

**Mikrobiologische Testung der Sterilisation von  
Medizinprodukten**

**Inauguraldissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**vorgelegt von Goldberg, Jan  
aus Simmern (Hunsrück)**

**Gießen 2009**

Aus dem **Institut für Hygiene und Umweltmedizin**

des **Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH**, Standort Gießen

Direktor: **Prof. Dr. T. Eikmann**

Gutachter: **Prof. Dr. T. Eikmann**

Gutachter: **PD Dr. Dr. V. Alt**

Tag der Disputation: **18.02.2010**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>3</b>
1.1 Bedeutung der Sterilisation von Medizinprodukten .....	3
1.2 Aufbereitung von Medizinprodukten.....	5
1.3 Gesetze und Normen zur Aufbereitung von Medizinprodukten .....	10
1.4 Validierung des Dampfsterilisators vom 31.01. - 03.02.2006 in der ZSVA Gießen.....	15
<b>2. Material und Methode.....</b>	<b>18</b>
2.1 Geobacillus stearothermophilus .....	18
2.2 Herstellung und Begutachtung der Sporensuspension .....	19
2.2.1 Herstellung der Sporensuspension.....	19
2.2.2 Bestimmung der Keimzahl mit Verdünnungsreihen.....	21
2.2.3 Steigerung der Wachstumsaktivität nach Vorbehandlung .....	23
2.3 Versuchsdurchführung .....	24
2.3.1 Beschreibung der getesteten Medizinprodukte .....	24
2.3.2 Belastung der getesteten Medizinprodukte .....	26
2.3.3 Keimrückgewinnung .....	28
2.3.4 Kontrollen zur Keimrückgewinnung .....	30
2.3.5 Sterilitätskontrollen .....	30
2.3.6 Sterilisationsprozess.....	31
2.3.7 Ablauf der Prüfung .....	34
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>37</b>
3.1 Reinheit der Sporensuspension .....	37
3.2 Bestimmung der Sporenzahl in der Suspension .....	38
3.3 Hitzeaktivierung der Sporen .....	42
3.4 Ergebnisse der verschiedenen Keimrückgewinnungsmethoden .....	43

3.5 Ergebnisse der mikrobiologischen Prüfungen nach Sterilisation im Vollzyklus	44
3.6 Ergebnisse der mikrobiologischen Prüfungen nach Sterilisation im Halbzyklus	48
3.7 Zusammenfassung der Ergebnisse der mikrobiologischen Prüfungen .....	50
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>52</b>
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>61</b>
5.1 Zusammenfassung (deutsch) .....	61
5.2 Summary (english) .....	62
<b>5. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>63</b>
<b>6. Anhang .....</b>	<b>69</b>
6.1 Abbildungsverzeichnis .....	69
6.2 Tabellenverzeichnis .....	71
6.3 Abkürzungsverzeichnis .....	73
6.4 Materialliste .....	74
<b>8. Erklärung.....</b>	<b>75</b>
<b>9. Danksagung .....</b>	<b>76</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Bedeutung der Sterilisation von Medizinprodukten

Die Aufbereitung chirurgischer Instrumente ist ein wichtiger Faktor bei der Prävention von postoperativen Wundinfektionen. Unzulänglichkeiten innerhalb der Prozesskette können die Kontamination von mehreren Instrumenten bis hin zu einer ganzen Charge auf einmal bedeuten und somit eine Vielzahl von Infektionen verursachen. Nur durch kontinuierliche Kontrolle und die Optimierung der einzelnen Prozesse sowie durch Erfassung, Analyse und Beseitigung von Fehlern kann eine hohe Sicherheit für den Patienten vor Infektionen durch kontaminierte Instrumente erreicht werden (Abb. 1.1) [1-3].

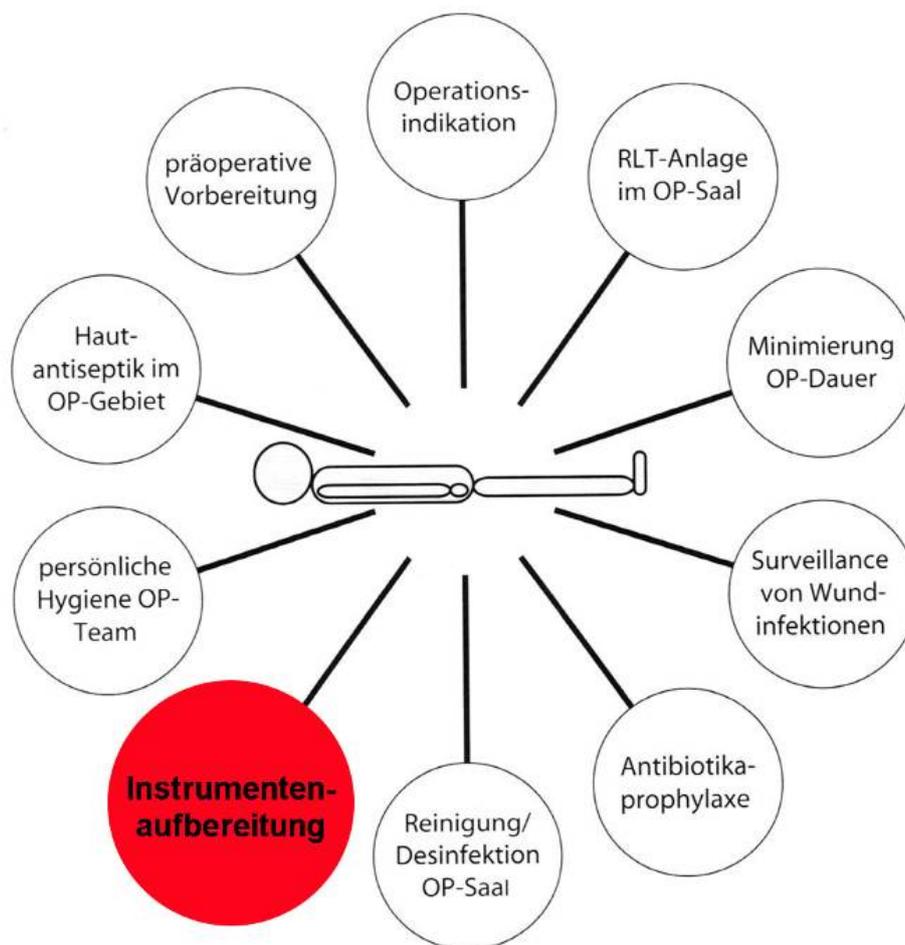


Abb.1.1: Schematische Darstellung von Einflussfaktoren bei der Prävention postoperativer Wundinfektionen [4]

Von allen im Krankenhaus erworbenen Infektionen sind Operationswunden nach den nosokomialen Pneumonien und Harnwegsinfektionen am dritthäufigsten [4, 5].

Alle operierte Schichten, Körperhöhlen und Organe können dabei von einer Infektion der Wunde betroffen werden. Dazu zählen die Haut und das subkutane Fettgewebe, die Faszie und die Muskulatur, Pleura und Peritoneum sowie Knochen und Gelenke [4, 6]. Das Risiko einer Wundinfektion wird maßgeblich durch den präoperativen Zustand des Patienten und die Art der Operation bestimmt (Tab.1.1).

**Tab.1.1: Beispiele für Gesamtzahlen (alle Risikogruppen) von Wundinfektionen bei 4 ausgewählten Operationsarten [7]**

<b>Operationsart</b>	<b>Anzahl Operationen</b>	<b>Anzahl Wundinfektionen</b>	<b>gepoolter arithm. Mittelwert</b>
<b>Appendektomie</b> (laparoskopisch)	<b>7156</b>	<b>82</b>	<b>1,15</b>
<b>Appendektomie</b> (offen chirurgisch)	<b>7773</b>	<b>287</b>	<b>3,69</b>
<b>Hüftendoprothese</b> bei Arthrose	<b>41507</b>	<b>459</b>	<b>1,11</b>
<b>Hüftendoprothese</b> bei Fraktur	<b>8358</b>	<b>262</b>	<b>3,13</b>

Hohes Alter, Adipositas, chronische Erkrankungen oder aus anderen Gründen reduzierter Gesundheitszustand korrelieren mit einem erhöhten Risiko postoperativer Wundinfektionen [4, 8, 9]. Die demographische Entwicklung in Deutschland sowie die Möglichkeiten der postoperativen Versorgung führen dazu, dass der Anteil für Wundinfektionen prädisponierter Patienten bei chirurgischen Eingriffen eher zunimmt. Operierte Patienten werden älter und haben häufiger schwere Begleiterkrankungen. Die Dauer des chirurgischen Eingriffs und der Kontaminationsgrad des Operationsfeldes sind weitere Risikofaktoren [10, 11]. Die Optimierung der gesamten Prozesskette, also auch der Instrumentensterilisation, gewinnt daher für die Prävention von Infektionen an Bedeutung, um für Patienten hohe Sicherheit zu gewährleisten.

Die Folgen einer postoperativen Infektion können ein verlängerter Krankenhausaufenthalt, ein beeinträchtigter Heilungserfolg und auch Invalidität und Tod sein [12-14]. Es entstehen durch notwendige Revisionseingriffe um ein Vielfaches verlängerte Krankenhausaufenthalte und dadurch auch wesentlich höhere

Kosten [15, 16]. Für alle Beteiligten ist deshalb die Verhinderung von Wundinfektionen sowohl aus medizinischen als auch ökonomischen Gründen von essentieller Bedeutung.

Bakterien sind die mit Abstand häufigsten Verursacher von Wundinfektionen. Die Haut des Patienten stellt dabei die Hauptquelle dar. Auch eine Kontamination durch residente Flora des Operationsteams ist möglich. Daneben können auch Mikroorganismen aus der Umwelt durch kontaminierte Wunden oder Verwendung nicht-steriler Medizinprodukte eine Wundinfektion auslösen [4].

## 1.2 Aufbereitung von Medizinprodukten

Produkte, welche als steril bezeichnet werden, müssen den Anforderungen auf Sterilität entsprechen. Ausgehend von einer Kontaminationsrate der Medizinprodukte mit  $10^2$  -  $10^4$  vermehrungsfähigen Keimen wird nach der Aufbereitung ein „Sterility Assurance Level“ (SAL) von  $10^{-6}$  erwartet. Dies bedeutet, dass lediglich ein Produkt von 1 Million sterilisierten Einheiten mit einem Keim belastet sein darf [17-21]. Das Ergebnis eines Sterilisationsprozesses hängt vom Kontaminationsgrad des Sterilisiergutes und entsprechend fachgerechter Aufbereitung ab.

Der Ablauf bei der Sterilgutaufbereitung besteht aus mehreren Einzelschritten [17, 18, 22]:

- sachgerechtes Vorbereiten (Sammeln, Vorreinigen, sicheres Verpacken und Transport zum Ort der Aufbereitung)
- Reinigung/Desinfektion, Spülung, Trocknung
- Prüfung auf Sauberkeit und Unversehrtheit
- Pflege, Instandsetzung und Funktionsprüfung
- Kennzeichnung
- Verpackung
- Sterilisation

Alle Schritte der Aufbereitung müssen untereinander und auf den jeweiligen Gegenstand abgestimmt und optimiert sein. Dazu muss auch die vorausgegangene und nachfolgende Verwendung des Produktes beachtet werden. Jeder Fehler innerhalb der Prozesskette beeinflusst das Ergebnis negativ [17-19, 22, 23].

Als Folge können Infektionen und pyrogenbedingte, allergische oder toxische Reaktionen verursacht werden [4, 18, 24]. Außerdem ist eine Beschädigung der Instrumente bei unsachgemäßer Aufbereitung möglich [25].

Sterilisation ist definiert als Inaktivierung durch Keimzahlreduzierung, so dass höchstens ein lebender Mikroorganismus in  $10^6$  sterilisierten Einheiten des Endproduktes auftritt [17, 22]. Dafür existieren folgende Verfahren:

- thermisch (Flamme, trockene Luft, Sattdampf)
- chemisch (Oxidationsmittel, Radikale, Alkohol, Formaldehyd, etc.)
- Strahlung (UV,  $\gamma$ )
- Filtration

Die Wahl des Verfahrens richtet sich nach den Eigenschaften des Sterilguts (z.B. Temperaturbeständigkeit) sowie nach Art und Umfang der Kontamination. Die physikalische Sterilisation mit gesättigtem Wasserdampf (feuchte Hitze) bietet für die Aufbereitung von Medizinprodukten in Krankenhäusern die größten Vorteile und gilt nach wie vor als die zuverlässigste Methode zur Inaktivierung bzw. Abtötung von Mikroorganismen [17, 23, 24, 26, 27].

Der Wasserdampf erreicht dabei Temperaturen von 120-135 °C bei einem Druck von 2-3 bar. Mit steigendem Druck erhöht sich die Temperatur, bei der das Wasser in die Dampfphase übergeht. Gesättigter Wasserdampf (Sattdampf) befindet sich im Phasengleichgewicht mit der Flüssigphase und ist zur Sterilisation am besten geeignet. Überhitzter Wasserdampf (Trockendampf) ist dagegen aufgrund sehr niedriger Wärmeübergangswerte ebenso ungeeignet wie Naßdampf, bei welchem das Sterilisiergut übermäßig befeuchtet wird. Nasses Sterilgut gilt als unsteril. Die Energie des Wasserdampfes (646,4 kcal/kg bei 120 °C) sorgt als Kondensationswärme für die Erhitzung des Sterilisiergutes und somit für die Inaktivierung der Mikroorganismen. Durch die Kondensation auf dem kühleren Kesselfüllgut entsteht eine starke Volumenminderung, welche wiederum einen Nachschub an Sattdampf in den Kessel bewirkt und einen permanenten Wärmetransport auf das Sterilisiergut aufrechterhält [20, 22, 28, 29]. Der Sterilisationsvorgang erfolgt allgemein in **3 Phasen** [30]:

- **Entlüftung oder Evakuierung der Kammer und des Sterilgutes**

Um die Bildung von Luftblasen in dem Dampf zu verhindern, erfolgt die Dampfsterilisation in der Kammer des Autoklaven zuerst nach Entlüftung (Evakuierung). Das gebräuchlichste Verfahren ist das "fraktionierte Vorvakuumverfahren". Die Kammer wird mehrmals evakuiert im Wechsel mit Dampfeinströmung. Dann wird Dampf eingelassen bis zum Erreichen des Betriebdruckes. Der Dampf wird in einem Dampferzeuger aus entmineralisiertem Wasser (DIN EN 285 und 13060) produziert.

