

## 3 Material und Methodik

### 3.1 Testgerät

Im Rahmen unserer Untersuchungen wurde ein Nieder-Temperatur-Plasma-Sterilisator vom Typ Sterrad<sup>®</sup> 200 (A.S.P., Johnson & Johnson Medical, Irvine, USA) mit spezieller Software-Ausstattung verwendet (Abb. 1).



Abb. 1: Sterrad<sup>®</sup> 200

(A.S.P., Johnson & Johnson Medical, Irvine, USA)

Dadurch konnte das Testgerät im sog. Halbzyklus betrieben werden, d. h., dass Anteile bestimmter Phasen des Sterilisationsprozesses verkürzt bzw. ausgelassen wurden. Diese Halbzyklenmethode (EN ISO 14937, 2001), auch „Overkill“ genannt, ist eine der am häufigsten genutzten Methoden zur Validierung von Sterilisationsprozessen. Diese Methode beruht darauf, dass ein Bioindikator mit  $10^6$  Mikroorganismen in der halben Einwirkzeit des Gesamtsterilisationsprozesses eine Keimreduktion von 6 log-Stufen attestiert. Der zweite Halbzyklus würde bei gleichen Prozessparametern nochmals eine Reduktion um 6 log-Stufen erbringen, wodurch das Sterilisationssicherheitsniveau (SAL) von  $10^{-6}$  erreicht wird.

Wichtigste Voraussetzung für diese Methode ist eine bei halblogarithmischer Darstellung lineare Absterbekurve des Testkeims, die für den ersten Halbzyklus nachgewiesen sein muss. Für den zweiten Halbzyklus kann die Gerade um weitere 6 log-Stufen bis zum Erreichen des Sterilitätssicherheitsniveaus  $10^{-6}$  ( $\log_{10}$ Überlebende = -6) extrapoliert werden (Abb. 2, Jacobs und Smith 1998).

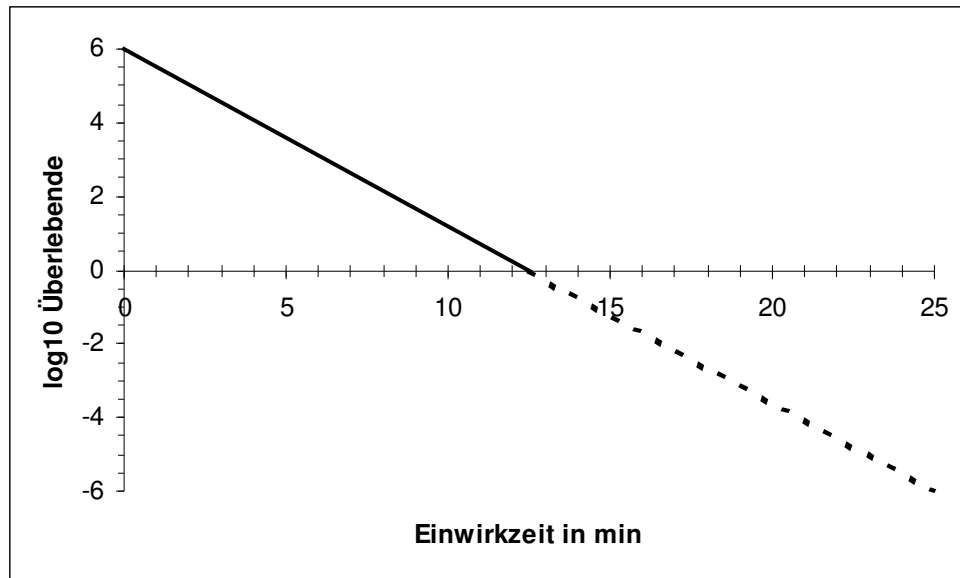


Abb. 2: Grafische Darstellung der Halbzyklenmethode  
(modifiziert Jacobs und Smith 1998)

Die Verwendung der Halbzyklenmethode dient ausschließlich Testzwecken, um die Wirksamkeitsgrenzen des Sterilisators herauszufinden. Die Geräte für die Routine können ausschließlich im Vollzyklus betrieben werden.

Der verwendete Sterrad<sup>®</sup> 200 kann für die Testsituation ebenfalls wie die vorhergehende Version 100 S im kurzen Halbzyklus für die Sterilisation ohne und im langen Halbzyklus für die Sterilisation mit Diffusionsverstärker betrieben werden.

Der Sterilisationsprozess durchläuft bei den verschiedenen Halbzyklen verschiedene Phasen, deren Zeitspannen der Tabelle 3 zu entnehmen sind.

Tab. 3: Phasenzeiten der Version Sterrad® 200 im kurzen und langen Halbzyklus bei einer Betriebsdauer von 66 min bzw. 89 min.

<b>Phasen</b>	<b>kurzer Halbzyklus (min)</b>	<b>langer Halbzyklus (min)</b>
Vakuumphase	30	45
Injektionsphase	7	7
Diffusionsphase	2	10
Plasmaphase	7	7
Belüftungsphase	20	20

Im einzelnen handelt es sich dabei um folgende physikalisch-chemischen Vorgänge (Abb. 3 und 4):

*(1) Vakuumphase („V“):*

Während dieser Phase wird ein Hochvakuum von 0,6 torr mittels Drehschieber-  
vakuumpumpe erzeugt. Die Dauer beträgt im kurzen Zyklus ca. 30 min und bei der  
Anwendung des langen Zyklus bis zu 45 min, da in diesem Modus das Vakuum viermal  
nach Belüftungsphasen von 1 min erzeugt wird. Diese Hochvakuumzeiten sind sowohl für  
den Testzyklus (half cycle), als auch für den Routinezyklus (full cycle) zutreffend.  
Zudem wird in dieser Phase durch das Anlegen einer hochfrequenten Spannung ein Luft-  
oder Preplasma (ohne Wirkstoff) erzeugt, was zur Konditionierung des Sterilisiergutes  
dient. Dadurch wird eventuell vorhandene Restfeuchtigkeit schneller abgedampft und  
damit die Erzeugung des Hochvakuums unterstützt (Rudolph und Hilbert 1997). Diese  
sehr geringen Druckverhältnisse werden zur Erzeugung des Nieder-Temperatur-Plasmas  
benötigt.

In der Praxis wird man nach erfolgter Desinfektion und Reinigung nicht immer völlig  
trockene Sterilisiergüter vorfinden. Deshalb ist es sinnvoll, dass ein Sterilisations-  
verfahren diese Praxisbedingungen berücksichtigt. Bei der NTP-Sterilisation wird deshalb  
eine Form plasmaunterstützter Vakuumtrocknung eingesetzt. Der Kammerdruck fällt bis  
weit unter den Gleichgewichtsdampfdruck des Wassers durch das Evakuieren der  
Sterilisationskammer. Das dem Sterilisiergut anhaftende Wasser beginnt zu verdampfen.

Die benötigte Verdampfungswärme wird dem Sterilisiergut und seiner direkten Umgebung (Sterilisationskammer) entzogen. Dadurch kühlt das restliche Wasser stark ab und kann im ungünstigsten Fall gefrieren.

Das Eis kann dann nur noch durch Sublimation in den gasförmigen Aggregatzustand übergehen. Die Sublimation erfolgt im Gegensatz zum Verdampfen um ein Vielfaches langsamer. Infolgedessen wird möglicherweise der angestrebte Unterdruck nicht in der dafür vorgesehenen Zeit erreicht und die Sterilisation noch in der Vakuumphase abgebrochen (Spencer und Addy 1996). Sollte das Vakuum trotzdem erreicht werden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass das Eis enge Lumina im Sterilisiergut blockiert und die Sterilität nicht erreicht wird. Einerseits wird diese Problematik durch die Sterilisationstemperatur von 50 °C bekämpft und andererseits sorgt das elektromagnetische Wechselfeld für ausreichend Energie zur Verdampfung des Wassers.

Außerdem kann man davon ausgehen, dass die Wechselfeldspannung in metallischen Sterilisiergütern Wirbelströme erzeugt, die eine zusätzliche, wenn auch nur geringfügige Erwärmung zur Folge haben dürften. Am Ende der Vakuumphase wird durch Einlaß steril gefilterter Raumluft in der Sterilisationskammer wieder Atmosphärendruck hergestellt (Jacobs 1997).

