



Abwischen von **Bakterien** von Laboroberflächen

SOP279

(3. Version)

Änderungen:

Version	Änderungen	Grund
3	Erweiterung des Katalogs von Probenahmestellen, Kap. 5	Fokus der Probenahmen hat sich auf "außerhalb" BSL2 erweitert
3	Vorgehen bei der Positivkontrolle, Kap. 5	Die Durchführung dieser Kontrolle vor Ort ist nicht mehr sinnvoll.
3	Überarbeitung der Medien	Zum Teil werden Medien von anderen Anbietern verwendet. Überarbeitung der Bestellnummern.

Verfasser: C. Bagutti

Die Entwicklung dieser Methode wurde zum Teil durch das BAG finanziert.

Erstellt		Freigegeben		Version-Nr.:	Dateiname:
am	durch	am	durch		
26/7/13	Dr	30.7.13	EJ	3	SOP279_3.doc

1 EINLEITUNG

1.1. ZWECK

Diese Methode beschreibt ein Routineverfahren zum Abwischen von Bakterien auf Laboroberflächen.

1.2. ANWENDUNGSBEREICH

Mit dieser Methode können Bakterien (getestet an *Campylobacter ssp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella ssp.*) von diversen Laboroberflächen (Arbeitsflächen, Geräten, Installationen) effizient abgewischt werden. Aus den so gesammelten Bakterien kann einerseits die DNA mittels Spezies-spezifischer 'real-time' PCR analysiert werden (z.B. gemäss SOP330 *P. aeruginosa*). Andererseits kann in diesen Proben die Lebendigkeit der Bakterien überprüft werden, indem die Bakterien angezüchtet werden und danach die Zunahme an nachgewiesener Spezies-spezifischer DNA als Grad für bakterielles Wachstum dient (gemäss SOP281: Nachweis von lebendigen Bakterien mittels direkter 'in-Kultur' 'real-time' PCR).

2 PRINZIP

Bakterielle Kontaminationen werden mit einem in Medium getränkten sterilen Wattestäbchen abgewischt. Als Medium wird ein gemäss Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) für die jeweiligen Bakterien geeignetes Anreicherungsmedium verwendet.

3 PRÜFEINRICHTUNGEN

(Wenn nicht mit einem * markiert, können auch Materialien, Geräte, Chemikalien und Lösungsmittel anderer Lieferanten resp. Hersteller verwendet werden.)

3.1. MATERIAL & GERÄTE

(Kunststoff- und Glasmaterialien müssen steril sein. Die Verwendung von aerosolgeschützten Pipettenspitzen dient als Schutz vor Kontamination.)

- Erhebungs-Rapport
- Kühlbox mit Temperatur-Logger
- Kamera
- Halter für Eppendorfröhrchen
- Diverse Kolbenhubpipetten
- Latex- oder Nitrilhandschuhe (puderlos)
- Sterile, einzeln verpackte Wattestäbchen (Stäbchen aus Holz!; z.B. Huber & Co. AG Art. Nr. 3.4814.01)
- Plastikverbrauchsmaterial:
 - aerosolgeschützte Pipettenspitzen (diverse)
 - 1.5 oder 2 ml Reaktionsgefässe mit 'Safe-Lock' (z.B. Eppendorf Art. Nr. 0030 120.094)
 - 15 ml graduierte Plastikröhrchen mit verschraubbarem Plastikdeckel (Typ Falcon; z.B. Fischer Scientific Art. Nr. N47188). Je nach Nährmedium werden diese auch direkt mit Medium gefüllt geliefert (z.B. Peptone Wasser von Oxoid (Art. Nr. TV 5013D) wird in Glasröhrchen geliefert)
 - Petrischalen (8 cm im Durchmesser)
 - Drigalski-Verteilstab (z.B. Milian Art. Nr. CO174CS05)

3.2. REAGENZIEN

(Es sind grundsätzlich analysenreine, für die Molekularbiologie geeignete Reagenzien zu verwenden.)

- Spezifisches (Anreicherungs-)Medium, welches für das Wischprozedere verwendet wird (Bsp.):

Spezies	Medium	möglicher Lieferant
Campylobacter [#]	Campylobacter Enrichment Broth (CEB) mit Skirrow Antimicrobial Supplement mit Campylobacter Growth Suppl.	Masciabrunelli Biolife 401286B2 Masciabrunelli Biolife 421840016 Masciabrunelli Biolife 421840021
Salmonella	Buffered Peptone Wasser	Oxoid BO1067S
P. aeruginosa S. aureus S. pneumoniae*	Tryptone Soya Broth (TSB)	Oxoid BO0351M

- Spezifischer Agar, welcher für das Ausstreichen der Referenzkurve verwendet wird (Bsp.):

Spezies	Medium	möglicher Lieferant
Campylobacter [#]	Campyloset	Biomérieux 43361
Salmonella P. aeruginosa S. aureus S. pneumoniae*	Blutagar (Columbia Agar mit Schafsblut)	Oxoid PB5039A

[#] Benötigt ein mikroaerophiles Inkubationsmilieu z.B. GENbag microaer-Beutel in Anwesenheit eines 'Gas generating'-Sachets (Biomérieux 45532) oder entsprechende Einstellung des Inkubators sofern möglich.