- **Sterilisation** (Haltezeit bei maximalem Druck und Temperatur)

Die Sterilisationsphase setzt sich zusammen aus der Ausgleichszeit (abhängig von Art, Größe und Gewicht der Ladung), der Abtötungszeit (Haltezeit, mindestens 3 Minuten bei 134 °C) und dem Sicherheitszuschlag (üblicherweise zusätzlich 2 Minuten).

- **Nachbereitung, Trocknung des Sterilgutes**

Bei dem Vorvakuumverfahren wird das Sterilgut mittels Vakuum getrocknet. Die Restfeuchtigkeit (Kondensat) verdampft und wird über die Vakuumleitung abgeleitet. Das Kondensat darf bei Instrumenten nicht mehr als 0,2% vom ursprünglichen Nettogewicht nach 20 Minuten betragen (unabhängig vom Sterilisationsverfahren) [30]. Das Ergebnis der Dampfsterilisation wird wesentlich durch folgende Faktoren beeinflusst [17]:

- die Art der Mikroorganismen und ihre Hitzeresistenz
- die Ausgangskeimzahl
- die Umgebungsbedingungen (Einschließung der Keime in schützende Schmutz- und Fetthüllen
- Dampfsättigung (Restluftanteil)
- Temperatur
- Behandlungszeit

Das biologische Wirkungsprinzip der Abtötung von Mikroorganismen beruht auf einer Wärmeeinwirkung pro Zeit, wobei der gesättigte Wasserdampf als Wärmeüberträger fungiert. Es wird davon ausgegangen, dass es zu einer irreversiblen Denaturierung und Koagulation von Membranproteinen der Zellen kommt, wobei die zur Aufrechterhaltung der Kolloidstabilität und des kolloidosmotischen Druckes erforderlichen Adhäsions- und Kohäsionskräfte aufgehoben werden [24]. Andere Theorien erklären die keimtötende Wirkung des Wasserdampfes mit einer Abspaltung von Kohlensäure, Schwefelwasserstoff und Ammoniak [31] oder einer Hydratation und Eiweißhydrolyse [28].

Die Abtötungskinetik einer Keimpopulation als Folge eines Sterilisationsprozesses wird unter anderem durch den D-Wert beschrieben. Dieser dient der theoretischen Betrachtung und der Bewertung der Effizienz der Keim-Eliminierung. Der D-Wert (auch D10-Wert, Dezimalreduktionswert, Destruktionswert, decimal reduction time) ist die Zeit (in Minuten), welche erforderlich ist, die Keimzahl bei einer bestimmten Temperatur um eine Zehnerpotenz zu reduzieren. Dies entspricht einer Abtötungsquote oder Senkung der Lebendkeimzahl von 90%. Durch die Ermittlung von D-Werten unter gleichen Bedingungen ist es möglich, Keime anhand ihrer Hitzeresistenz zu vergleichen. Im Bereich der Letaltemperaturen bewirkt jede Temperaturerhöhung eine Verkürzung der Zeit, die zur Inaktivierung eines bestimmten Teils der Mikroorganismen erforderlich ist [17]. Empirisch wurde festgestellt, dass zwischen dem D-Wert und der Temperatur T ein einfach-logarithmischer Zusammenhang besteht:

$$\text{Log } D_1/D_2 = T_2 - T_1/z$$

$D_1$  = D-Wert bei Temp.1,  $D_2$  = D-Wert bei Temp.2,

$z$  = z-Wert in Kelvin, abhängig von der Art der Mikroorganismen, Entwicklungszustand und Milieu

Die experimentelle und mathematische Bestimmung des D-Wertes ist in der DIN EN 866-1 beschrieben [32].

Jede Art von Mikroorganismen weist eine unterschiedliche Thermoresistenz auf (Tab.1.2). Verantwortlich für die Resistenz ist in den meisten Fällen Dipicolinsäure (Pyridin-2,6-Dicarbonsäure, aromatischer Heterocyclus), welche während der Sporulation von Mikroorganismen gebildet wird und oft als Chelat mit Calcium vorliegt. In der Biotechnologie werden bei bakteriellen Prozessen Temperaturen ab 50° C als thermophile Bedingungen bezeichnet [33].

Tab.1.2: gestufter Wirkbereich entsprechend der Thermostabilität der Mikroorganismen [21]

Resistenzstufe	Organismus	Temp. [°C]	Zeit [min]
I	Vegetative Bakterien, Pilze, Pilzsporen	80-100	5-10
II	Sporen von B.anthraxis und B.subtilis, HAV, HBV	105	5-10
III	Native Erdsporen, <b>Sporen von B. stearothermophilus</b> , Clostridien-Sporen	134	3
		121	15
IV	Sporen thermophiler Gram-positiver Stäbe	134	>30
V	Prionen (CJK, vCJK, BSE)	134	60

Vor der Freigabe müssen alle aufbereiteten Medizinprodukte direkt oder auf der Verpackung gekennzeichnet werden und folgende Informationen enthalten [17, 18]:

- Bezeichnung des Medizinproduktes zur Identifizierung (z.B. Größe, Modell)
- Freigabeentscheidung zur Nutzung
- Zeitpunkt und Art des verwendeten Sterilisationsverfahrens (Chargennummer, Sterilisierdatum)
- gegebenenfalls Verfallsdatum und Sterilgutlagerfrist
- bei externer Aufbereitung: Name und Anschrift des Unternehmens

Aus Gründen des Qualitätsmanagements sind die Personen schriftlich zu benennen, die nach dem Kontrollieren des aufbereiteten Sterilgutes die Freigabe für den erneuten Gebrauch erteilen.

### 1.3 Gesetze und Normen zur Aufbereitung von Medizinprodukten

Die qualitätsgesicherte Aufbereitung chirurgischer Instrumente ist essentieller Bestandteil des Qualitätsmanagements für jeden Betreiber einer medizinischen Einrichtung. Die Anforderungen an die qualitätsgesicherte Aufbereitung von Medizinprodukten sind durch Gesetze, Verordnungen, Normen, Richtlinien und Empfehlungen determiniert (Abb. 1.2).



Abb.1.2: Übersicht der Gesetze und Verordnungen für die Sterilgutaufbereitung

Laut Sozialgesetzbuch V müssen „die Betreiber von Krankenhäusern, Vorsorge- und Rehabilitationseinrichtungen ein internes Qualitätsmanagement einführen und weiterentwickeln“ (§§ 135 - 137). Bei Nichterfüllung dieser Verpflichtung können Vergütungsabschläge geltend gemacht werden [34]. Außerdem können beim Auftreten von Infektionen Schadensersatzforderungen gestellt werden, auch wenn ein direkter kausaler Zusammenhang nicht bewiesen werden kann.

Eine Qualitätssicherung der Aufbereitung von Medizinprodukten ist nur mit validierten Verfahren zu realisieren und muss dazu den kompletten Prozess erfassen. Validierung bedeutet hier ein „dokumentiertes Verfahren zum Erbringen, Aufzeichnen und Interpretieren der Ergebnisse, die benötigt werden, um zu zeigen, dass ein Verfahren ständig mit den vorgegebenen Spezifikationen übereinstimmt“ [35].

Bei der Aufbereitung von chirurgischen Instrumenten findet das Medizinproduktegesetz (MPG) Anwendung [34, 36]. Der „Zweck dieses Gesetzes ist es, den Verkehr mit Medizinprodukten zu regeln und dadurch für die Sicherheit, Eignung und Leistung der Medizinprodukte sowie die Gesundheit und den erforderlichen Schutz der Patienten, Anwender und Dritter zu sorgen“ (§ 1) [36]. Die im MPG festgelegten Vorgaben wurden im Juni 1998 in der Medizin-Produkte-Betreiberverordnung (MPBetreibV) weiter spezifiziert [37]. In ihr ist durch § 4 Absatz 2 (MPBetreibV) die Reinigung, Desinfektion und Sterilisation mit dazu geeigneten und validierten Verfahren vorgeschrieben [34, 37-39].

Konkrete, aber unverbindliche Angaben für die Umsetzung werden in Normen, Richtlinien und Empfehlungen aufgeführt. In Teil 6 der DIN-Norm 58946 ist der Betrieb von Großsterilisatoren im Gesundheitswesen geregelt. Dort sind praxisnahe und genaue Hinweise für Erst- und Revalidierung zu finden (Tab.1.3).

**Tab.1.3: Auswahl der relevanten DIN-Normen für die Aufbereitung von Medizinprodukten**

<b>Norm</b>	<b>Inhalt</b>
<b>DIN EN ISO 14937</b>	Sterilisation von Medizinprodukten
<b>DIN 58946 T 6</b>	Dampfsterilisation
<b>DIN EN 15883</b>	Reinigung und Desinfektion
<b>DIN EN ISO 17664</b>	Benennung der vom Hersteller bereitzustellenden Informationen für die Aufbereitung von Medizinprodukten
<b>DIN 866 1-3</b>	Biologische Systeme für die Prüfung von Sterilisatoren und Sterilisationsverfahren

Die Richtlinien des Robert-Koch-Instituts (RKI) für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention erachten eine Prozessvalidierung als notwendig und empfehlen die Anwendung gültiger Normen. Im Bundesgesundheitsblatt wird die Notwendigkeit formuliert, die Sterilität von Medizinprodukten mit Hilfe eines etablierten Qualitätsmanagements in gleich bleibend hoher und nachweisbarer Güte zu gewährleisten. [40]

Für die Aufbereitung gelten folgende Grundsätze [18, 38]:

- Die maschinelle ist der manuellen Aufbereitung vorzuziehen
- Eine effiziente Reinigung ist Voraussetzung für eine effiziente Desinfektion und Sterilisation
- Thermischen Desinfektionsverfahren ist gegenüber chemo-thermischen der Vorzug zu geben
- Der Betreiber ist für die Durchführung von entsprechenden Validierungen und Leistungsqualifikationen verantwortlich
- Der Betreiber ist für periodisch durchzuführende Routineprüfungen verantwortlich
- Der Betreiber hat für die Sachkenntnis des Personals und die Einführung und Ausübung eines Qualitätsmanagements zu sorgen

Um den fehlerfreien Ablauf des Sterilisationsprozesses zu gewährleisten, müssen die einzelnen Schritte des Prozesses geprüft werden. Dies geschieht einerseits als Routineprüfung von Prozessparametern wie Temperatur und Wasserdampfsättigung bei jedem Sterilisationsvorgang, andererseits durch regelmäßige Validierungen des Gesamtablaufes. Allgemein werden dabei Ausgangsprodukte, Geräte und Personal, das Verfahren und das Produkt begutachtet und bewertet (Abb.1.3).



Abb.1.3: Beispielhafte Darstellung der wichtigen Einflussgrößen auf die Sterilisation

Es muss der Nachweis erbracht und dokumentiert werden, dass der Reinigungs- und Sterilisationsprozess Produkte liefert, die nach dem geforderten Standard aufbereitet wurden.

Für eine thermophysikalische Prüfung werden spezifische Referenzbelastungen verwendet. Solche sind Medizinprodukte mit betriebstypischer Kontamination und kritischen Konstruktionsmerkmalen [38]. Zu letzteren sind z.B. Instrumente mit engen Lumina (laparoskopische Faszangen) oder einer Mechanik im Inneren (Turbinen) zu zählen, bei denen möglicherweise der für die Sterilisationswirkung verantwortliche Wasserdampf nicht alle Stellen erreicht und somit vermehrungsfähige Keime am Instrument verbleiben.

Für die Prüfung werden klassische Messinstrumente wie Thermometer, Thermofühler oder Manometer an verschiedenen Stellen des Sterilguts angebracht (prEN 285:2002-16), da wissenschaftlich abgesichert ist, welche physikalischen Bedingungen zu einer Sterilisationswirkung führen (DIN 58946-6:2002-04, Seite 3). Falls die thermoelektrische Methode nicht möglich ist oder fehlerhafte Ergebnisse liefert, kann und soll mit Bioindikatoren die Qualität der Aufbereitung bestimmt werden (DIN 866-3) [32]. Dabei sollen spezielle über einen gewissen Zeitraum besonders hitzeresistente Sporen bestimmter Bakterien verwendet werden. Je nach Art des Sterilisationsverfahrens sind verschiedene Mikroorganismen dafür unterschiedlich gut geeignet. Sie müssen laut DAB 10 (Deutsches Arzneibuch, 10. Auflage) folgende Voraussetzungen erfüllen:

- beträchtliche Resistenz, im Vergleich zu pathogenen Keimen, bzw. zu den erwarteten Verunreinigungen im Produkt
- darf selbst nicht pathogen sein
- muss sich leicht kultivieren lassen

Als Testkeime haben sich z.B. *Geobacillus stearothermophilus* (NCTC 10003, ATCC 7953, DSM 22) für Prüfungen von Dampfsterilisatoren und *Bacillus subtilis* für trockene Hitze bewährt [27, 32, 41]. Beide erfüllen jeweils die Anforderungen der DIN EN 866-3:1997-05 (Abschnitt 5) [32].