#### *(2) Injektionsphase („I“):*

In die Kammer werden über vier Einlässe 2500 µl einer 58%igen Wasserstoffperoxid-Lösung injiziert und im Hochvakuum verdampft. Dieser Vorgang ist für beide Zyklusversionen gleich und dauert 7 min. Am Ende dieser Phase liegt der Kammerdruck zwischen 12 und 14 torr. Bei der Geräteversion Sterrad® 200 findet erstmals eine Kontrolle der vorhandenen Wasserstoffperoxidkonzentration während des Sterilisationszyklus statt.

#### *(3) Diffusionsphase („D“):*

Der injizierte gasförmige Wirkstoff diffundiert in der gesamten Kammer aufgrund des geringen Druckes. Dadurch verteilt sich der Wasserstoffperoxiddampf auf den Ober-

flächen der eingelegten Sterilisiergüter. Dabei herrscht durch den Einlaß sterilgefilterter Luft ein Druck zwischen 15 und 30 torr in der Sterilisationskammer, um die Diffusion zu verbessern. Diese Phase dauert 2 min im kurzen Halbzyklus (Abb. 3) und 10 min im langen Halbzyklus (Abb. 4). Am Ende dieses Zyklusabschnittes wird durch erneute Vakuumerzeugung ein Druck von 0,6 torr erreicht, um Plasma erzeugen zu können.

*(4) Plasmaphase („P“):*

Durch Anlegen einer Wechselspannung wird Nieder-Temperatur-Plasma mit einer Leistung von 485 Watt erzeugt, welches 7 min im kurzen und langen Halbzyklus einwirkt. Die diffus in der Sterilisationskammer verteilten Wasserstoffperoxid-Moleküle werden angeregt und zum größten Teil in Radikale gespalten. Diese hochreaktiven Molekülbruchstücke interagieren mit bestimmten Zellkomponenten (Zellmembranen, Enzyme, Nukleinsäuren) der abzutötenden Mikroorganismen und unterbrechen so deren Lebensfunktion (Crow 1995). Durch die Interaktion verlieren die Radikale ihre hohe Energie und reagieren entweder zu Wasser und Sauerstoff oder zu anderen nahezu nichttoxischen Endprodukten (Feldman und Hui 1997). Die Temperatur in der Kammer von 50 °C wird während der gesamten Sterilisation nicht überschritten.

*(5) Belüftungsphase:*

Die Sterilisationskammer wird mit steril gefilterter Raumluft belüftet und der Atmosphärendruck hergestellt.

Die Dauer des kurzen Halbzyklus beträgt 66 min und der Durchlauf im langen Halbzyklus 89 min. Anschließend öffnet sich das Gerät bei der Version Sterrad® 200 auf der Gegenseite und das Sterilgut kann auf der räumlich getrennten „sterilen Seite“ entnommen werden.

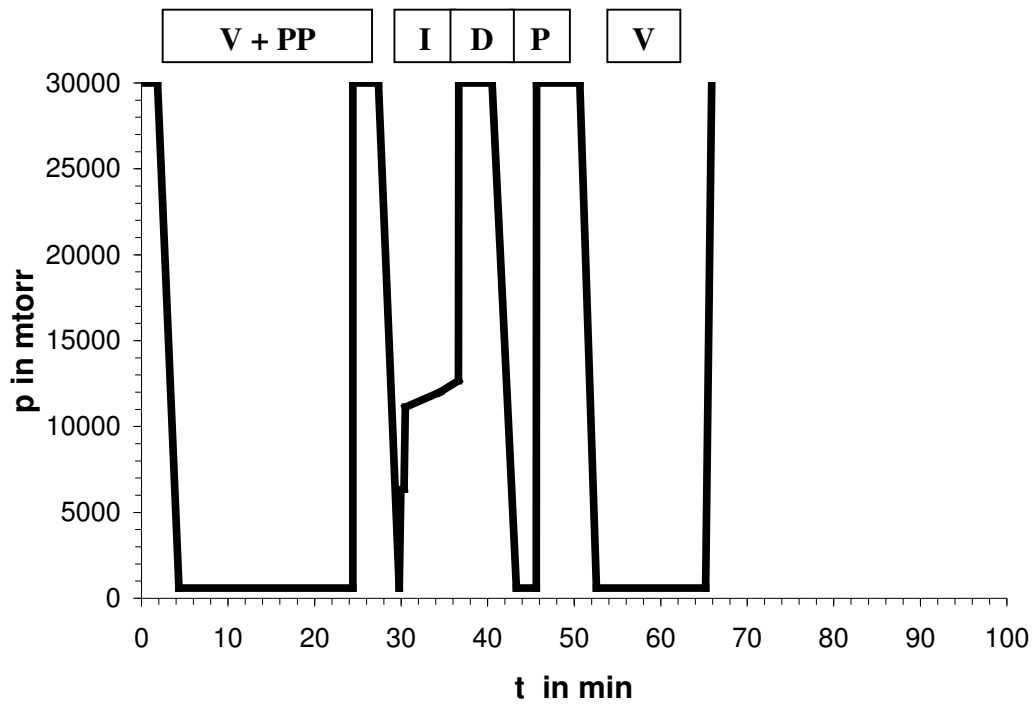


Abb. 3: Druckverlauf des Teststerilisationszyklus im Sterrad<sup>®</sup> 200 (kurzer Halbzyklus)

- |    |                 |   |                 |
|----|-----------------|---|-----------------|
| V  | Vakuumphase     | D | Diffusionsphase |
| PP | Preplasmaphase  | P | Plasmaphase     |
| I  | Injektionsphase |   |                 |

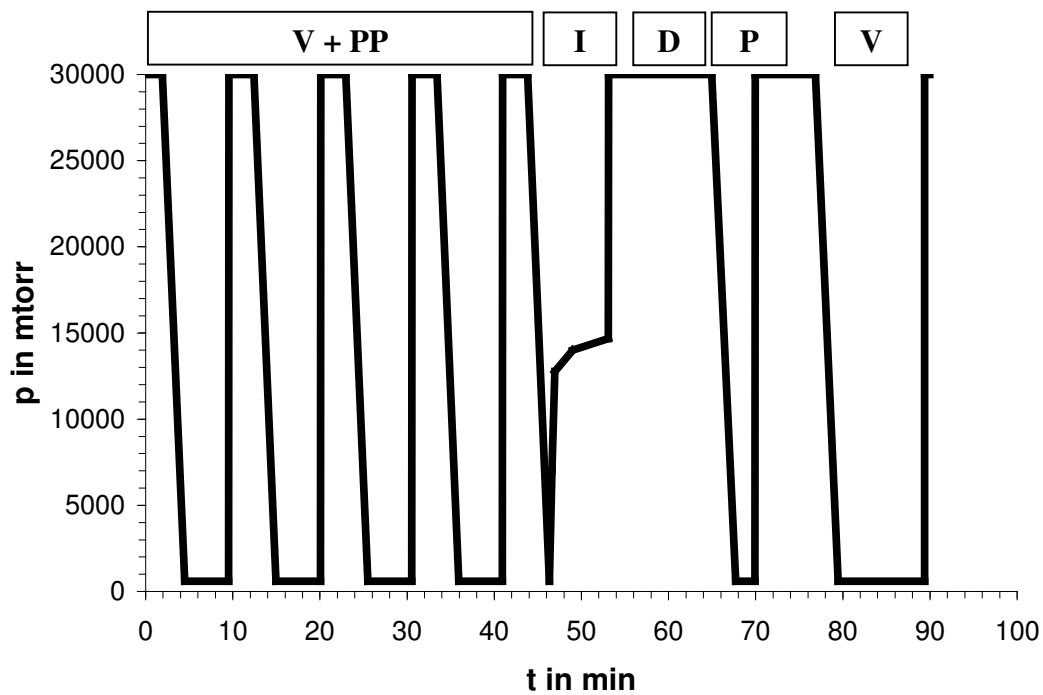


Abb. 4: Druckverlauf des Teststerilisationszyklus im Sterrad<sup>®</sup> 200 (langer Halbzyklus)

