterilkontrollen sind in der Tabelle 2 aufgelistet. Von den 18 Platten der Sterilkontrollen zeigten 16 kein Wachstum. Bei 2 Platten wurde Wachstum von je 1 Kolonie beobachtet. Die daraus isolierten Keime waren gramnegative Kokken und wuchsen auf den RPF Platten nach 24 h bei 37 °C zu kleinen (Filter 1, Sterilkontrolle 10  $\mu$ l), respektive sehr kleinen (Filter 2, 1. Sterilkontrolle 50  $\mu$ l) hellen Kolonien. Sie zeigten also im Gegensatz zu der subkultivierten Kolonie vom Filter (schwarze Kolonien mit Koagulasehof) atypisches Wachstumsverhalten. Die Kolonien der Sterilkontrollen sind somit eindeutig als nicht vom Filter stammend zu bewerten.

Tabelle 2: Ergebnisse der Sterilkontrollen

Bezeichnung	Anzahl Kolonien auf		
	Platte 1	Platte 2	Platte 3
Filter 1, Sterilkontrolle 5 µl	0	0	0
Filter 1, Sterilkontrolle 10 µl	0	1	0
Filter 1, Sterilkontrolle 20 µl	0	0	0
Filter 1, Sterilkontrolle 50 µl	0	0	0
Filter 2, 1. Sterilkontrolle 50 µl	0	1	0
Filter 2, 2. Sterilkontrolle 50 µl	0	0	0

### Schlussfolgerungen

Die in diesen Versuchen erfolgte Gesamtkontamination der iNLABTEC Filter war weitaus stärker als sie in der Praxis auch bei unsorgfältigem Pipettieren zu erwarten ist. Die Kontaminationsvolumen wurden innerhalb kurzer Zeit von den beiden Filtern aufgesaugt, so dass keine optischen Veränderungen der Oberfläche festgestellt werden konnten. Die bakteriologischen Wiederfindungsraten von 70 % beziehungsweise 41 % bei den Filtern zeigt, dass die Keime nicht oder nur langsam inaktiviert werden und diese beim Homogenisieren in gepuffertem Peptonwasser nicht relevant von den Filtern zurückgehalten werden.

Das Auftreten vereinzelter Kolonien auf Agarplatten von an sich sterilen Proben ist normal, wenn nicht in einer sterilen Umgebung angesetzt wird. Die Gramfärbungen und das jeweils atypische Wachstum auf den spezifischen RPF Platten zeigt, dass sich die beiden festgestellten Kolonien unterscheiden und beide nicht vom Filter respektive der Kontaminationslösung stammen.

Die Ergebnisse der Sterilkontrollen demonstrieren, dass die geprüften iNLABTEC Filter ungewollte Kontaminationen wirkungsvoll unterbinden. Es ist trotzdem zu empfehlen, die Filter je nach Gebrauch in kürzeren oder längeren Intervallen regelmässig zu wechseln. Es ist damit zu rechnen, dass sich durch wiederholte Spritzer an den Filter mit der Zeit doch ein Belag oder eine Kruste an der Oberfläche bilden kann, welche zur Quelle von ungewollten Kontaminationen werden könnte.

Freundliche Grüsse

Dr. Christoph Müller  
Sektionsleiter

Beilage(n)

- Rechnung