Für die Durchführung einer Prüfung mittels Bioindikatoren wird der für das Sterilisationsverfahren am besten geeignete Testkeim in Form einer Sporen-Ethanol Suspension benötigt. Dabei sind neben Alkoholen auch andere Flüssigkeiten

verwendbar. Doch werden vegetative Bakterienzellen durch Alkohole in 70%-er Lösung innerhalb weniger Minuten abgetötet, Bakteriensporen wiederum durch die sporenentwicklungshemmende Wirkung konserviert. Auf diese Weise ist eine einfache Trennung von vegetativen Keimen und Sporen möglich [42].

Nach dem Wachstum und nach der Sporenbildung auf geeigneten Nährböden (z.B. Agar) werden die Prüfkeime vom Kulturmedium getrennt. Anschließend muss die Lebendkeimzahl (lebensfähige Prüfkeime/Volumeneinheit der Suspension) der Sporen in der Suspension bestimmt werden. Es ist dabei unerheblich durch welches Verfahren die Lebensfähigkeit des Testkeims nachgewiesen wird, solange entweder die metabolische Aktivität oder die Reproduktion des Keims qualitativ oder quantitativ angezeigt wird. Für die Keimzahlbestimmung und die Beimpfung der Keimträger (mit definierter Sporenmenge belastete Medizinprodukte) muss eine Sporen-Suspension verwendet werden, welche Sporen des gleichen Stammes enthält und in gleicher Weise hergestellt wurde [32].

Die Leistungs- und Prüfanforderung an Dampfsterilisatoren mit biologischen Systemen sind in prEN 285 (Abschnitt 15) [43] aufgeführt. Ein Keimträger durchläuft dabei in einem Prüfpaket einen ausgewählten Sterilisationszyklus, wird danach entnommen oder rückgewonnen und bebrütet. Für Überprüfungen und Überwachungen der Sterilisationswirkung (z.B. vor Inbetriebnahme oder in periodischen Abständen nach DIN 58946-6, DIN EN 13060:2004) sind kommerzielle Prüfkörper erhältlich. Häufig werden als Bioindikatoren Sporenproben (meist *G. stearothermophilus*) auf Filterpapier verwendet, welche nach erfolgter Sterilisation in einem Nährmedium angesetzt werden. Erhältlich sind diese Sporenproben auch in einem Kunststoffröhrchen mit Nährmedium, welches mit einem pH-Indikator kombiniert ist. Mikrobielles Wachstum wird hierbei nach Aktivierung und Inkubation durch eine Farbveränderung angezeigt. Chemoindikatoren sind Komplexe, aufgebaut als Behandlungsindikatoren, und erlauben eine Überprüfung der Sterilisationszeit und Temperatur. Sie werden in der Sterilisations-Einheit angebracht, aber auch in so genannten Helices als Prüfkörper, um die Dampfdurchdringung in Hohlkörperinstrumenten zu simulieren. Wenn jedoch kein fertiger beimpfter Keimträger an den kritischen Stellen des Medizinproduktes angebracht werden kann, ist eine direkte Beimpfung des Medizinproduktes mit einer Suspension durchzuführen [44].

Zusätzlich muss täglich der Bowie-Dick-Test mit einem 7,0 kg schweren Wäschepaket oder gleichwertigen alternativen Systemen durchgeführt werden (DIN 58946-6). Dabei wird die Kammer auf Dichtheit geprüft und zusätzlich die Qualität des Dampfes durch die Anzeige von nicht-kondensierbaren Gasen (z.B. CO<sub>2</sub>) im Dampf getestet [30].

#### **1.4 Validierung des Dampfsterilisators vom 31.01. - 03.02.2006 in der ZSVA Giessen**

Die Prüfung von Sterilisationsprozessen erfolgt standardmäßig bei einer Validierung der Prozesse über eine Messung der thermophysikalischen Parameter [32]. Jedoch bilden Hohlrauminstrumente nach heutigem Wissensstand dabei eine Ausnahme, da die Durchführung bei ihnen mittels elektronischer Sensoren in der Praxis schwierig oder gar unmöglich ist. Bei bestimmten Oberflächenbeschaffenheiten oder Instrumenten mit sehr engen Lumina führt die thermophysikalische Prüfung entweder zu negativen Ergebnissen – z.B. nicht erreichten Haltezeiten – oder ist technisch nicht möglich. Aus diesem Grund kann für solche Instrumente eine mikrobiologische Prüfung notwendig werden.

Grundlage für die vorliegende Arbeit war der Prüfbericht über eine von einem zertifizierten Validierer im Januar 2006 durchgeführte thermoelektrische Prüfung eines Dampfsterilisators der ZSVA Giessen. Dabei wurden zwei Tests (Sterilisator-Chargen 8396 und 8414) mit dem Programm P3 (schwere Siebe, volle Beladung) nur eingeschränkt bestanden. Probleme traten bei den Instrumenten Probepfanne, Einschläger (beides aus Sieb „Endoprothese“, Abb. 2.5, 2.6, 2.15), kanülierter Schraubendreher (Sieb „Platon“, Abb. 2.7) und einem kanülierten Bohrfuttergriff (Sieb „UCH Bohrwellen“, Abb. 2.7, 2.8) auf. Außerdem konnten eine laparoskopische Faszange (Abb. 2.9, 2.10, 2.16) und ein Gasschlauch (Abb. 2.11, 2.12) nicht überprüft werden. Nach den Richtlinien des RKI sind alle oben genannten Instrumente als kritisch A einzustufen, die laparoskopische Faszange jedoch als kritisch B. Als kritisch werden alle Medizinprodukte eingestuft, die in steriles Gewebe oder Gefäßsysteme eindringen und deshalb auf jeden Fall vor der Verwendung einen validierten Sterilisationsprozess durchlaufen haben müssen. Der Zusatz A bedeutet, dass an die Aufbereitung (bevorzugt maschinelle Reinigung und Desinfektion,

Dampfsterilisation) keine besonderen Anforderungen gestellt werden. Kritisch B weist jedoch auf ein komplizierteres Sterilgut hin und somit auf erhöhten Aufwand bei der Aufbereitung, welche nur von Personal mit Nachweis einer anerkannten Ausbildung zum Sterilgut-Assistenten durchgeführt werden sollte [40].

Laut Bericht entsprachen die oben aufgeführten Instrumente bei der thermoelektrischen Prüfung „nicht den Anforderungen der EN 554 und sollten in diesem Fall nach DIN 58946-6 mikrobiologisch nachgetestet werden“ [45] (Abb.1.4 ).

Durchgeführte Prüfungen:

Sterilisa- tor - Charge	Programm	Beladung	Gesamtbewertu nach EN 554
8389	P 8 Vakuumtest	Vakuumtest nach dem Einbau der Sensoren	bestanden
8390	P 8 Vakuumtest	Vakuumtest	bestanden**
8391	P 7, BD-Test	BD-Test, kein vorheriges Aufheizen	nicht bestander
8392	P 7, BD-Test	BD-Test	bestanden**
8393	P 11, Aufheizen	Aufheizen	bestanden
8394	P 7, BD-Test	BD-Test mit Normprüfpaket	bestanden
8395	P 4, 121°C	Teilbeladung	bestanden
8396	P 3, schwere Siebe	Volle Beladung	bestanden*
8397	P 7, BD-Test	Test von Chargenkontrollen	bestanden**
8398	P 8 Vakuumtest	Vakuumtest	bestanden**
8399	P 11, Aufheizen	Aufheizen	bestanden**
8400	P 7, BD-Test	BD-Test	bestanden**
8401	P 3, schwere Siebe	Teilbeladung	nicht bestande
Ab hier wurde mit Eigendampferzeuger getestet			
8402	P 11, Aufheizen	Aufheizen	bestanden
8403	P 7, BD-Test	BD-Test mit Normprüfpaket	bestanden
8404	P 3, schwere Siebe	Teilbeladung	Abbruch / Ster
8405	P 3, schwere Siebe	Teilbeladung	bestanden
8406	P 7, BD-Test	BD-Test	nicht bestander
8407	P 8 Vakuumtest	Vakuumtest	bestanden**
8408	P 7, BD-Test	BD-Test	bestanden**
8409	P 7, BD-Test	BD-Test mit Normprüfpaket	nicht bestande
Reparatur des Sterilisators, Stauerdichtung vom Mantel defekt			
8410	P 11, Aufheizen	Aufheizen, 1 Heizstab war ausgeschaltet	Abbruch / Ster
8411	P 7, BD-Test	Leercharge, 1 Heizstab war ausgeschaltet	Fehler / Steri
8412	P 7, BD-Test	BD-Test mit Normprüfpaket	bestanden
8413	P 4, 121°C	Teilbeladung	bestanden
8414	P 3, schwere Siebe	Volle Beladung	bestanden*
8415	P 7, BD-Test	BD-Test mit Normprüfpaket	bestanden
8416	P 8 Vakuumtest	Vakuumtest nach dem Ausbau der Sensoren	bestanden

**\*Probepfanne und sw. Griff vom Einschläger aus dem Sieb Endoprothese und kanülierter Schraubendreher aus dem Sieb Platon und ein kanülierter Bohrfuttergriff aus dem Sieb UCH Bohrwellen entsprachen bei den thermoelektrischen Prüfungen nicht den Anforderungen der EN 554. In diesem Fall muss nach DIN 58946-6 die mikrobiologische Prüfung durchgeführt werden!**

\*\* vom ZSV-Personal durchgeführt

Abb.1.4: Auszug aus Seite 2 des Prüfberichtes [45]

Die Temperatursonden konnten aufgrund der Geometrie (enge Lumina) oder der Oberflächeneigenschaften (Kunststoff) bestimmter chirurgischer Instrumente keine verlässlichen Ergebnisse liefern. Die Sensoren zeigten an, dass an den aufgeführten Instrumenten dabei nicht die geforderte Sterilisationstemperatur von 134 °C erreicht werden konnte, bzw. bei einem Instrument (kanülierter Bohrfuttergriff) nur für 82 Sekunden statt der geforderten 5 Minuten gehalten werden konnte. Mit Ausnahme dieser Messungen wurde der Prüfzyklus als bestanden gewertet und die grundsätzliche Funktionstüchtigkeit des Dampfsterilisators nachgewiesen [45].

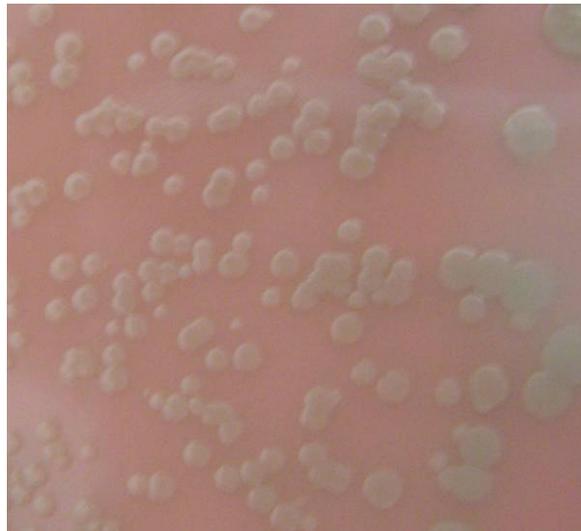
Aufgabe dieser Arbeit war es, ein mikrobiologisches Verfahren unter Berücksichtigung der gültigen Normen zu entwickeln, um Medizinprodukte, bei denen eine konventionelle thermo-elektrische Prüfung zu negativen Ergebnissen führt oder gar nicht durchführbar ist, auf Sterilität zu testen. Neben der Nachtestung der genannten Sterilgüter sollen mit dieser erprobten Methode auch zukünftige Nachtestungen zuverlässig und mit möglichst geringem Aufwand durchführbar sein.

## 2. Material und Methode

### 2.1 *Geobacillus stearothermophilus*

Standarttestkeim für Überprüfungen der Sterilität von Medizinprodukten nach Dampfsterilisation ist *Geobacillus stearothermophilus*, welcher für derartige Testungen als gut geeignet und bewährt gilt [32, 41].

Es handelt sich um ein sporenbildendes, gram-positives und stäbchenförmiges Bakterium. Seine optimale Wachstumstemperatur liegt zwischen 50 und 65 °C und gehört somit zu den thermophilen Organismen. Es erreicht einen Durchmesser von 0,6 – 1 µm und eine Länge von 2 – 3,5 µm (Abb. 2.1, 3.1).



**Abb. 2.1:** auf einer Blutplatte gewachsene Kolonien von *G. stearothermophilus*

Das Bakterium ist für Tiere und Menschen nicht pathogen und wird u. a. in heißen Quellen, Wüstensand, Meeresboden oder Lebensmitteln gefunden [46, 47]. Aufgrund seiner thermophilen Eigenschaften (s. Tab.1.2) wird es sehr häufig als Prüfkeim für den Erfolg von thermischen Sterilisationsprozessen gewählt. Für *G. stearothermophilus* wird bei Sattdampf ein D-Wert [min.] von 2 für 121 °C angegeben [48].