### 3.2 Prüfkörper

In Anlehnung an bereits durchgeführte Versuche der Arbeitsgruppe Borneff-Lipp et al. (1997, 1998) in den Geräteversionen Sterrad<sup>®</sup> 100 und Sterrad<sup>®</sup> 100 S verwendeten wir flexible und starre Endoskope als Prüfkörper, um eine entsprechende Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

Im Einzelnen handelte es sich dabei um folgende Produkte des Herstellers Richard Wolf GmbH, Knittlingen (Abb. 5-8):

1. Prüfkörper „flexibles Cranioskop“ ohne Optik (Länge: 70 cm, Innendurchmesser: 0,6 mm):

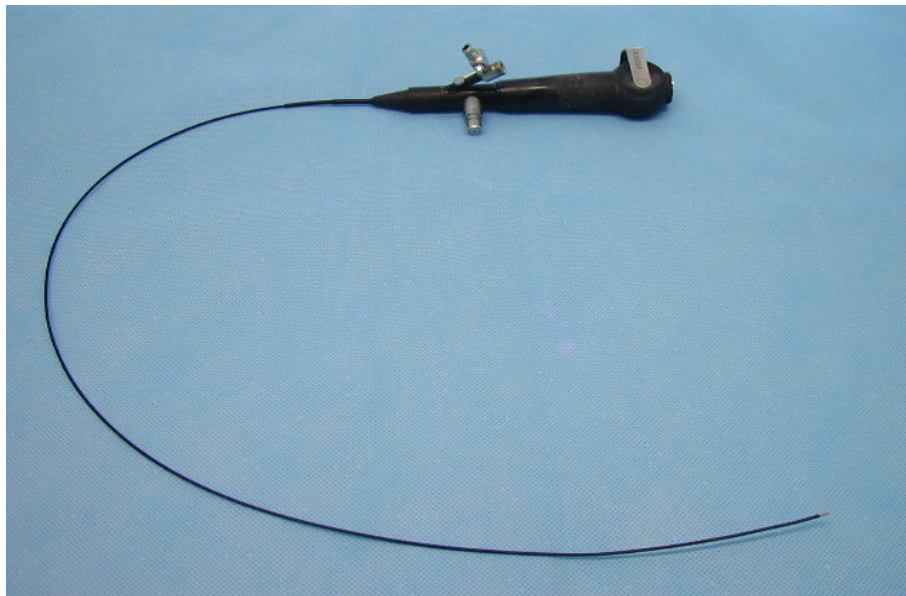


Abb. 5: Flexibles Cranioskop

2. Prüfkörper „starres Ureterorenoskop“ (Länge: 48,5 cm, Innendurchmesser: 1,7 mm):

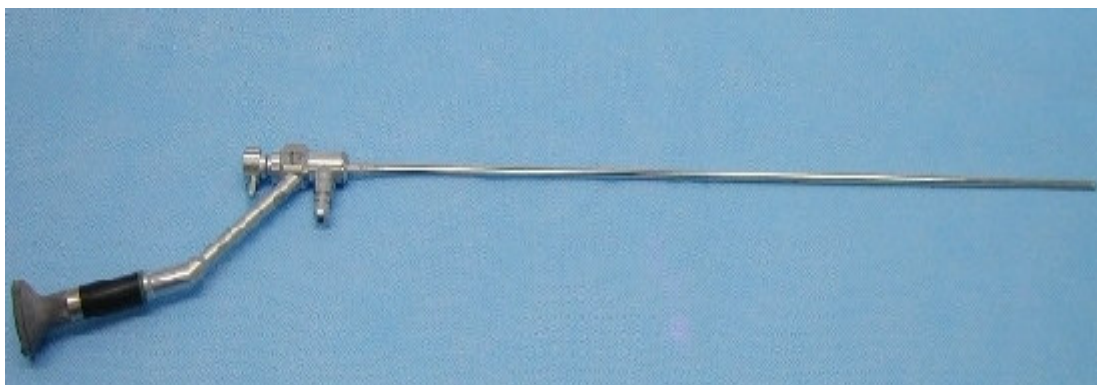


Abb. 6: Starres Ureterorenoskop



3. Prüfkörper „flexibles Gastroskop“ ohne Optik (Länge: 116 cm, Innendurchmesser: 2,8 mm):



Abb. 7: Flexibles Gastroskop

4. Prüfkörper „starres Laparoskop“ (Länge: 33 cm, Innendurchmesser: 5 mm):



Abb. 8: Starres Laparoskop



### 3.3 Validierungssets

Um während der Versuche eine Routinebeladung des Sterilisators zu simulieren, wurde das Gerät mit jeweils vier Sterrad<sup>®</sup>-Trays (Art.-Nr. 13621, A.S.P., Johnson & Johnson Medical, Irvine, USA) bestückt. Jedes Tray enthielt dabei die gleiche Art und Anzahl medizinischer Instrumente mit einer Masse von 2 kg. Dabei handelte es sich um folgendes Set mit metallischen und nichtmetallischen Werkstoffen (Zusatzbeladung, Tab. 4, Abb. 9):

Tab. 4: Art und Anzahl medizinischer Instrumente in einem Tray

Instrument	Anzahl	Instrument	Anzahl
Fiberoptic Cable	2	Adson Elevator	2
Mathieu Retractor	2	Guedel Airways	8
Richardson Retractor	2	Biopsy Brush	2
Codman Rongeur	2	Sealing Cap (red)	2
Backhaus Towel Clamp	6	Sealing Cap (gray)	2
Allis Tissue Forcep	2	Retractor	2
Suture Wire Scissors	2	Misc. Clamp (Forcep)	2
Rumel Thoracic Forcep	2	Trocar	2
Potts-Smith Tissue Forcep	2	Chisel	2
Children Dressing Forcep	2	Natural Rubber Tubing (1,30 m)	1

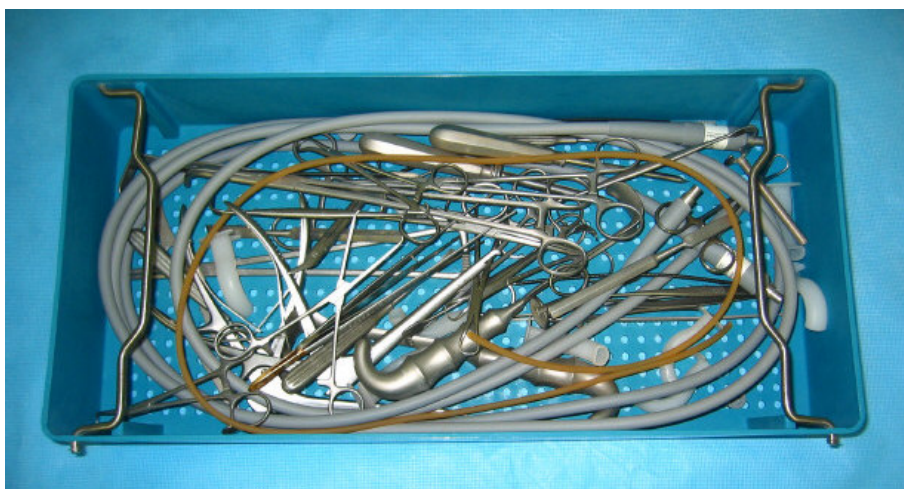


Abb. 9: Zusatzbeladung

Zusätzlich wurde in jedes Tray ein Sterrad<sup>®</sup>-Chemoindikatorstreifen (Abb. 10, Art. Nr. 14100, A.S.P., Johnson & Johnson Medical, Irvine, USA) zur Überprüfung der Injektion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> während des Sterilisationsprozesses beigelegt. Bei diesem Vorgang veränderte der Sterrad<sup>®</sup>-Chemoindikatorstreifen seine Farbe von rot nach gelb und zeigt damit an, dass der Wirkstoff mit dem Streifen in Kontakt war, nicht jedoch, ob die Parameter, wie z. B. Wirkstoffkonzentration und Zeit eingehalten wurden und somit die Sterilität gewährleistet ist (Schneider et al. 2000).