* Benötigt ein CO₂ Inkubationsmilieu z.B. GENbag CO₂-Beutel in Anwesenheit eines 'Gas generating'-Sachets (Biomérieux 45533).

3.3. LÖSUNGEN

- Bakteriensuspension (Referenzprobe): frische (d.h. am Tag der Probenahme) angesetzte dichte Suspension mit einem unbestimmten Titer der nachzuweisenden Bakterien.

4 AUSFÜHRUNG

- Die Probenahme erfolgt mit Latex- oder Nitrilhandschuhen.
- Für jede Wischprobe wird je ein 15 ml Reaktionsgefäß (Typ Falcon) mit 5 ml Nährmedium vorbereitet oder das von der Firma gelieferte Medienröhrchen direkt verwendet (siehe Material).
- Steriles Wattestäbchen aus der Verpackung nehmen (Achtung! Watte nicht kontaminieren) und Watte mit vorbereitetem Medium befeuchten.
- Zu untersuchende Oberfläche (50 - 100 cm²) mit dem Wattestäbchen mehrfach abwischen (je ca. 10 mal in der x- und y-Richtung, möglichst die gesamte Fläche abdeckend).
- Wattestäbchen im restlichen Wischpuffer ausquirlen.
- Abwischvorgang wiederholen.
- Wattespitze des Stäbchens im Reaktionsgefäß abbrechen.
- Wischprobe verschliessen und bis zur Weiterverwendung in der Kühlbox oder im Kühlschrank aufbewahren.

5 HINWEISE ZUR QUALITÄTSSICHERUNG

Die Qualität der verwendeten Referenzmaterialien und Reagenzien wird bei jeder Untersuchung „ad hoc“ überprüft. Dies erlaubt das Verwenden von Reagenzien über ihr allfälliges Verfalldatum hinaus. Ein möglicher Einfluss auf das Resultat wird damit erkannt.

Je nach Fokus der Probenahme (Kontaminationen im BSL2 Bereich und/oder Erkennung von Verschleppungen aus dem BSL2 in andere Teile des Gebäudes) werden Laboroberflächen und/oder Büro-/Gebäudeoberflächen beprobt. Die nachfolgende Liste gibt Beispiele zu möglichen Probenahmestellen, ist aber nicht zwingend und nicht abschliessend. Wird eine Probenahme ausschliesslich im BSL2 durchgeführt, sollten alle "Laborbereiche" (vgl. Tabelle unten) abgedeckt werden:

Laboroberflächen	Laborbereich	Büro- und Gebäudeoberflächen	Bereich
Arbeitsplatz in der Sicherheitswerkbank	MSCII	Computermaus in separatem Büro	Ausserhalb des BSL2 Containments
Zentrifuge (Rotorraum, Röhrenhalter)	Zentrifuge	Türgriff Büro, Seminarraum etc.	
Türgriff Inkubator, Kühlschrank etc.	Bedienelemente Geräte	Labortürgriff aussen	
Touchpanel MSCII, Autoklav etc.		Liftnopf	
Boden	allg. Laboroberflächen		
Labortisch			
Laborcomputer (Maus)	Stellen ohne Kontakt mit Organismus		
Labortelefon			
Labortürgriff innen			

- Pro Probenahme (Labor bzw. Institut) werden mindestens 10 Stellen beprobt.
- Für jede Probenahme wird ein Erhebungs-Rapport vorbereitet und ausgefüllt.
- Von jeder Wischstelle wird zum Dokumentieren eine Aufnahme mit einer Digital-Kamera erstellt.
- Für jede Probenahme müssen folgende Kontrollen mitgeführt werden:

- 1 Als **Negativkontrolle** (Reagenzienkontrolle) dient eine Probe mit 1 ml Wischpuffer, in den der Kopf eines Wattestäbchens ohne vormaliges Abwischen abgebrochen wird. Diese Kontrolle wird vor Abschluss der Probenahme durchgeführt.
- 2 Zeitgleich mit der Probenahme wird im KL BS 50 µl der Bakteriensuspension (**Referenzprobe**) in eine Petrischale in der Sicherheitswerkbank pipettiert. Der Tropfen wird mit Hilfe der Pipettenspitze verstrichen. Diese Petrischale wird mit leicht angehobenem Deckel solange in der Sicherheitswerkbank belassen, wie die Probenahme schätzungsweise dauert (normalerweise 1 - 1.5 Std). Nach Ablauf dieser Zeit werden die Bakterien auf der Petrischale, wie unter Kap. 4 beschrieben, abgewischt. Diese Kontrollprobe dient als **Positivkontrolle** für die weiteren Untersuchungen. Als Referenz zu dieser Positivkontrolle werden 50 µl der mitgeführten Bakteriensuspension direkt in das Nährmedium (5 ml in Röhren, vgl. Kap.4) gegeben.

6 VALIDIERUNGSUNTERLAGEN

Die Validierungsunterlagen bilden ein eigenes Dokument, um eine problemlosere Anpassung zu ermöglichen.