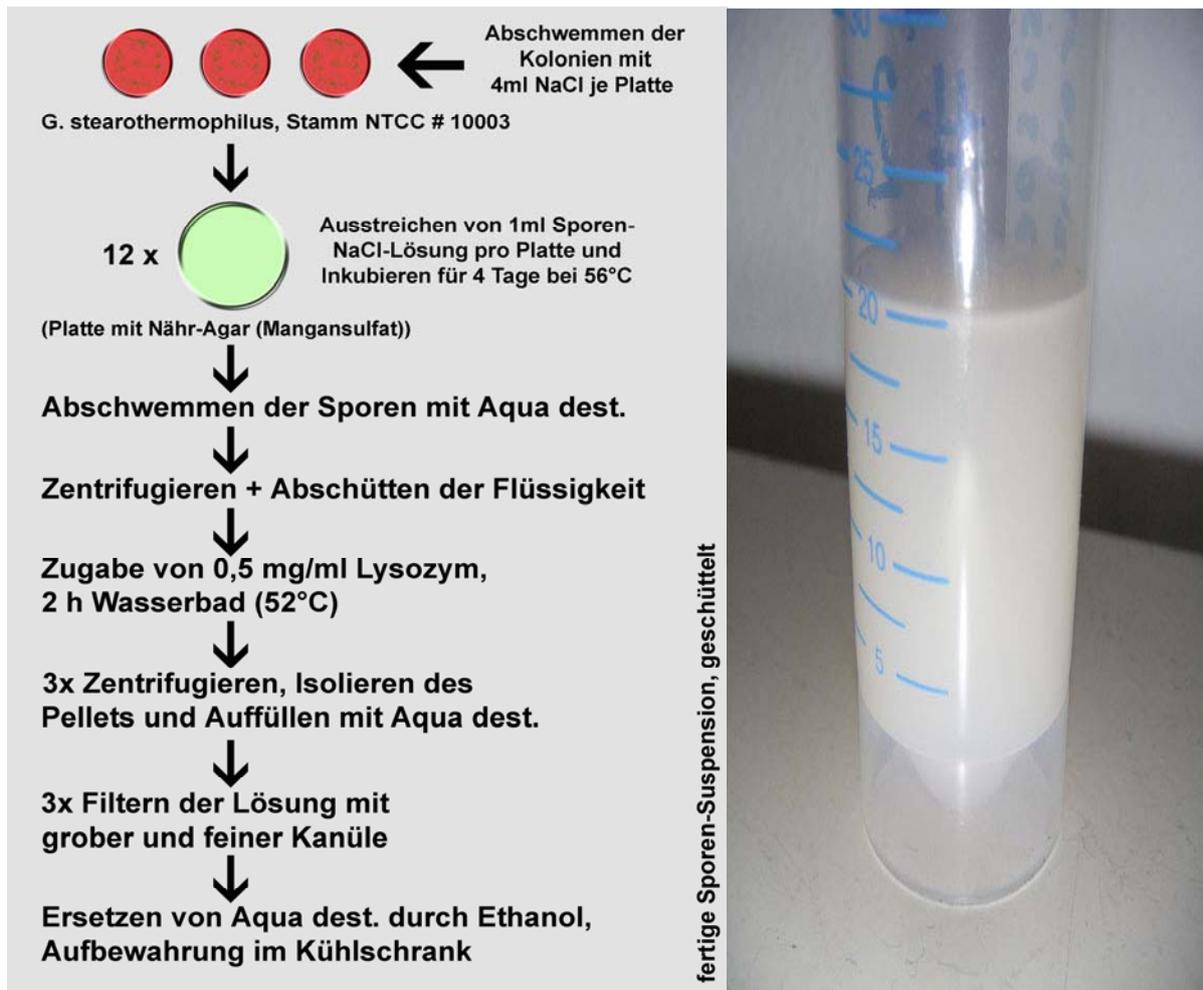
## 2.2 Herstellung und Begutachtung der Sporensuspension

### 2.2.1 Herstellung der Sporensuspension

Zunächst wurde *G. stearothermophilus* des Stammes NTCC # 10003 (DSMZ # 494) auf Blutagarplatten (s. Kap. 6.4 Materialliste) bei 56 °C für 48 h kultiviert. Von drei mit einem Rasen bewachsenen Blutplatten wurden die vegetativen Bakterien mit 4 ml NaCl pro Platte abgeschwemmt und danach auf 12 größere Platten mit Spore agar verteilt, sodass auf jeder 1 ml Bakteriensuspension ausgestrichen wurde. Danach folgte die Inkubation der Platten in einem Brutschrank bei 56 °C für 4 Tage. Mittels Malachitgrün- [49] (Abb. 3.1) und Gram-Färbung wurden die Sporulation und der Restanteil vegetativer Bakterien mikroskopisch überprüft.

Um die Sporen zu isolieren, erfolgten ein Abschwemmen der Kulturen mit destilliertem Wasser von den 12 Agar-Platten und das Sammeln in einem Kunststoff-Röhrchen, welches anschließend mit *aqua destillata* (destilliertes Wasser) auf 35 ml aufgefüllt wurde. Die so gewonnenen Sporen wurden anschließend 15 Minuten bei 3000 RPM (2000 RCF) zentrifugiert, um Sporen und Verunreinigungen (z.B. Zelldebris) voneinander zu trennen. Der Überstand (Flüssigkeit) über dem „Pellet“ (Bakteriensediment) wurde bis auf 10 ml vorsichtig abgeschüttet. Zur Auflösung von Zelldebris folgten die Zugabe von 0,5 mg Lysozym pro Milliliter Suspension, das Schütteln (1 Min. mittels Vortex-Apparat) des Reaktionsgefäßes und die Inkubation für 2 Stunden bei 52 °C im Wasserbad.

Anschließend wurden die Sporen von den Zellresten durch einen dreifachen Waschvorgang getrennt. Dieser beinhaltete das Abschütten des Überstands, das Auffüllen des Reaktionsgefäßes mit destilliertem Wasser und 2 Minuten Schütteln (Vortex-Apparat). Danach wurde die Suspension jeweils 10 Minuten bei 3000 RPM (2000 RCF) zentrifugiert. Nach dreimaligem Waschen wurde das Sediment in Ethanol resuspendiert, das eine vorzeitige Auskeimung der Sporen verhindert und eventuell noch vorhandene vegetative Keime abtötet [42]. Die komplette Sporensuspension wurde abschließend durch eine grobe Kanüle (0,90 x 40mm, s. Kap. 6.4), dann durch eine Vlieskompressen (steril, 30 g, 5 x 5cm) und durch eine feine Kanüle (0,45 x 25mm) gedrückt und somit gefiltert. Die Aufbewahrung der Suspension erfolgte bei 4 °C im Kühlschrank (Abb.2.2).



**Abb. 2.2:** Arbeitsschritte der Herstellung der Sporen-Suspension (links), Sporen-Ethanol-Suspension (rechts)

Zur Überprüfung des Reinheitsgrades wurde eine Probe der Suspension mit Hilfe der Sporenfärbung nach *Rakette* (Malachitgrün-Oxalat, Modifikation nach *Wirtz* mit Safranin O Lösung) [49], unter dem Mikroskop begutachtet. Bei dieser Methode erscheinen die Sporen smaragd-grün und übriges Material rötlich (Abb.3.1).

## 2.2.2 Bestimmung der Keimzahl mit Verdünnungsreihen

Mit Hilfe einer Verdünnungsreihe wurde die Sporenzahl in der Suspension bestimmt. Dafür wurden in 7 Reaktionsgefäße (Fassungsvermögen: 1,5 ml) je 450 µl NaCl-Lösung vorgelegt. In das erste Reaktionsgefäß wurden 50 µl Sporen-Suspension pipettiert und danach 30 Sekunden geschüttelt (Vortex-Apparat). In das jeweils folgende Gefäß wurden je 50 µl aus dem vorhergehenden Gefäß pipettiert. Nach jedem Schritt erfolgte ein Schütteln für 30 Sekunden (Vortex-Apparat) und das Anbringen einer sterilen Pipettenspitze. Auf diese Weise wurde bis zum siebten Behältnis verfahren. Am Ende standen sieben Röhrchen verschiedener Verdünnungsstufen zur Verfügung (Abb.2.3), in welchen die Anzahl der Koloniebildenden Einheiten (KBE) gegenüber der Ausgangs-Suspension um die Faktoren  $10^{-1}$  –  $10^{-7}$  reduziert war.

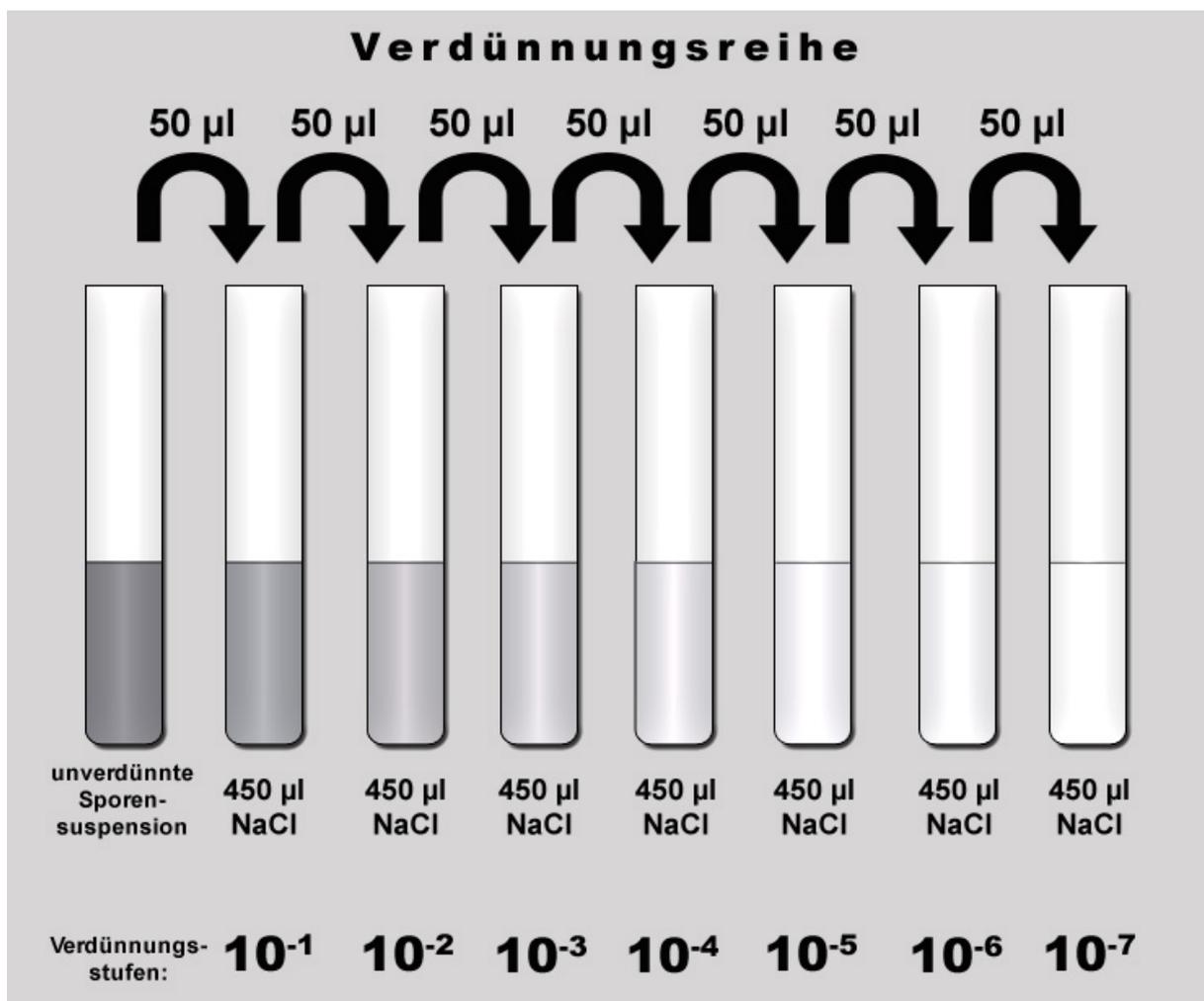
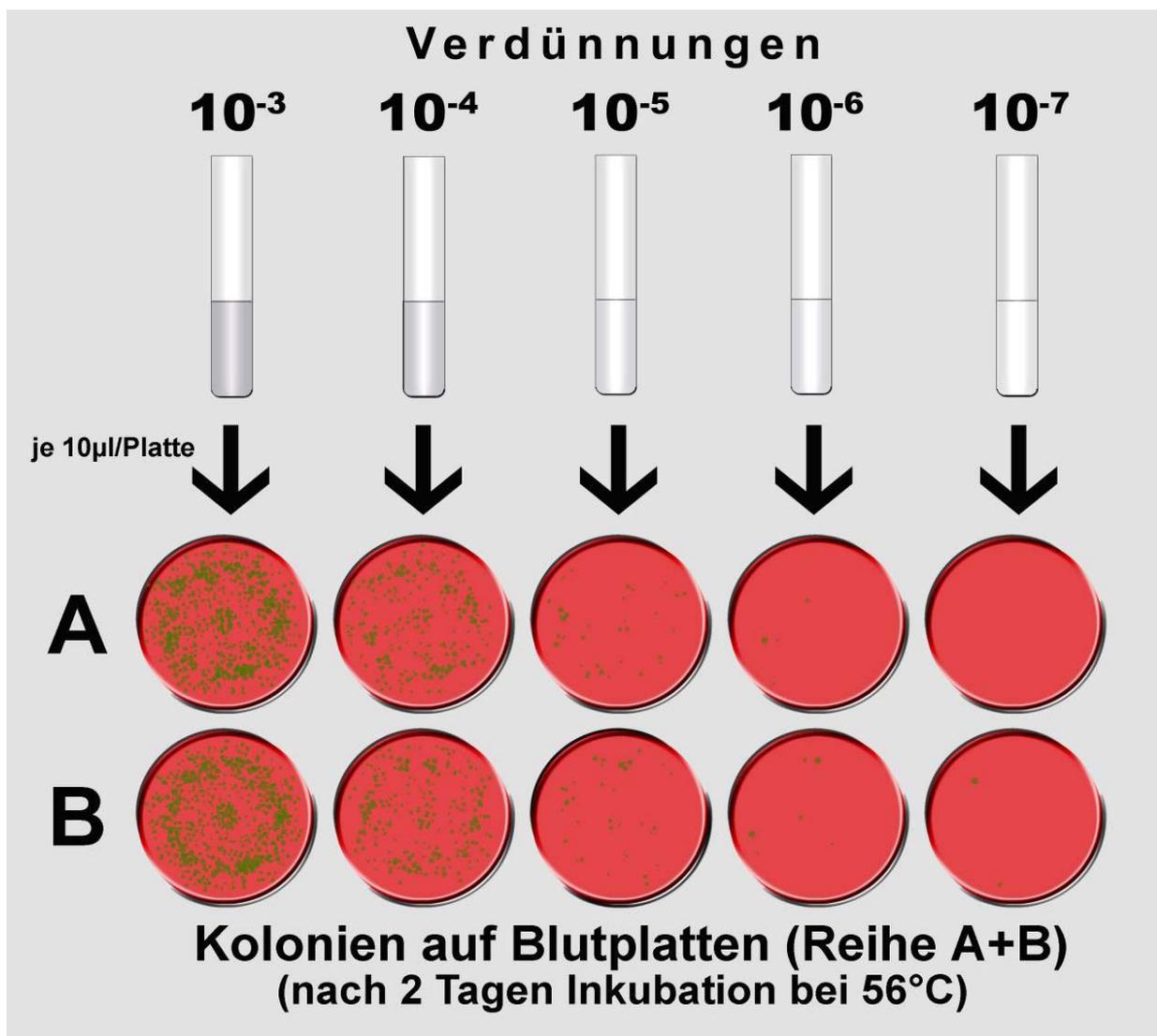