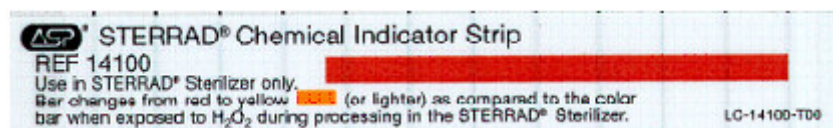


Abb. 10: Sterrad<sup>®</sup>-Chemoindikatorstreifen vor der Einwirkung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (A.S.P., Johnson & Johnson Medical, Irvine, USA)

Entsprechend DIN 58953 Teil 1 (1987) für Sterilgut wurden die Trays doppelt in Sterrad<sup>®</sup>-Sterilisationsbögen (Abb. 11, Art. Nr. 10740, A.S.P., Johnson & Johnson Medical, Irvine, USA) verpackt und mit Sterrad<sup>®</sup>-Chemo-Indikatorband (Art. Nr. 14200, A.S.P., Johnson & Johnson Medical, Irvine, USA) verschlossen.



Abb. 11: Doppelt in Sterrad<sup>®</sup>-Sterilisationsbögen verpacktes Sterrad<sup>®</sup>-Tray (A.S.P., Johnson & Johnson Medical, Irvine, USA)

### 3.4 Diffusionsverstärker

Manche Prüfkörper verlangen aufgrund ihres zu geringen Innendurchmessers oder zu großer Länge eine Wirkungsverstärkung. Mittels eines sog. Diffusionsverstärkers (Abb. 12, Sterrad<sup>®</sup> Booster, Art. Nr. 15400, A.S.P., Johnson & Johnson Medical, Irvine, USA) wurde über einen dem Prüfkörper angepassten Adapter aus Silikon (Art. Nr. 15400 oder 15403, A.S.P., Johnson & Johnson Medical, Irvine, USA) zusätzlich 145 µg 58%iges Wasserstoffperoxid in das Lumen des Endoskops befördert. Die Aktivierung dieses Hilfsmittels erfolgte durch Abziehen eines Sicherungsringes und einer 360°-Drehung des Diffusionsverstärkerkopfes frühestens 10 min vor Testbeginn. Die zusätzliche Menge an mikrobizidem Wirkstoff verdampft während der Vakuumphase und diffundiert in das Innere des Prüfkörpers.

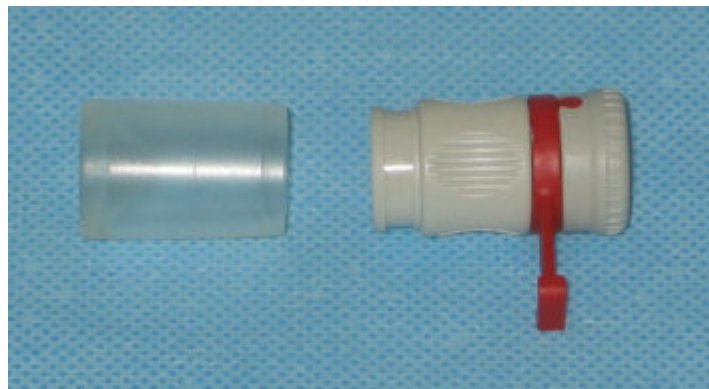


Abb. 12: Diffusionsverstärker mit Adapter (A.S.P., Johnson & Johnson Medical, Irvine, USA)

### 3.5 Testorganismen

Für sämtliche Versuche wurden Sporen von *Geobacillus (G.) stearothermophilus* ATCC 7953 als Testorganismen eingesetzt. Der ursprüngliche Stamm („mother crop“) wurde von Prof. Irving Pflug (Environmental Sterilization Laboratory, University of Minnesota, Minneapolis, USA) hergestellt und von uns weitergezüchtet. Die daraus hergestellte Sporenstamm suspension hatte eine Ausgangskeimzahl von  $2,0 \times 10^9$  koloniebildenden Einheiten pro ml (KBE/ml). Der D-Wert für die Dampf-Sterilisation der in den Versuchen verwendeten Chargen von *G. stearothermophilus* betrug in Suspension  $D_{121^\circ\text{C}} = 4,3$  min

(Analyse von Prof. Pflug vom 11.01.2001). Der D-Wert für die Plasmasterilisation (variable Diffusionszeiten, konstante Plasmazeit von 15 min, 50 % der Zusatzbeladung) wurde in Polyethylen-Röhrchen (Länge 31 cm, Innendurchmesser 6 mm) bei 2,65 min notiert.

Die geforderten Eigenschaften des Testkeims für unsere Versuche fanden wir bei *G. stearothermophilus*-Sporen in der bekannt hohen Resistenz gegenüber NTP-Sterilisation unter den untersuchten bakteriellen Sporen (Peters und Borchers 1995, Koller und Lessky 1996), die infektiologisch unproblematisch zu verwenden sind (Costin und Grigo 1974) und der Konstanz der Keimzahl bei längerer Lagerung, wie Versuche von Borneff et al. (1995) zeigten. Desweiteren kommt der verwendete Testkeim auch in der Formaldehyd-Sterilisation (nach DIN EN 866 Teil 5, 2000) und Dampfsterilisation (nach DIN EN 866 Teil 3, 1997) zum Einsatz; somit ist ein Vergleich zwischen den verschiedenen Sterilisationsverfahren möglich.

### 3.6 Keimzahlbestimmung der Sporenstammsuspension

Die Keimzahl der Sporenstammsuspension von *G. stearothermophilus* ATCC 7953 wurde im dreifachen Ansatz ermittelt, um einen Ausgangswert für die Berechnung zur Herstellung der Gebrauchssuspension zu erhalten. Nachdem die Stammsuspension für 2 min auf einem Reagenzglasschüttler (Reax top control, Heidolph, Art.-Nr. 444E1380, Merck-Eurolab, Darmstadt) geschüttelt wurde, sind unter sterilen Voraussetzungen dreimal 10 µl der Suspension zu 9990 µl sterilem, doppelt destilliertem Wasser pipettiert worden. Um eine Verunreinigung der Suspension durch vegetative Keime zu verhindern, wurden die Verdünnungen nach dem Schütteln für weitere 2 min, für 15 min auf  $100 \pm 1$  °C erhitzt und sofort danach für 15 min im Eisbad gekühlt. Bei den anschließend durchgeführten dezimalen Verdünnungsstufen wurde zwischen jeder Verdünnung 1 min lang geschüttelt.

Die Anzüchtung erfolgte mit Hilfe des Koch'schen Plattengussverfahrens entsprechend dem Vorgehen von Bodendorf (2000). Ein Milliliter der Verdünnungsstufen  $10^{-6}$  und  $10^{-7}$  wurde jeweils in eine 94 x 16 mm Petrischale (Art. Nr. 633102, Greiner, Frickenhausen) dreifach pipettiert. Danach wurden somit in 18 Petrischalen jeweils 20 ml Caseinpepton-Sojamehlpepton (CASO)-Agar (Art. Nr. 5458, Merck, Darmstadt) eingegossen und die Platten für ca. 45 min bei Raumtemperatur stehen gelassen, bis der Agar erstarrt war.

Die Petrischalen mit dem erstarrten Agar wurden für 48 h bei  $56 \pm 1$  °C bebrütet, wobei sie mit dem Deckel nach unten und in Folie verpackt gelagert wurden. Hierdurch sollte das Kondenswasser von den Kolonien ferngehalten werden und ein Austrocknen während der Inkubation verhindert werden. Um eine möglichst hohe Genauigkeit zu erhalten, wurden bei der Auswertung der koloniebildenden Einheiten nur Ergebnisse berücksichtigt, deren Keimzahlen zwischen 30 und 300 Kolonien betragen (American Public Health Association 1985).

### **3.7 Gebrauchssuspension**

Für die Testläufe war eine Konzentration pro Keimträger von  $1,0-2,0 \times 10^6$  Koloniebildenden Einheiten (KBE)/ml zu erreichen. Bei höheren Konzentrationen kann es einerseits zu Koagulationsphänomenen kommen, andererseits wird zur Wirksamkeitsprüfung eines Sterilisationsverfahrens nach dem Deutschen Arzneibuch (DAB 2005) und der United States Pharmacopeia (USP) 29 - National Formulary (NF) 24 (2006) eine Keimreduktion von 6 log-Stufen gefordert. Die Keimzahl der Sporenstammsuspension lag bei mindestens  $10^8$  KBE/ml. Deshalb musste eine Gebrauchssuspension vor der Kontamination durch Verdünnung der Sporenstammsuspension hergestellt werden.

Zur Verbesserung der Benetzbarkeit der Keimträgeroberfläche und Reduzierung der Aggregation der Sporen enthielt die Gebrauchssuspension 0,1 % Tween 80.

#### **3.7.1 Herstellung der Gebrauchssuspension**

Abhängig von der erforderlichen Gebrauchssuspensionsmenge und der Keimzahl der Sporenstammsuspension wurden die entsprechenden Teilvolumina 10%iges Tween 80 und Aqua bidest. errechnet, damit die gewünschte Keimzahl von  $2,0 \times 10^6$  erreicht wurde. Die benötigte Menge bestimmte sich durch die Anzahl der zu kontaminierenden Keimträger, wobei ein Keimträger mit 10 µl Gebrauchssuspension versehen wurde. Zunächst wurde unter einer sterilen Sicherheitswerkbank (Herasafe Typ HSP 12, Art.-Nr. 51012206, Heraeus, Gera) das erforderliche Volumen an Aqua bidest. in ein steriles Gewebekultur-Röhrchen (Art.-Nr. 525Q4210, Merck, Darmstadt) pipettiert. Dann wurde das erforderliche Volumen Tween 80

dazugegeben. Die Sporenstammsuspension wurde auf einem Reagenzglasschüttler für 2 min kräftig geschüttelt, um danach für 2 min in einem Eisbad zu verweilen. Nachfolgend wurde wiederum für 2 min geschüttelt und dann die berechnete Menge Stammsuspension mit einer Pipette abgenommen und zu dem mit Tween 80 versetztem bidestillierten Wasser gegeben. Das Gewebekultur-Röhrchen mit der hergestellten Gebrauchssuspension wurde 30 s geschüttelt und bis zur Kontamination der Keimträger bei 6–8 °C gelagert (Bodendorf 2000). Die Keimzahl dieser Gebrauchssuspension wurde nun in gleicher Weise wie für die Sporenstammsuspension bestimmt und somit vor der Kontamination überprüft.

### **3.7.2 Reinheitskontrolle**

Die Reinheitskontrolle wurde von der Sporenstammsuspension und der Gebrauchssuspension vor der Inokulation der Keimträger durchgeführt, um gegebenenfalls Verunreinigungen durch Bakterien und Pilze festzustellen.

Unter sterilen Voraussetzungen wurden jeweils 10 µl Suspension abpipettiert und auf eine Platte mit Sabouraud-Agar zur Erfassung von Pilzverunreinigungen (Art.-Nr. PO 5001 A, Oxoid, Wesel), zwei Platten mit Blutagar (Art.-Nr. 1.10455, Merck, Darmstadt) sowie auf zwei CASO-Agar-Platten zur Darstellung vorhandener Bakterien gegeben und ein Drei-Ösen-Ausstrich angelegt. Die Petrischalen wurden mit ihrem Deckel nach unten in Plastikfolie verpackt. Die Sabouraudplatte wurde für 7 Tage bei 22 °C bebrütet und die restlichen Platten für 48 Stunden, wobei jeweils eine Platte von einem Medium bei 37 °C bzw. 56 °C inkubiert wurde. Nach der entsprechenden Zeit wurde auf Reinheit überprüft. Kolonien, die auf CASO-Agar oder Blutagar bei 56 °C gewachsen waren, wurden auf ihre Morphologie unter dem Mikroskop (Olympus Model CH40RF200, Art.-Nr. 9D07784, Olympus Optical. Co., LTD.) untersucht. Wenn keine Anzeichen für eine Fremdkontamination der Suspensionen vorhanden waren, konnten diese verwendet werden.

## **3.8 Keimträger**

Die Testkeime wurden möglichst homogen auf spezielle Oberflächen („Keimträger“) aufgebracht. Für das Cranioskop und Ureterorenoskop wurde wegen ihrer engen Lumina V4A

Stahldraht (Abb. 13, Art.-Nr. 99057801, Weidling GmbH, Berlin) mit einem Durchmesser von 0,3 mm und einer Länge von ca. 1,5 cm als Keimträger gewählt. Das Gastroskop und das starre Laparoskop wurden mit Stahlcoupons der Größe 10 mm x 2 mm (Abb. 14, Art.-Nr. 99056700, Weidling GmbH, Berlin) bestückt. Versuche, bei denen der Keimträger unter sterilen Bedingungen ohne vorherige Teilnahme an einem Sterilisationszyklus durch den Prüfkörper gezogen wurde, zeigten eine hohe Reproduzierbarkeit bei der Rückgewinnung der Testkeime. Der V4A Stahldraht wurde am Stück geliefert und auf einem Reagenzglasgestell aus Edelstahl (Art.-Nr. 212Q6480, Merck, Darmstadt) aufgespannt. Beide Keimträgersorten wurden mit 70%igen Ethanol entfettet, um die Benetzbarkeit zu erhöhen. Das Reagenzglasgestell mit dem aufgespannten V4A-Stahldraht und die -Stahlcoupons wurden in Sterilisationsschläuche eingeschweißt und bei  $121 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  für 15 min im Varioklav Typ 400 EC (Art.-Nr. 140300697, H&P GmbH, Oberschleißheim) sterilisiert. Das Sterilgut wurde bis zur Inokulation bei Zimmertemperatur gelagert.



Abb. 13: Keimträger Stahldraht

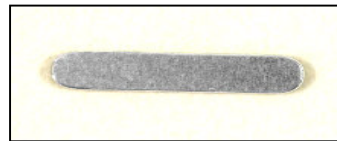


Abb. 14: Keimträger Stahlcoupon

### 3.8.1 Kontamination der Keimträger

Die Kontamination der Keimträger erfolgte nach dem von Okpara (1998) vorgeschlagenen Vorgehen zur Herstellung sogenannter Bioindikatoren. Die Keimträger wurden unter einer sterilen Werkbank (Herasafe Typ HSP 12, Art.-Nr. 51012206, Heraeus, Gera) ausgepackt und die Stahlcoupons zu 50 Stück in Petrischalen aus Glas der Größe 50 x 200 mm (Art.-Nr. 191130361, Anumbra, Glaswerk Wertheim, LHD, Heidelberg) ausgelegt. Dadurch konnte eine statische Aufladung und ein Anheften der Coupons untereinander und an der Seitenwand, wie dies bei Kunststoffpetrischalen erfolgt, verhindert werden.

Die Gebrauchssuspension wurde für 5 min in einem Ultraschallbad (Sonorex RK Super 102 P, 35 kHz, Bandelin, Berlin) beschallt, dann für 2 min ins Eisbad gestellt, für 2 min bei



2800 U/min geschüttelt und erneut für 2 min gekühlt. Der gesamte Zyklus wurde zweimal wiederholt. Im Anschluß wurde die Suspension 30 s geschüttelt und mit Hilfe einer Mehrfunktionspipette (Multipette 470, Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg) wurden jeweils 10 µl auf die Keimträger aufgebracht.

Nach 50 Kontaminationen wurde die Gebrauchssuspension wiederum für 10 s geschüttelt. Für die folgenden 24 h der Trocknung wurden die Stahlcoupons in halb abgedeckten Petrischalen und die Stahldrähte auf dem Reagenzglasgestell unter der sterilen Werkbank gelagert, das UV-Licht wurde währenddessen ausgeschaltet.

Anschließend wurden die Stahldrähte in ca. 1,5 cm lange Stücke geschnitten und in Petrischalen gesammelt. Alle Petrischalen wurden mit Klebeband verschlossen und für mindestens 96 h lichtgeschützt aufbewahrt. Danach wurden diese kontaminierten Keimträger zur Durchführung sämtlicher Versuche verwendet.