Abb. 2.3: Vorgang der Herstellung einer Verdünnungsreihe

Für die Bestimmung der Sporenzahl wurden pro Verdünnungsstufe für die Verdünnungen  $10^{-3}$  –  $10^{-7}$  zweimal  $10\ \mu\text{l}$  entnommen, auf je einer Blutagarplatte ausgestrichen und 48 h bei  $56\ ^\circ\text{C}$  im Brutschrank inkubiert (Abb.2.4). Aufgrund der großen Kolonienanzahl und somit teilweiser Überlagerung der Kolonien war ein exaktes Auszählen erst ab Verdünnungsstufe  $10^{-5}$  möglich. Die Stufen  $10^{-1}$  und  $10^{-2}$  wurden deshalb nicht ausgestrichen und bei den Stufen  $10^{-3}$  und  $10^{-4}$  ein Achtel der Gesamtfläche gezählt, mit 8 multipliziert und gerundet.



**Abb.2.4:** Schematische Darstellung des Ausplattierens und Inkubierens (48 h) der Sporen auf Blutplatten (doppelte Ausführung)

Durch Auszählen der gewachsenen Kolonien in den verschiedenen Verdünnungsstufen auf den Platten ist es möglich, die Sporenanzahl (Koloniebildende Einheiten) pro Milliliter in der Sporensuspension zu berechnen.

### 2.2.3 Steigerung der Wachstumsaktivität nach Vorbehandlung

Aufgrund eigener Überlegungen und der Studie von *Finley und Fields* [50], welche sich mit der Hitzeaktivierung zur Steigerung der Wachstumsaktivität von Sporen des *Geobacillus stearothermophilus* befasst, wurden im Vorfeld zwei verschiedene Versuche durchgeführt. Es sollte herausgefunden werden, ob eine Vorbehandlung der Sporen in einer größeren Anzahl an gewachsenen Kolonien resultiert.

Im ersten Ansatz wurden die Sporen (100 µl Sporensuspension der 1. Charge in Verdünnungsstufen  $10^{-3}$  bis  $10^{-8}$ ) 20 Minuten bei 95 °C im Wasserbad erhitzt, im zweiten Ansatz 10 Minuten in einem Ultraschallbad (35 kHz) behandelt, um die Auskeimung der Sporen zu aktivieren. Die Kolonie-bildenden Einheiten konnten nach Ausplattieren (je zwei Mal 100 µl auf je eine Blutplatte) auf Blutagarplatten gezählt werden. Der Effekt der Aktivierung wurde durch Vergleich mit unbehandelten Sporen bestimmt. Daneben wurden eine unbehandelte, eine Wärme- und eine Ultraschall-behandelte Probe (100 µl Sporensuspension) in Nährmedium (CaSo-Bouillon, s. Kap. 6.4 Materialliste) inkubiert (Brutschrank, 2 Wochen, 56 °C).

Diese Versuche wurden mit der 1. Charge Sporensuspension durchgeführt. Die Sporenzahl unterscheidet sich daher von denen des in den späteren Instrumentenprüfungen verwendeten Pools aus zwei Sporenchargen und kann somit nicht mit ihnen verglichen werden.

## 2.3 Versuchsdurchführung

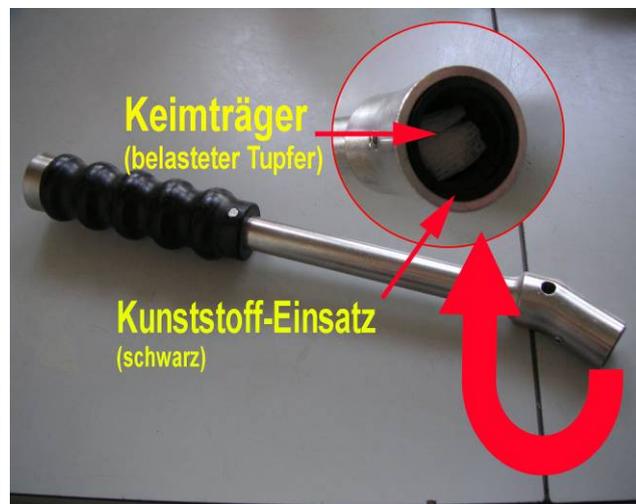
### 2.3.1 Beschreibung der getesteten Medizinprodukte

#### Probepfanne (Art.-Nr. ICH 006400, Fa. Mecron) und Einschläger (ICH 8008-20, Fa.Mecron):

Die schwarzen Probepfannen bestehen bis auf ein Metall-Gewinde vollständig aus Kunststoff und sind in verschiedenen Durchmessern verfügbar. Sie werden zur Ausmessung von Hüftgelenkspfannen beim operativen Einsetzen von künstlichen Hüftgelenken verwendet. Dazu werden aufeinander abgestimmte Instrumente als Set (Abb. 2.5) benutzt, wozu auch der Einschläger (Abb. 2.6) gehört. Er besteht aus Metall mit einem Griff aus Kunststoff. An dem Arbeitsende befindet sich ein Einsatz ebenfalls aus Kunststoff. Diese Instrumente werden bei der oben beschriebenen Art von Operation in der Unfallchirurgie des Universitätsklinikums Giessen circa 100-mal pro Jahr benutzt.



**Abb. 2.5:** Endoprothesen-Set in Sieb  
Probepfannen (rote Pfeile) und  
Einschläger (gelber Pfeil)



**Abb.2.6:** beimpfter Einschläger

**Schraubendreher kanüliert (Art.-Nr. 201-100, Fa. Tantum) und  
und T-Griff-Spannbohrfutter (Art.-Nr. 200-110, Fa. Tantum):**

Mit dem durchbohrten Schraubendreher „Tantum“ (Abb. 2.8) werden Schrauben bei Knochenfrakturen (z.B. am Oberschenkelhals) eingedreht. Diese Art von Operationen wird in der Unfallchirurgie des Universitätsklinikums Giessen etwa 100-mal pro Jahr durchgeführt.

Der durchbohrte T-Handgriff (Abb. 2.7) dient dabei zum Einspannen von Bohrern und Fixierstäben. Beide bestehen aus Metall und haben einen Griff aus orangefarbenem Kunststoff.



**Abb. 2.7:** T-Griff-Spannbohrfutter, mit beimpftem Tupfer



**Abb. 2.8:** Schraubendreher-Set im Sieb

**Laparoskopische Faßzange (8.393.254, Fa. Wolf) und  
Gasschlauch-Lap (ohne Nr., Fa. Wolf):**

Die Faszangen (Abb. 2.9) werden bei minimal-invasiven laparoskopischen und endoskopischen (u.a. durch den Trokar in der Bauchdecke) Eingriffen eingesetzt. Sie sind ca. 40 cm lang und in drei Teile zerlegbar. Das Handstück kann dabei vom Schaft getrennt und aus diesem die so genannte „Seele“ (Abb. 2.10) herausgezogen werden. An dieser befindet sich das Arbeitsende. Bis auf einen kleinen Kunststoff-Knopf am Handstück ist die Faszange aus Metall gefertigt (Abb. 2.9).

Der Gasschlauch (Abb. 2.11) ist ca. ein Meter lang und besteht aus Kunststoff. An einem Ende befindet sich ein Einsatz aus Metall (Abb. 2.12). Der Schlauch wird zum Aufblasen des Bauches bei laparoskopischen Operationen verwendet. Derartige Eingriffe finden in der Allgemein Chirurgie des Universitätsklinikums Giessen mehr als 200-mal im Jahr statt.



**Abb.2.9:** laparoskopische Faßzange



**Abb.2.10:** beimpfte Seele der lap. Faßzange



**Abb.2.11:** Gasschlauch

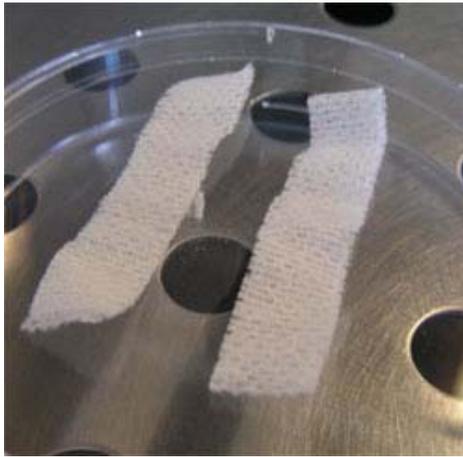


**Abb.2.12:** Metall-Einsatz am Gasschlauch

### 2.3.2 Belastung der getesteten Medizinprodukte

Um eine Keimreduzierung von mindestens  $10^6$  nachweisen zu können, musste die Belastung der Medizinprodukte in definierter Menge möglich sein. Zudem musste sie lagestabil sein, d.h. an der zu testenden Stelle des Instruments dauerhaft verbleiben. Nach dem Sterilisationsprozess ist weiterhin eine zuverlässige und vollständige Rückgewinnung der Sporen für die Testung notwendig.

In mehreren verschiedenen Vorversuchen wurden zwei unterschiedliche Techniken entwickelt, die im Folgenden als **indirekte** und **direkte** Belastung bezeichnet werden. Bei der indirekten Methode wurde ein steriles Stück einer Vlies-Kompresse (Abb. 2.13) mit 10  $\mu$ l der Sporen-Suspension belastet und in ein Lumen des Instruments (Abb. 2.14) eingebracht.



**Abb.2.13:** sterile Vlies-Streifen



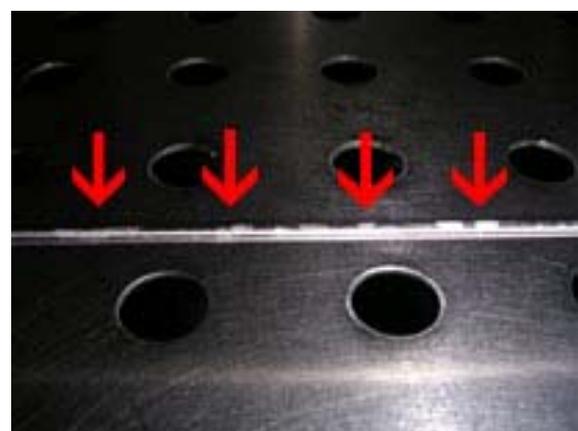
**Abb.2.14:** beimpfter Schraubendreher

Danach wurde das Medizinprodukt wie üblich in dem dafür vorgesehenen Sieb sterilisiert. Anschließend konnte der beimpfte Tupfer mit einer zuvor hitzesterilisierten Pinzette leicht entfernt werden. Nach dieser Methode wurde bei 4 von 6 Versuchskörpern verfahren (Einschläger, Schraubendreher-kanüliert, T-Griff-Spannbohrfutter, Gasschlauch).

Die Probepfanne (Abb. 2.5) und die laparoskopische Fasszange (Abb. 2.9, 2.10) wurden dagegen direkt mit 10 µl der Suspension belastet (Abb. 2.15 und 2.16).



**Abb.2.15:** Endoprothese mit 10 µl Sporensuspension während des Antrocknens unter Abluft (links)



**Abb.2.16:** unter Abluft angetrocknete Sporensuspension auf der Seele der lap. Fasszange (rechts)

Bei der Zange wurde dabei die Mechanik, die den Griff mit der Zange verbindet, die so genannte Seele, aus der engen Ummantelung herausgezogen und die Sporen darauf unter Abluft aufgetrocknet (Abb. 2.16). Dann wurde die Seele wieder eingebracht, das Instrument ordnungsgemäß zusammengesteckt und in das Sieb gelegt. Bei der Probepfanne wurden direkt auf der Kunststoff-Oberfläche 10 µl der Sporen-Suspension aufgetrocknet (Abb. 2.15).

Der Transport zur ZSVA nach Beimpfung erfolgte bei allen Prüfkörpern in den dafür im Routinebetrieb vorgesehenen Sieben.

### 2.3.3 Keimrückgewinnung

Um den Erfolg der Sterilisation zu prüfen, ist eine reproduzierbare Rückgewinnung und Reaktivierung eventuell überlebender Sporen von den Instrumenten notwendig. Anforderungen an die Keimrückgewinnung sind demnach eine zuverlässige und einfache Handhabung sowie eine möglichst vollständige Rückgewinnung. Auch kleine Sporenzahlen müssen sicher nachweisbar sein.