### 3.8.2 Keimrückgewinnung der inokulierten Keimträger

Zur Bestimmung der Keimzahl der Kontrollen wurden jeweils drei kontaminierte Stahldrähte bzw. Stahlcoupons in drei Reagenzglasröhrchen (25 x 150 mm, Art.-Nr. 261313309, Duran<sup>®</sup>, Schott, Mainz) mit Metalldeckel (CAP-O-TEST 24/26, Art.-Nr. 64.0395.43, Lüdi, Flawil, Schweiz), fünf sterilen Glasperlen mit 0,4 mm Durchmesser (Art.-Nr. 140683, Scherf Präzision, Ostheim) und 10 ml Rückgewinnungsflüssigkeit („stripping fluid“; 9,5 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 4,54 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 ml 10%igem Tween 80 ad 1000 ml Aqua bidest.) gegeben. Die Verarbeitung erfolgte mit folgenden Schritten (Okpara 1998, vgl. Abb. 15):

1. 5 min Beschallung im Ultraschallbad
2. 2 min Kühlung im Eisbad bei  $0 \pm 1^\circ\text{C}$
3. 2 min Schütteln bei 2.800 U/min
4. 2 min Kühlung im Eisbad  $0 \pm 1^\circ\text{C}$   
zweimalige Wiederholung der Schritte 1-4
5. 15 min im Wasserbad bei  $100 \pm 1^\circ\text{C}$
6. 15 min Kühlung im Eisbad bei  $0 \pm 1^\circ\text{C}$

Die Inkubation für 15 Minuten im Wasserbad bei  $100 \pm 1^\circ\text{C}$  diente zur Beseitigung eventuell vorhandener vegetativer Keime. Die zwischenzeitlichen Temperaturstürze auf  $0 \pm 1^\circ\text{C}$  sollten ein frühzeitiges Auskeimen der Sporen verhindern. Die Anzahl vorhandener Keime auf einem Keimträger wurde mittels einer dezimalen Verdünnungsreihe (Abb. 15) bis zur Verdünnungsstufe  $10^{-4}$  für jeden der überprüften Keimträger bestimmt. Dafür wurde von der Verdünnungsstufe  $10^{-4}$  dreimal für jeden Keimträger jeweils 1 ml mit Seropipetten (Falcon®, Art.-Nr. 357522, Becton Dickinson Labware Europe, Le Pont De Claix, France) in Petrischalen pipettiert.

Danach wurde jede dieser Petrischalen mit ca. 20 ml CASO-Agar gefüllt und eine Agarkontrolle angelegt. Nach ca. 45 min wurden alle Platten mit dem Deckel nach unten in Plastiktüten verpackt und für 48 h bei  $56^\circ\text{C}$  bebrütet. Die vorhandenen Keime je Platte wurden ausgezählt und das hieraus errechnete arithmetische Mittel wurde aus jeweils Parallel-Werten errechnet und diente als Tages-Kontrollwert.

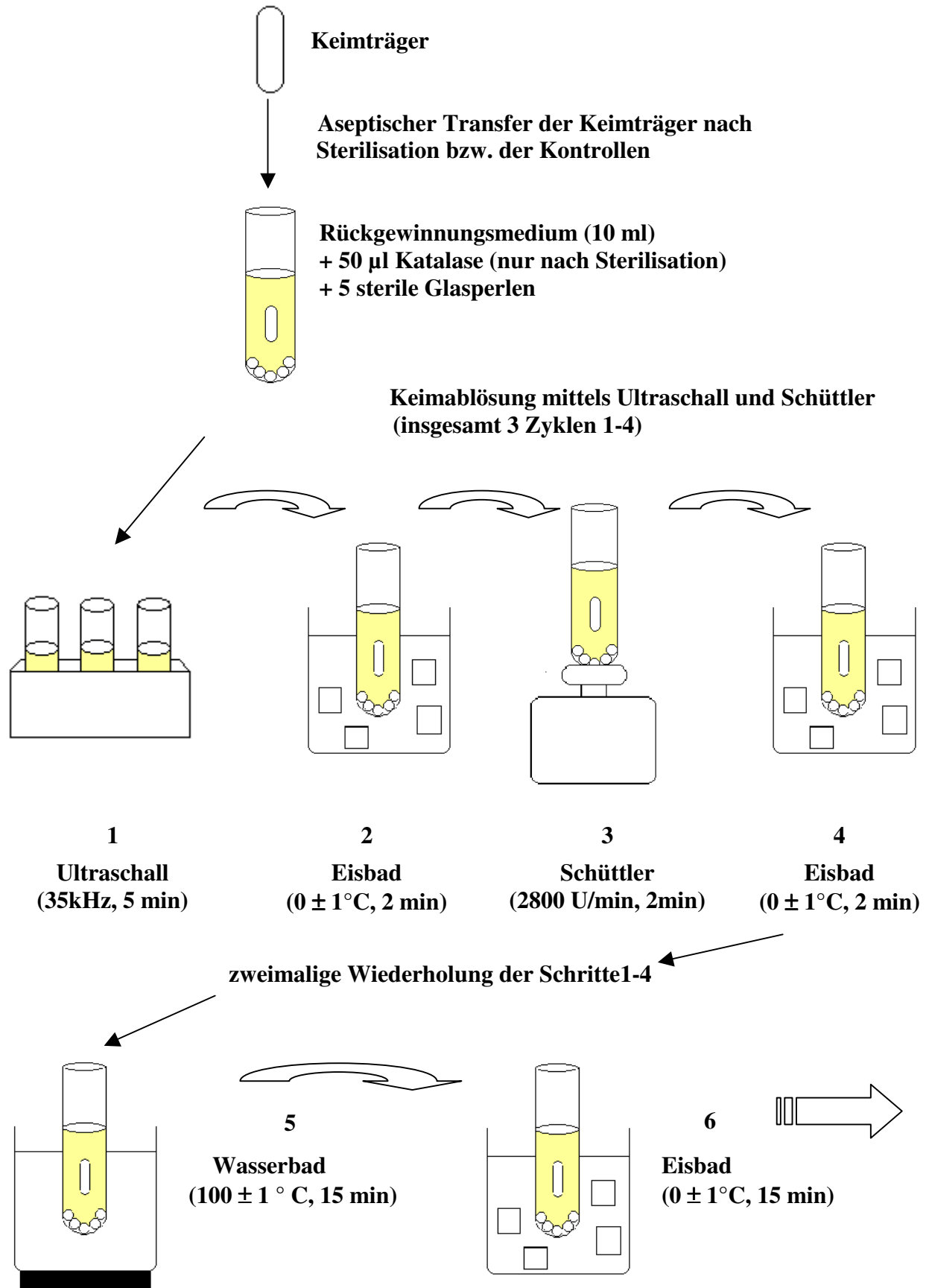


Abb. 15: Quantitative Bioindikatoren-Auswertung (modifiziert nach Okpara 1997)