Bei indirekter Belastung des Instrumentes, wie oben beschrieben mit Hilfe eines Tupfers, wurde dieser in CaSo-Bouillon bei 56 °C inkubiert. Der Keimträger wurde dabei mit einer zuvor hitzesterilisierten Pinzette vom Prüfkörper in das Röhrchen mit der Nährlösung transferiert. Ein Kontakt zu jeglichen anderen Gegenständen und zur Haut musste dabei unbedingt vermieden werden, um Kontaminationen mit Sporen aus der Umwelt oder von der Haut zu verhindern. Auf diese Art wurde bei den Medizinprodukten „Einschläger“, „Schraubendreher-kanüliert“, „T-Griff-Spannbohrfutter“ und dem Gasschlauch verfahren.

Für die Rückgewinnung von direkt auf der Oberfläche des Prüfkörpers angetrockneten Sporen wurden drei unterschiedliche Verfahren mehrfach in verschiedenen Versuchsanordnungen getestet, erstens das Inkubieren des kompletten Instrumentes in CaSo-Bouillon, zweitens das Abspülen der Sporen mit Nährmedium oder Kochsalz-Lösung oder drittens das Abwischen der belasteten Stelle mit einem angefeuchteten sterilen Tupfer.

Das Abspülen erforderte größere Geschicklichkeit in der Handhabung, was insbesondere bei Ungeübten die Gefahr von Kontaminationen erhöhen könnte. Dazu ist es stets ungewiss, ob genügend angetrocknete Sporen durch die Spülung gelöst wurden. Die Inkubation des kompletten Instrumentes in Nährmedium ist insbesondere bei großen Instrumenten, wie z.B. der laparoskopischen Faszange, unpraktikabel und ist durch den größeren Versuchsaufbau immer auch mit einer höheren Wahrscheinlichkeit einer Kontamination verbunden.

Das Abwischen zur Rückgewinnung von Keimen dagegen erwies sich als einfache und sehr zuverlässige Methode. Dabei wurden die gleichen sterilen Tupfer

verwendet wie bei der oben beschriebenen indirekten Methode. Bei der Vorbereitung wurden sterile Vlies-Kompressen in Streifen geschnitten, danach autoklaviert und sauber in einem Glasbehälter aufbewahrt. Um die Sterilität der Streifen zu gewährleisten wurden diese immer mit einer hitzesterilisierten Pinzette entnommen. Die Sterilität der Tupfer wurde parallel zu jedem Versuch durch Inkubation eines Vlies-Streifens in CaSo-Bouillon getestet. Vor dem Abwischen wurde der Tupfer mit wenigen Tropfen steriler NaCl-Lösung angefeuchtet. Während des gesamten Vorgangs musste darauf geachtet werden, dass der Tupfer nicht in Kontakt mit unsterilen Oberflächen kam oder durch Handkontakt kontaminiert wurde. Beim Abwischen konnte mit der Pinzette Druck auf die Vlies-Kompresse und somit auf die angetrockneten Sporen ausgeübt werden, um eine möglichst vollständige Rückgewinnung zu erreichen. Mit dieser Methode wurde bei der Probepfanne (Abb. 2.5) und der laparoskopischen Fasszange (Abb. 2.9, 2.10) verfahren. Die Kompressen (Abb. 2.13), die entweder direkt als Keimträger oder zum Abwischen benutzt worden waren, wurden darauf in einem mit Kork verschlossenen Glasröhrchen mit 25 ml CaSo-Bouillon für 2 Wochen in einem Brutschrank bei 56 °C inkubiert (Abb. 2.17).



**Abb.2.17:** Vlies-Streifen in Nährmedium (CaSo-Bouillon) vor Inkubation

Ein Wachstum der Sporen resultierte dabei in einer deutlichen Trübung und teilweise zusätzlich in einer Ausflockung innerhalb des Mediums.

### 2.3.4 Kontrollen zur Keimrückgewinnung

Parallel zu jeder Prüfung wurden Kontrollen für die quantitative Rückgewinnung vermehrungsfähiger Sporen von den belasteten Instrumenten mit den angewendeten Methoden durchgeführt. Dafür wurden die Instrumente mit Verdünnungen der Sporensuspension belastet. Die Rückgewinnung erfolgte dann ohne vorhergehende Sterilisation mit den oben beschriebenen Methoden. Damit wurde die Sporenzahl ermittelt, die für einen kulturellen Nachweis mindestens auf dem Instrument vorhanden sein musste. Zuverlässiger Nachweis weniger Sporen bedeutete eine hohe Nachweissensitivität für die Methode der Rückgewinnung.

Bei den Kontrollen für die Keimrückgewinnung wurden die zu testenden Instrumente bzw. die Tupfer mit 10 µl Sporensuspension der Verdünnungsstufen  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  und  $10^{-7}$  an den gleichen Stellen wie oben beschrieben belastet. Im Unterschied zu den Prüfkörpern, welche den Sterilisierungsprozess durchliefen, erfolgte hier nach Belastung direkt die Keimrückgewinnung nach der für das jeweilige Instrument besten Methode. Die Kontrollen wurden ebenso für 2 Wochen bei 56 °C inkubiert und die Ergebnisse dokumentiert.

### 2.3.5 Sterilitätskontrollen

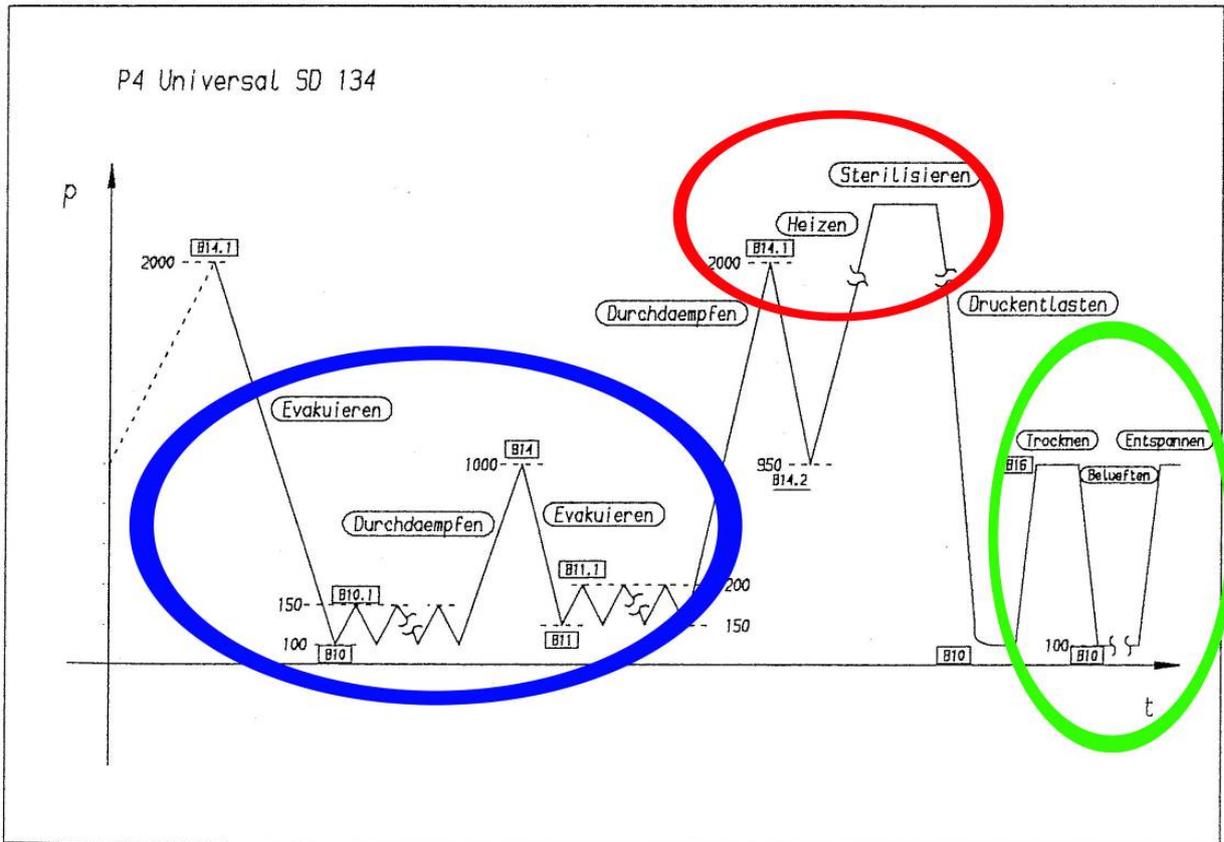
Sterilitätskontrollen wurden durchgeführt, um die Sterilität der verwendeten Materialien sowie mögliche Kontaminationen bei Belastung oder Rückgewinnung zu kontrollieren. Die Instrumente bzw. die Tupfer wurden statt mit 10 µl Sporensuspension mit 10 µl steriler NaCl-Lösung beimpft. Danach erfolgte ohne Sterilisation die Rückgewinnungsprozedur wie oben beschrieben. Zusätzlich wurden noch ein steriler Tupfer (Abb. 2.13) und 10 µl sterile NaCl-Lösung direkt in CaSo-Bouillon inkubiert (Abb. 2.17), um die Sterilität der verwendeten Materialien zu prüfen. Diese Negativkontrollen wurden bei jedem Versuch mitgeführt.

### 2.3.6 Sterilisationsprozess

Die Sterilisation wurde mit dem Dampfsterilisator *SELECTOMAT S 3000* (Hersteller-Nummer: 901050/901033) der Firma *MM* durchgeführt. Er wird für die Dampfsterilisation von medizinischen Gütern im Krankenhausbereich (z.B. Wäsche, Instrumente) verwendet. Wesentlicher Bestandteil der Anlage ist die modular aufgebaute Prozess-Steuerung über den S3000-Mikroprozessor zum Steuern und Regeln des automatischen Betriebsablaufes. Die Sterilisationskammer hat ein Fassungsvermögen von 12 Sterilisations-Einheiten. Der Dampfdruck beträgt 2,4 bar Überdruck und die höchstzulässige Betriebstemperatur 141 °C [51].

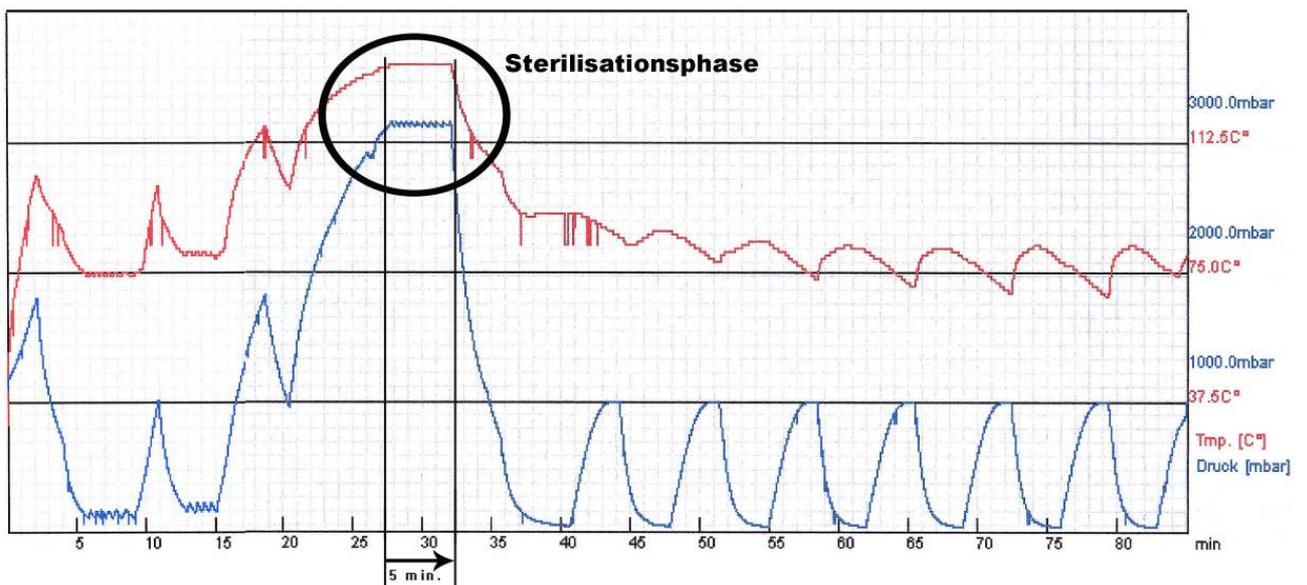
Für die Versuche wurde bei dem Dampfsterilisator das für die Art der Ladung vorgesehene Programm „P4 Universal SD 134“ eingestellt. Es verfährt nach dem Sterilisierverfahren *SECURIA* für Wäsche und Instrumente bei vorliegenden Sonderbelastungen, z.B. durch über-schwere Packung bei 134 °C Sterilisiertemperatur mit intensiver Trocknung [51]. Es kann nur von dazu autorisiertem und entsprechend ausgebildetem Personal verändert oder abgebrochen werden.

Nach Starten des Programms wird zunächst ein Vakuum durch Evakuieren erzeugt, welches durch einen Dampfstoß kurz unterbrochen wird (blau markiert auf Abb. 2.18). Anschließend kommt es durch das Durchdampfen und Aufheizen auf 134 °C zur Phase der Sterilisation (rot markiert auf Abb. 2.18). In diesem Abschnitt werden Temperatur und Dampfdruck in einem Vollzyklus für 5 Minuten gehalten. Nach erfolgtem Druckabfall schließt eine Phase des Trocknens, Belüftens und Entspannens den Prozess ab (grün markiert auf Abb. 2.18).



**Abb. 2.18:** Druck-Kurve des Sterilisierprogramms P4 nach dem Sterilisierverfahren SECURIA für Wäsche und Instrumente bei 134 °C Sterilisiertemperatur mit intensivierter Trocknung, Phasen Fraktionieren (blau), Sterilisieren (rot), Trocknen (grün)

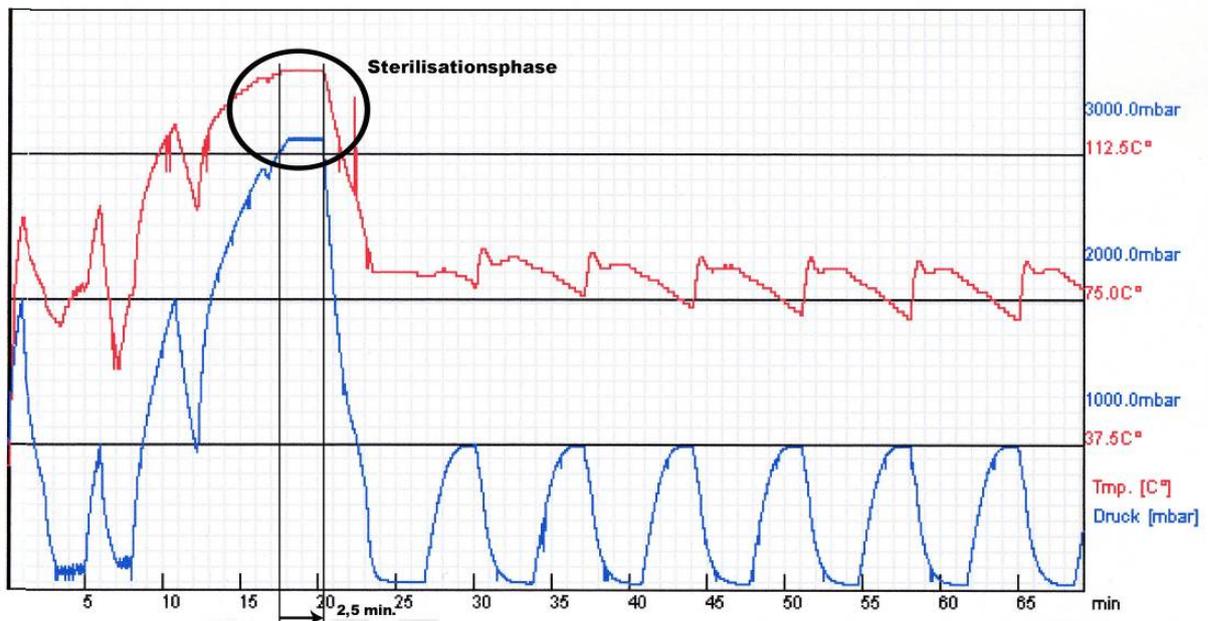
Als **Vollzyklus** wird das Sterilisieren, also das Halten von Maximal-Druck (bis 3,1 bar) und Maximal-Temperatur (134 °C), für 5 Minuten bezeichnet (Abb. 2.19).



**Abb.2.19:** Ausdruck der Druck (blau) – Temperatur (rot) – Kurve des Vollzyklusses eines Versuchstages

Die Haltezeit der Sterilisationsphase ist mitentscheidend, um die geforderte Abtötungsquote der Mikroorganismen zu erzielen.

Bei zwei zusätzlichen Versuchen wurde bei ansonsten unveränderten Bedingungen die Haltezeit bei Maximal-Temperatur und -Druck auf 2,5 Minuten halbiert. Dies wird im Weiteren als **Halbzyklus** bezeichnet (Abb. 2.20).



**Abb.2.20:** Ausdruck der Druck (blau) – Temperatur (rot) – Kurve des Halbzyklusses eines Versuchstages

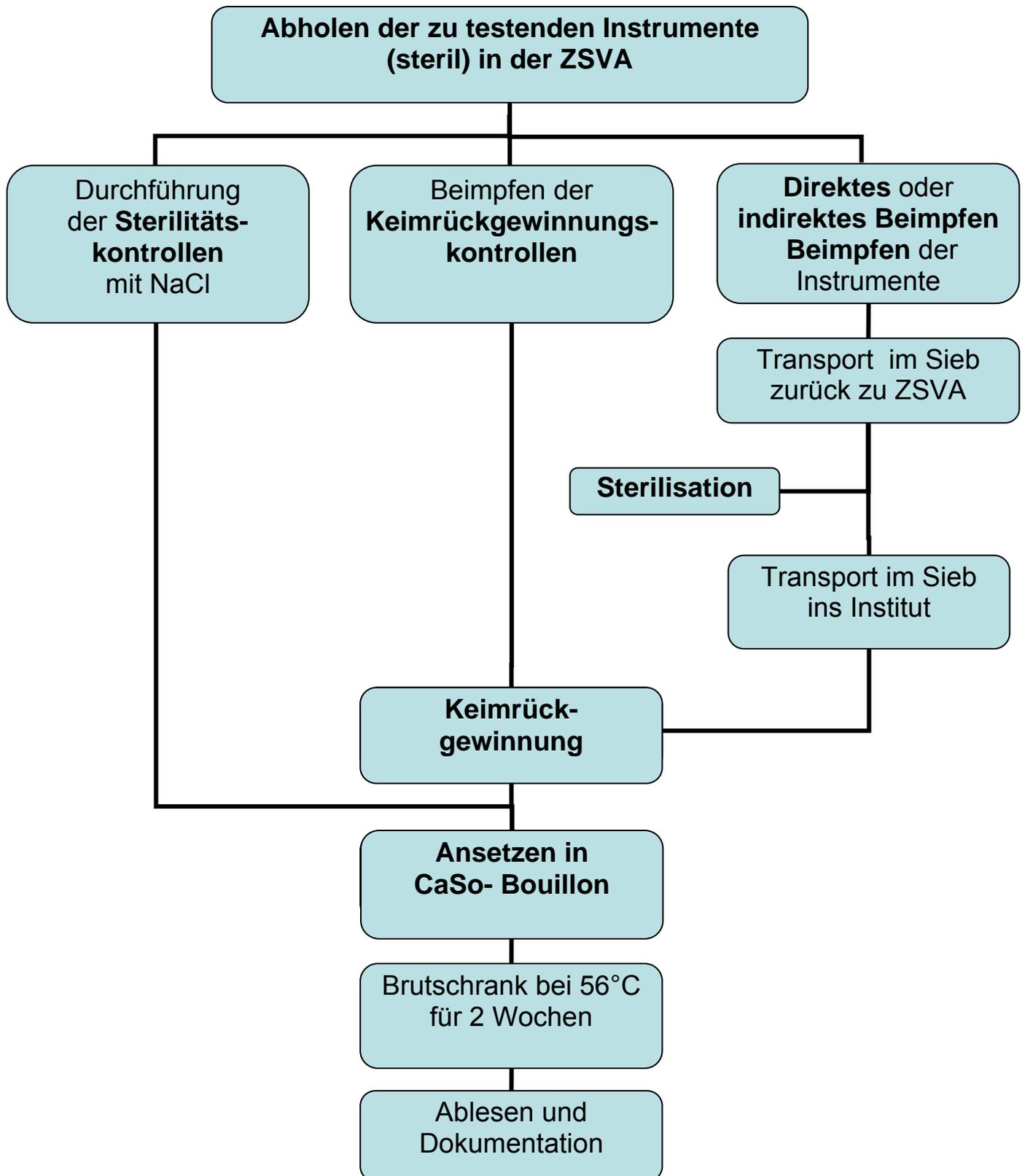
### 2.3.7 Ablauf der Prüfung

Zu Beginn jedes Versuchsdurchlaufs wurde eine Verdünnungsreihe wie in Kap. 2.2.2 beschrieben hergestellt. Aus den Verdünnungsstufen  $10^{-3}$  bis  $10^{-7}$  wurden für die Kontrolle der Sporenzahl je zwei Mal (Reihe A und B)  $10\ \mu\text{l}$  auf eine Blutplatte ausgestrichen und diese anschließend für 48 h bei  $56\ ^\circ\text{C}$  inkubiert.

Die Sporen wurden durch Auszählen der Kolonien quantifiziert (Abb. 2.1, 2.4) und dokumentiert. Aus den Doppelbestimmungen (Reihe A + B) wurde der Mittelwert für jede Verdünnungsstufe bestimmt. Um eine mögliche Zu- oder Abnahme der Keimzahlen zu erkennen, wurde der chronologische Verlauf der Mittelwerte aus den Verdünnungsreihen  $10^{-5}$  und  $10^{-6}$  statistisch ausgewertet. Dazu dienten die Berechnungen der Korrelation nach *Pearson* ( $r$ ) und der Signifikanz ( $p$ ). Mit Hilfe der linearen Regression sollten mögliche Trends der Keimzahlen mit der Zeit erkannt werden.

Die zu prüfenden Instrumente wurden in sterilisiertem Zustand in einem speziellen geschlossenen Transportbehälter transportiert (Abb. 2.5).

Abb. 2.21: Flussdiagramm: Durchführung eines Versuch-Durchlaufs



Bei jedem Versuch wurden Keimrückgewinnungs- und Sterilitätskontrollen wie oben beschrieben durchgeführt. Die zu prüfenden Instrumente wurden wie beschrieben mit 10 µl unverdünnter Sporensuspension belastet, in dem Sieb wieder zur ZSVA (Zentrale Sterilgutversorgungsabteilung) gebracht und dort ohne vorheriges mechanisches oder chemisches Reinigen sterilisiert. Es folgte der Rücktransport der Prüfkörper zum Labor (Abb. 2.21).

Zusammen mit den Keimrückgewinnungskontrollen wurde die Keimrückgewinnung von den zu prüfenden Instrumenten durchgeführt. Die Proben wurden in 25 ml CaSo-Bouillon (Abb. 2.17) für zwei Wochen bei 56 °C im Brutschrank inkubiert. Danach erfolgten das Ablesen der Ergebnisse (Wachstum oder kein Wachstum in Nährmedium) und die Dokumentation:

- Instrumente nach Sterilisation (jeweils zwei gleicher Art)
- zwei Sterilitätskontrollen mit NaCl und eine Kontrolle des Vlies-Streifens
- mindestens je eine Keimrückgewinnungskontrolle der Verdünnungsstufen  $10^{-6}$  und  $10^{-7}$ , teilweise auch der Stufe  $10^{-5}$  (je nach Verfügbarkeit der Prüfkörper)

Wachstumsaktive Keime bewirken nach zwei Wochen Inkubation eine deutliche Trübung des Nährmediums, ihr Fehlen dagegen nicht. Bei den ersten 5 Versuchen wurden zur Sicherheit Kontrollausstriche und mikroskopische Prüfungen durchgeführt, um ein Wachstum artfremder Keime auszuschließen, obwohl dies bei 56 °C Inkubationstemperatur schon wegen der relativ hohen Temperatur unwahrscheinlich wäre.

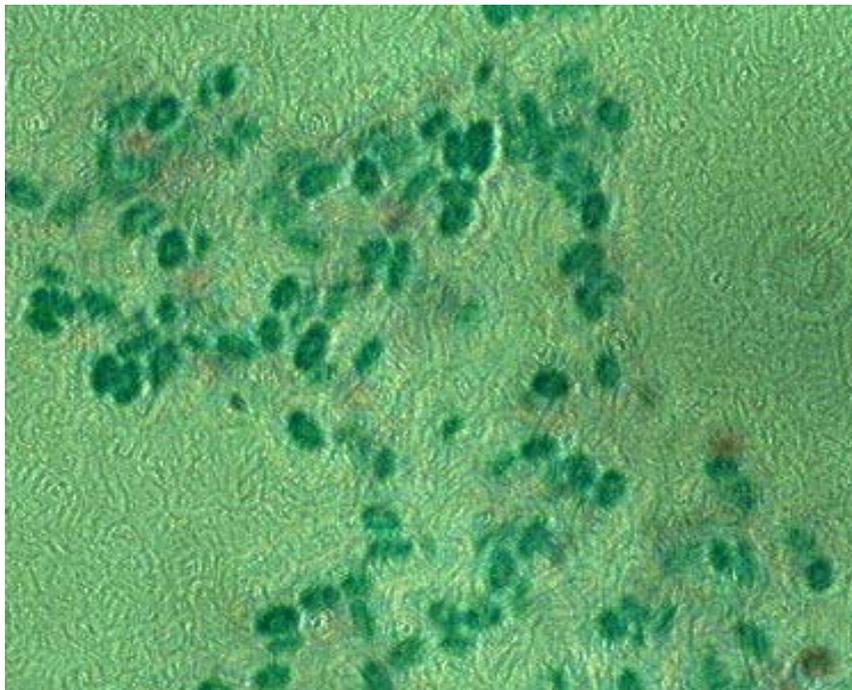
Nach diesem Ablauf wurde zwischen dem 23.04. und 19.06.2007 an 15 Versuchstagen (13 Tage Vollzyklus, 2 Tage Halbzyklus) der Sterilisationsprozess in der ZSVA an 6 verschiedenen und insgesamt 52 Instrumenten getestet (Tab. 3.11, 3.12). Die zu untersuchenden Medizinprodukte kamen dabei unterschiedlich oft, jedoch jedes an mindestens drei Tagen zum Einsatz. Ebenso variierten Anzahl und Kombination der Prüfkörper bei den Versuchsdurchläufen und Kontrollen. Es wurden jedoch alle Sterilitäts-Testungen immer mehrfach, d.h. an mindestens zwei Instrumenten gleicher Art ausgeführt. Der Grund für die unterschiedlichen Versuchs-Zusammenstellungen lag an der zufälligen Verfügbarkeit der Instrumente, da sie an manchen Tagen im Routinebetrieb des Klinikums (s. Kap. 2.3.1) in Gebrauch waren.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Reinheit der Sporensuspension

Zwei getrennt voneinander produzierte Suspensions-Chargen wurden vor der Durchführung der Testungen zu einer Charge gemischt. Für alle Versuche (außer den Vorversuchen zur Steigerung der Wachstumsaktivität, Kap. 2.2.3) wurden Sporen aus diesem Pool verwendet.