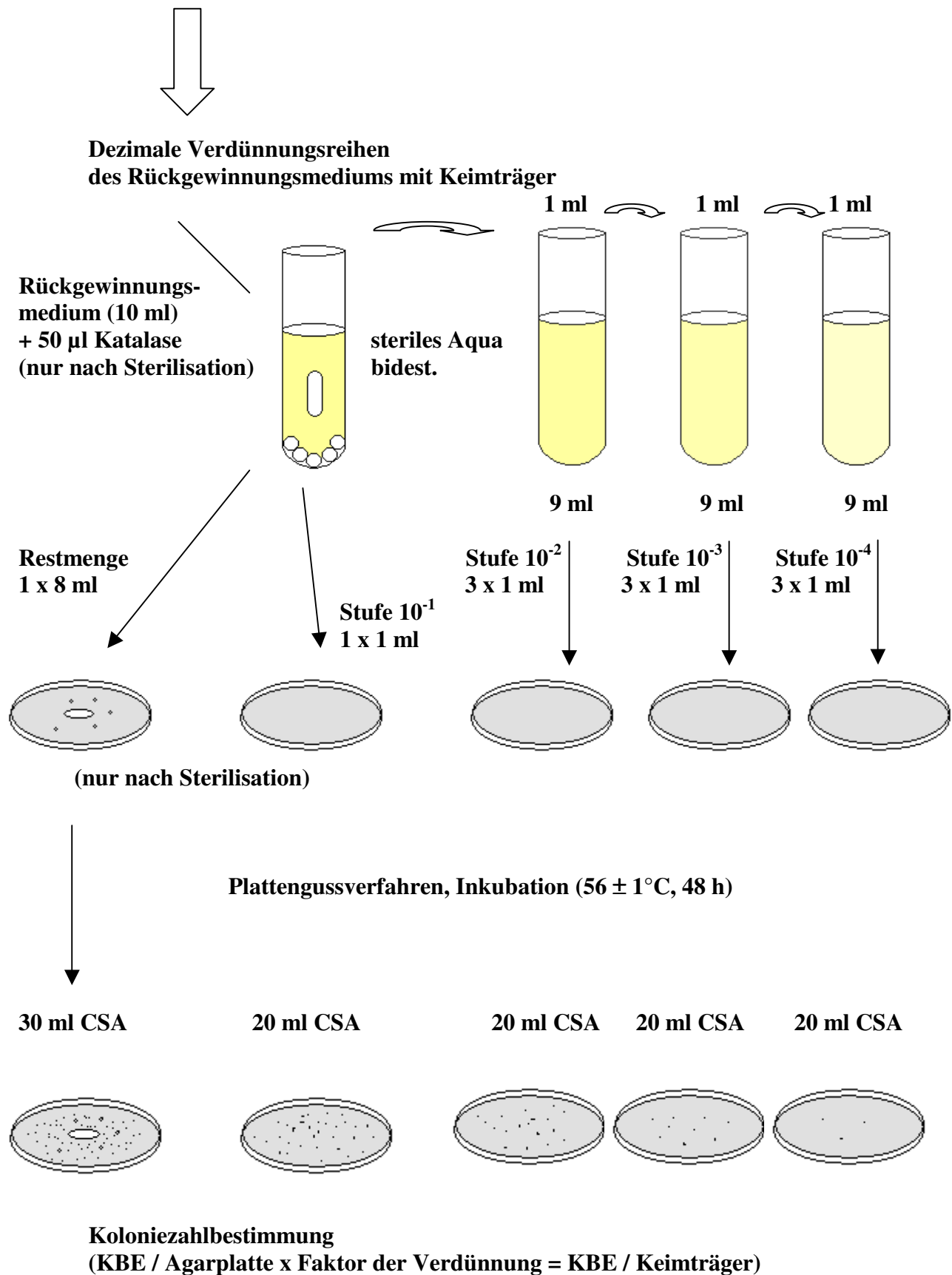


Abb. 15: Quantitative Bioindikatoren-Auswertung (Fortsetzung)

### 3.9 Durchführung der Sterilisationsversuche

Um bei jedem Zyklus mit Prüfkörperinhalt eine konstante Betriebstemperatur des Gerätes zu erreichen, wurde vorher ein Testlauf mit voller Beladung, aber ohne Prüfkörper durchgeführt („warm up“).

In einem Versuchslauf wurden jeweils 2 Prüfkörper getestet. Der für den Prüfkörper entsprechend hergestellte Bioindikator wurde zuvor mit Hilfe des für ihn spezifischen Führungsdrahtes in der Mitte des Prüfkörpers, d. h. des Arbeitskanals des Prüfkörpers, platziert. Dies repräsentiert eine worst-case Situation. Sollte ein Diffusionsverstärker verwendet werden, so wurde dieser mittels eines Adapters aus Silikon (Art. Nr. 15400 oder 15403, A.S.P., Johnson & Johnson Medical, Irvine, USA) jeweils mit einem Ende jedes Prüfkörpers verbunden und nicht früher als 10 min vor der Sterilisation aktiviert (siehe Kap. 3.4).

Die beiden Prüfkörper wurden stets gleich bleibend in ihrer Ablage auf die Zusatzbeladung (siehe Kap. 3.3) verteilt. Die beiden Beladungen je Ablage ergeben die Möglichkeit, den Prüfkörper links oder rechts zu positionieren. Bei jedem Sterilisationszyklus wurde die Position des Prüfkörpers innerhalb der Ablage gewechselt, wobei die beiden Prüfkörper je Testlauf immer seitenungleich eingebracht wurden. Daraus ergibt sich eine gleichmäßige Nutzung aller Positionen. Die beiden Trays mit Prüfkörperinhalt wurden mit einem Sterrad<sup>®</sup>-Chemioindikator versehen, doppelt in Sterilisationsvlies verpackt und mit Sterrad<sup>®</sup>-Indikator-Klebeband verschlossen (siehe Kap. 3.3).

Nach Ende des Versuchszyklus wurden die Prozessparameter ausgedruckt und die Trays entnommen und die Prüfkörper mit den Keimträgern in die sterile Werkbank gelegt. Nach der weiteren Verarbeitung der Bioindikatoren erfolgte eine Sterilisation der Prüfkörper (siehe Kap. 3.10).

Zwischen den Sterilisationsprozessen wurden Wartezeiten von jeweils 30 min eingehalten, um eine praxisnahe Situation einzuhalten.

Die jeweiligen Versuchsbedingungen der verschiedenen Prüfkörpertypen sind Tabelle 5 zu entnehmen.

Tab. 5: Übersicht über die Prüfkörpertypen und deren Testbedingungen

	<b>Prüfkörpertyp</b>	<b>Sterilisationsverfahren im Sterrad® 200</b>	<b>Zusatz- beladung</b>	<b>Keim- träger</b>	<b>Diffusions- verstärker</b>
1	Flexibles Cranioskop ohne Optik	langer Halbzyklus	4 fach	Stahldraht	mit
2	Starres Ureterorenoskop	langer Halbzyklus	4 fach	Stahldraht	mit
3	Flexibles Gastroskop ohne Optik	kurzer Halbzyklus	4 fach	Stahl- coupon	ohne
4	Starres Laparoskop	kurzer Halbzyklus	4 fach	Stahl- coupon	ohne

### 3.10 Auswertung der Bioindikatoren

In Anlehnung an bereits durchgeführte Versuche von Bodendorf (2000) im Sterrad® 100 S wurde für jede Prüfkörpersorte die qualitative Auswertung von 50 Bioindikatoren in 25 Sterilisationszyklen und die quantitative Auswertung von 10 Bioindikatoren in fünf Testläufen durchgeführt. Mithilfe der qualitativen Ergebnisse konnten wir feststellen, ob unter den geschaffenen Voraussetzungen im Lumen der Prüfkörper eine ausreichende Sterilisation der Bioindikatoren mit einer Wahrscheinlichkeit von 99,5 % erreicht wurde. Falls Keime überlebten, wurde der Reduktionsfaktor durch die quantitative Auswertung berechnet und gleichzeitig die qualitativen Ergebnisse bestätigt. Persistierendes Wasserstoffperoxid nach dem Sterilisationszyklus wurde durch Katalase (7500-16667 IU/ml, Art. Nr. 14331, A.S.P., Johnson & Johnson, Irvine, USA) inaktiviert, um eine nachträgliche Verminderung der Keimzahl zu verhindern (Curran und Evans 1940). Dafür wurde 1 Tropfen der Katalase in die Reagenzgläser gegeben.

An jedem Versuchstag wurde eine Wachstumskontrolle eines unbehandelten Keimträgers jeder Art (Stahldraht bzw. Stahlcoupon in 10 ml CASO-Bouillon), eine Reinheitskontrolle der benötigten Katalase (1 Tropfen Katalase in 10 ml CASO-Bouillon) und eine Negativkontrolle

der verwendeten Charge Bouillon (10 ml CASO-Bouillon) angelegt. Alle Referenzen wurden im Brutschrank bei  $56 \pm 1$  °C für 14 Tage bebrütet.

Außerdem wurden parallel zu den quantitativen Versuchen pro Testtag Keimzahlbestimmungen der Kontrollen und Negativkontrollen des verwendeten Agars durchgeführt.

### 3.10.1 Qualitative Bioindikatorenauswertung

Unter sterilen Voraussetzungen wurden die Bioindikatoren gemäß DIN EN ISO 11737, Teil 2 (2000) nach dem Testlauf in mit 10 ml CASO-Bouillon (Art. Nr. 5459, Merck, Darmstadt) und 1 Tropfen Katalase gefüllte Reagenzgläser überführt. Die Keimträger wurden mittels eines sterilen Drahtes in kompletter Prüfkörperlänge aus dem Prüfkörper herausgeschoben. Anschließend erfolgte die Inkubation bei  $56 \pm 1$  °C für 14 Tage, wobei alle 24 Stunden auf Veränderung der Bouillon überprüft wurde. Nach 14 Tagen wurde die Anzahl der Proben mit Wachstum denjenigen ohne Wachstum gegenüber gestellt.

Von jeder Bouillon mit Wachstum wurde eine Subkultur auf einer CASO-Agarplatte angelegt. Anschließend wurde ausgehend von 1 Kolonie ein Gram-Präparat angefertigt, um zu bestätigen, dass es sich um den Testorganismus handelt (siehe Abb. 12). Ein Sterilisationsverfahren wird per Definition als ausreichend gewertet, wenn nicht mehr als 68 % der Bioindikatoren Wachstum des Testkeimes im Halbzyklus aufweisen (siehe DIN EN ISO 14161, 2000). Das Vorgehen ist in Einzelschritten in Abbildung 16 dargestellt.



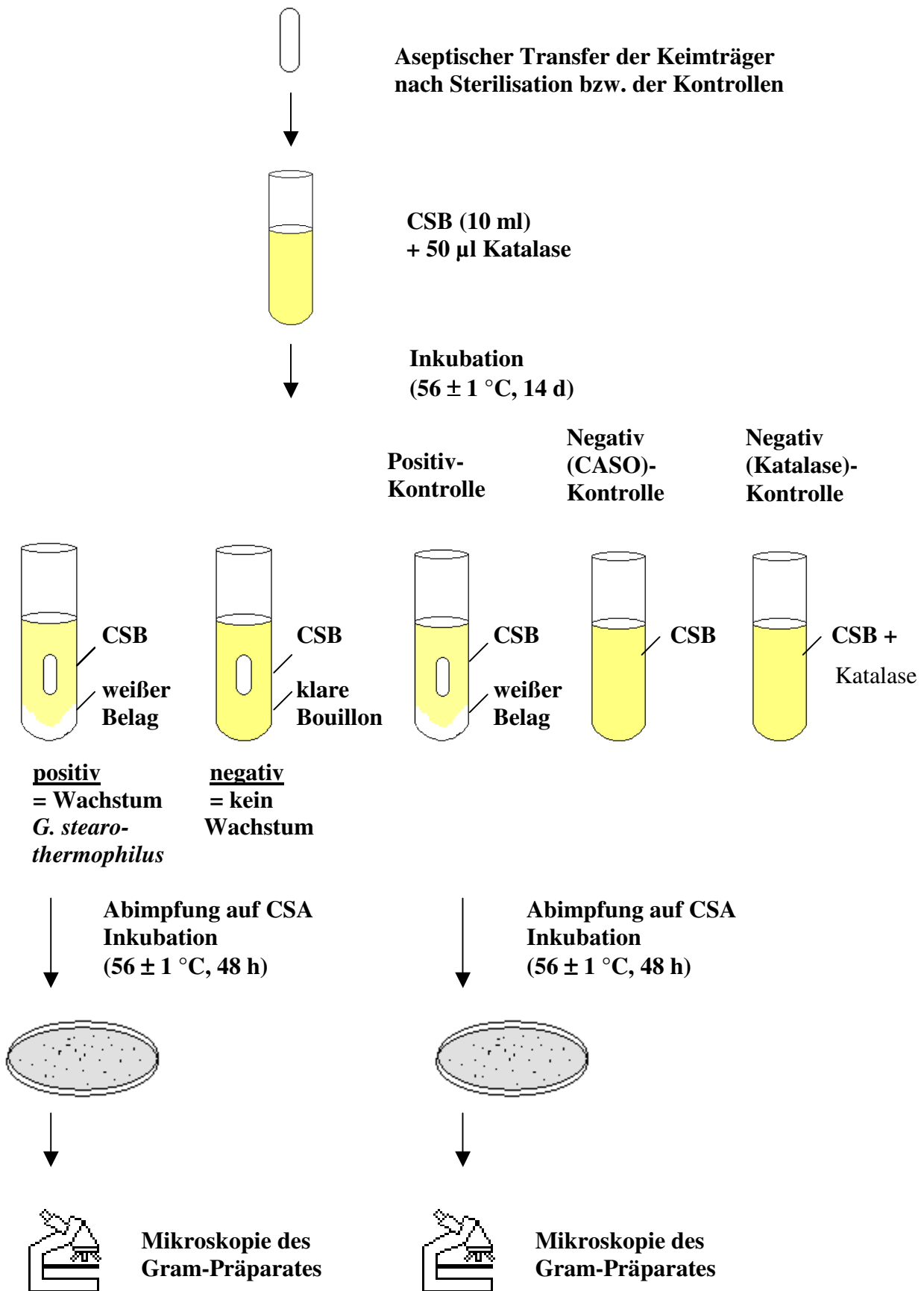


Abb. 16: Qualitative Bioindikatoren-Auswertung (modifiziert nach Okpara 1997)

### 3.10.2 Quantitative Bioindikatorenauswertung

Die quantitative Auswertung der sterilisierten Keimträger erfolgte wie bei der Keimzahlbestimmung der kontaminierten Keimträger („Kontrollen“) beschrieben (Kap. 3.8.2), jedoch ohne die in Abbildung 15 dargestellte Hitzebehandlung bei  $100 \pm 1$  °C und die anschließende Kühlung bei  $0 \pm 1$  °C. Außerdem wurde dem Rückgewinnungsmedium 50 µl Katalase zugegeben, um persistierendes Wasserstoffperoxid zu inaktivieren.

Mit dem hergestellten Rückgewinnungsmedium stellten wir Gussplatten mit CASO-Agar her. Nach 45 min Erstarrungszeit wurden die Platten zum Schutz gegen Austrocknung in Plastiktüten verpackt und mit dem Deckel nach unten gelagert, damit das Kondenswasser nicht auf den Agar tropfen konnte. Alle Platten wurden bei  $56 \pm 1$  °C für 48 Stunden bebrütet, bevor die KBE je Platte ausgewertet wurden.

Falls es möglich war, wurde die Summe der überlebenden Keime pro Keimträger ermittelt. Wenn Platten verschiedener Verdünnungsstufen eines Bioindikators Wachstum aufwiesen, wurde das gewichtete arithmetische Mittel der überlebenden Keime berechnet. Der Reduktionsfaktor RF ( $RF = \log_{10}$  Keimzahl vor Sterilisation -  $\log_{10}$  Keimzahl nach Sterilisation; vgl. Höller et al. 1993) wurde je Bioindikator ermittelt. Ein Sterilisationsverfahren wird definitionsgemäß (vgl. Block 1991) als ausreichend bewertet, wenn ein  $RF > 6$  im Halbzyklus erreicht wird.

### 3.11 Statistische Auswertung

Die statistischen Berechnungen sollten mit den berechneten Reduktionsfaktoren durchgeführt werden. Ein statistischer Vergleich der ermittelten Reduktionsfaktoren ist jedoch nicht sinnvoll, da die Anzahl der Keime, welche die Sterilisation überlebt haben, in allen Versuchen „0“ war.

Mathematisch ist der dekadische Logarithmus von „0“ nicht definiert. Zur Berechnung des Reduktionsfaktors muss daher die Anzahl der überlebenden Keime nach Sterilisation mit „1“ angenommen werden. Die Berechnung des Reduktionsfaktors wäre damit möglich, alle Schwankungen in den Reduktionsfaktoren würden in der Folge aber ausschließlich aus schwankenden Ausgangskeimzahlen resultieren.

Ein direkter experimenteller Nachweis der maximalen Leistungsfähigkeit des Sterilisators anhand der Abhängigkeiten des Reduktionsfaktors von Länge und Durchmesser des Endoskops ist auf diese Weise jedoch nicht möglich.

Es wurde sich daher darauf beschränkt, die Unterschiede der Ausgangskeimzahlen für die beiden Keimträger (Stahldraht, Stahlcoupon) darzustellen (siehe Kap. 4.7, Abbildung 17).