Die Reinheit der Suspension wurde mikroskopisch und durch Probeausstriche auf Blutagar kontrolliert. Mikroskopisch zeigten sich in der Suspension bei Verwendung einer Sporenfärbung nach *Rakette* mit Malachitgrün-Oxalat-Färbung [49] die Sporen grün und durch die Safranin-Gegenfärbung (Modifikation nach *Wirtz*) übriges Material, wie z.B. Zelltrümmer und Reste des Sporenagars als rötlich-braun (Abb. 3.1). Die Kultivierung der Sporen auf Blutagar resultierte nach 2 Tagen in zahlreichen grau-grünen und unterschiedlich großen Kolonien (Abb. 2.1). Dabei konnte auch der für *G. stearothermophilus* markante Geruch festgestellt werden. Davon abweichendes Wachstum anderer Mikroorganismen wurde nicht beobachtet. Bei Gram-Färbungen mehrerer Kolonien zeigten sich ausschließlich gram-positive bis gram-labile Stäbchen, was das Vorliegen einer Reinkultur von *G. stearothermophilus* bestätigte.



**Abb. 3.1:** *G. stearothermophilus* – Sporen, Sporenfärbung nach *Rakette* mit Malachitgrün-Oxalat Färbung mit Safranin-Gegenfärbung (Modifikation nach *Wirtz*) [49]

### 3.2 Bestimmung der Sporenzahl in der Suspension

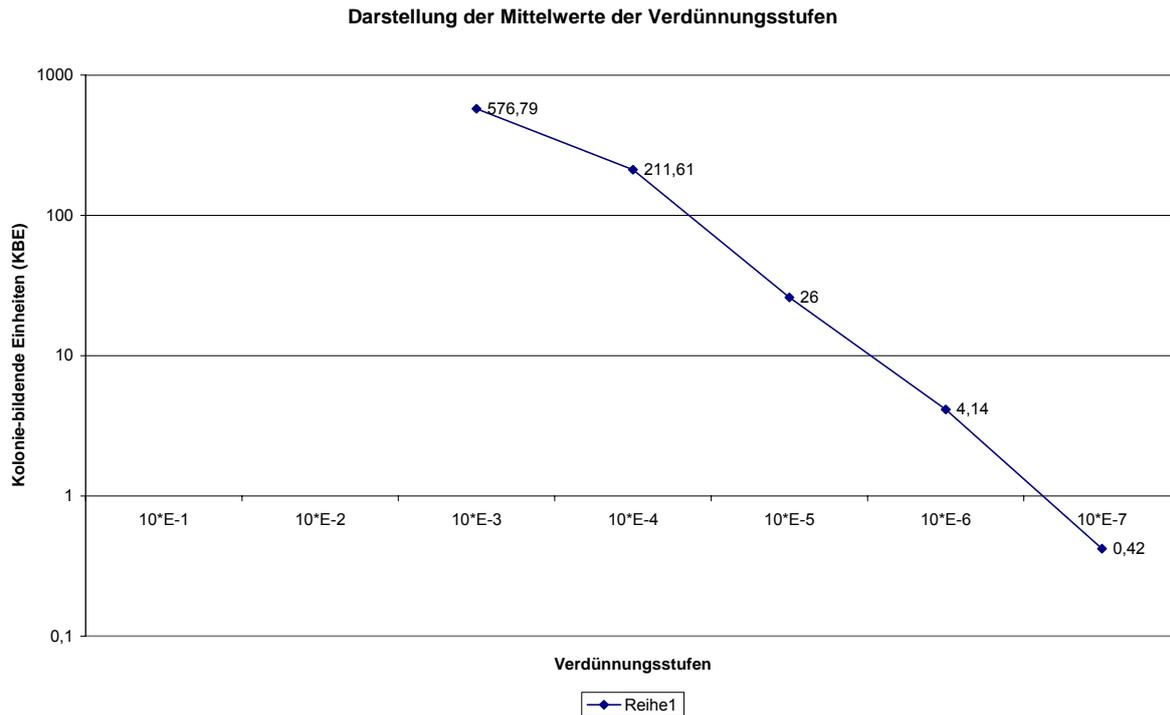
Anhand der Verdünnungsreihen, welche zu jedem Versuch doppelt angesetzt und ausgewertet wurden, wurde die Sporenanzahl bestimmt. An 15 Versuchstagen wurden somit 30 Verdünnungsreihen hergestellt, von den Verdünnungen  $10^{-3}$  bis  $10^{-7}$  10  $\mu$ l Aliquots auf Blutplatten ausgestrichen und nach Inkubation die Sporenzahl durch Zählen der gewachsenen Kolonien bestimmt. Die ersten beiden Verdünnungsstufen ( $10^{-1}$  und  $10^{-2}$ ) wurden aufgrund der großen Anzahl an Koloniebildenden Einheiten nicht auf Blutplatten inkubiert und gezählt. Die Werte eines Versuchstages fanden keine Berücksichtigung bei der Berechnung der Durchschnittswerte, da an diesem Tag das Verwenden einer nicht kalibrierten Pipette zu stark abweichenden Ergebnissen führte. Die Versuchsergebnisse nach Sterilisation dagegen wurden berücksichtigt, da die Sporen-Belastung höher als bei den anderen Durchführungen war (Tab. 3.1, Abb. 3.2).

**Tab. 3.1:** Ergebnisse der Auszählungen der auf Blutplatten gewachsenen Kolonien der jeweiligen Verdünnungsreihen im Zeitraum vom 23.04.- 19.06.2007. (Pipettierte Menge: 10 µl)

Versuchs- Nummer	Anzahl der Sporenkolonien in verschiedenen Verdünnungsstufen				
	$10^{-3}$ *	$10^{-4}$ *	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
1a	500	200	18	5	0
1b	500	160	16	9	0
2a	500	250	44	4	2
2b	500	250	20	7	1
3a	500	200	31	2	0
3b	500	200	32	4	0
4a	500	200	32	2	1
4b	500	200	13	0	0
5a	500	250	24	4	0
5b	500	250	19	2	1
6a	500	250	57	4	0
6b	500	250	38	1	0
7a	500	180	27	1	0
7b	600	150	13	1	0
8a	500	105	11	0	0
8b	600	112	8	0	0
9a	600	160	27	2	0
9b	500	200	39	6	1
10a	700	250	16	1	0
10b	700	200	27	6	0
11a	700	400	56	6	1
11b	650	300	47	9	0
12a	600	300	27	3	0
12b	600	300	29	12	0
13a	700	350	25	15	2
13b	650	75	7	6	3
14a**	1500	600	103	4	1
14b**	1500	600	81	14	0
15a	700	87	12	4	0
15b	850	96	13	0	0
<b>arithm. Mittelwert der Mittelwerte aus den Doppelbe- stimmungen:</b>	<b>576,79</b>	<b>211,61</b>	<b>26,00</b>	<b>4,14</b>	<b>0,43</b>

\* die Kolonien der Verdünnungen  $10^{-3}$  und  $10^{-4}$  wurden bei Kolonienzahlen >150 in einem Achtel der Gesamtfläche ausgezählt, mit 8 multipliziert und danach gerundet.

\*\*markierte Reihe zeigt Werte einer nicht kalibrierten Pipette, welche an diesem Tag benutzt werden musste, Ergebnisse wurden nicht bei der Berechnung der Mittelwerte berücksichtigt!



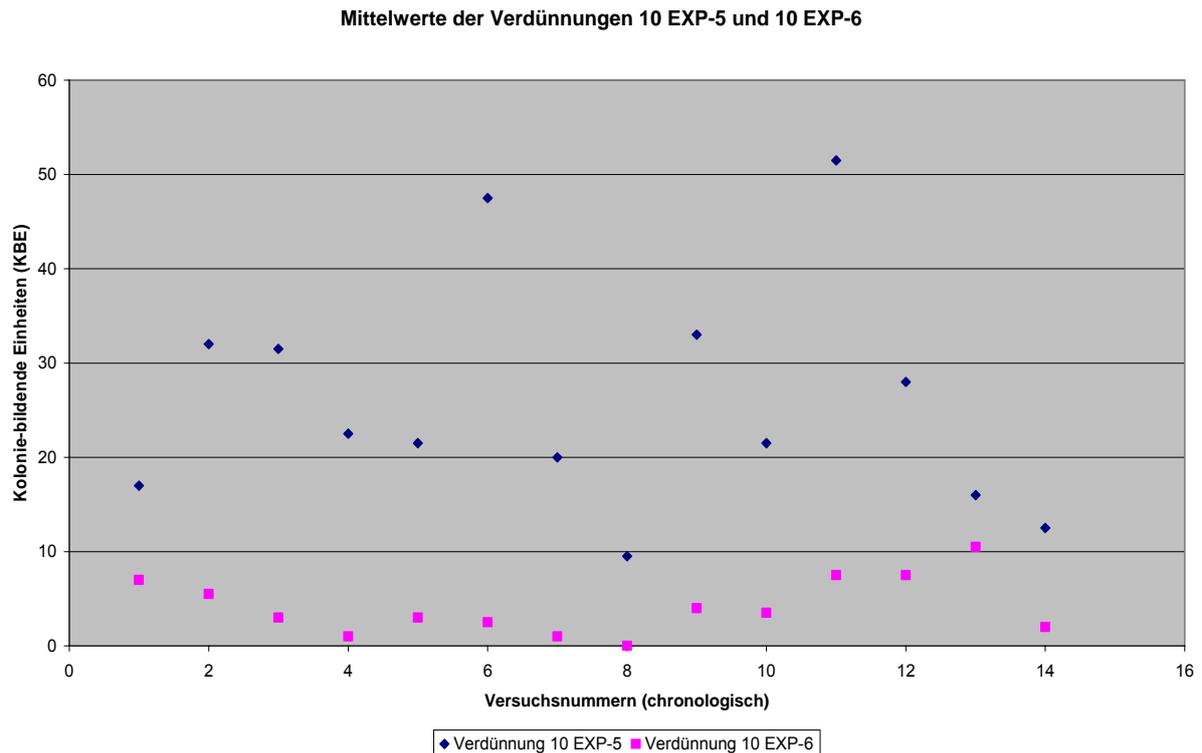
**Abb.3.2:** logarithmische Darstellung der arithmetischen Mittelwerte (s.Tab.3.1) von den Mittelwerten der Doppelbestimmungen der gewachsenen Kolonien in den verschiedenen Verdünnungsstufen ( $10^{-3} - 10^{-7}$ ), die Verdünnungen  $10^{-1}$  und  $10^{-2}$  wurden nicht ausplattiert

Mit den erhaltenen Mittelwerten konnte die Sporenkonzentration der Suspension näherungsweise bestimmt werden. Dazu wurde der Wert der 5. Verdünnungsstufe verwendet, da bei ihr die größte Anzahl an Kolonien noch zuverlässig gezählt werden konnte. Die 3. und 4. Stufe dagegen wurde aufgrund der hohen Anzahl und teilweiser Überlagerungen der gewachsenen Kolonien bei Größenordnungen  $>150$  nur partiell (ein Achtel der Gesamtfläche) gezählt und hochgerechnet (mit 8 multipliziert). Das Ergebnis wurde zudem danach gerundet. 26 Sporen in  $10 \mu\text{l}$   $10^5$ -fach verdünnter Lösung entsprechen einer Sporenkonzentration von

$$\mathbf{2,6 \times 10^8 \text{ Sporen pro ml}}$$

in der unverdünnten Ausgangs-Suspension.

Die Versuche wurden vom 23.04. bis 19.06.2007 durchgeführt (s. Kap. 2.3.7). Zusammen mit den Vorversuchen ergibt sich ein Zeitraum von über drei Monaten in dem die gleiche Suspension verwendet wurde.



**Abb.3.3:** Ergebnisse der Mittelwerte der Doppelbestimmungen aller Versuchstage von den Verdünnungen  $10^{-5}$  (blau) und  $10^{-6}$  (rot) über den Versuchszeitraum 23.04. -19.06.2007

Eine Abnahme der Lebendkeimzahl (Kolonie-bildende Einheiten) mit der Zeit ist nicht erkennbar (Tab. 3.1 und Abb. 3.3). Die Sporenanzahl blieb also während des gesamten Zeitraumes, in dem die Instrumentenprüfungen durchgeführt wurden, stabil. Mit Hilfe der linearen Regression waren keine Trends zu beobachten:

- $r_{-5} = -0.09$ ,  $p_{-5} = 0,77$
- $r_{-6} = 0.25$ ,  $p_{-6} = 0,4$

Demnach konnte nicht davon ausgegangen werden, dass die Anzahl der Kolonie-bildenden Einheiten (KBE) chronologisch zu- oder abnimmt. Die individuellen und z.T. starken Schwankungen sind in der Methode begründet und für den Anwendungszweck tolerierbar.

### 3.3 Hitzeaktivierung der Sporen

Die Ergebnisse zeigen, dass durch Hitze (Reihe H) keine Aktivierung der Sporen stattfindet. Auch die Behandlung der Suspension in einem Ultraschall-Bad (Reihe U) zur Auflösung von möglichen Verklumpungen resultierte nicht in einer Steigerung, sondern eher einer Abnahme der Anzahl gewachsener Einzelkolonien bzw. vereinzelter Sporen auf Blutplatten (Tab. 3.2).

**Tab. 3.2:** Kolonienanzahl auf Blutplatten nach Ausplattieren von 100 µl (je 2mal, A und B) Sporensuspension in verschiedenen Verdünnungsstufen im Vergleich mit vorheriger Hitzeaktivierung (20 min, 95 °C) und Ultraschallbehandlung (10 min, 35 kHz)

Verd.- stufe	Reihe K (Kühlschrank)		Reihe H (Hitzebad)		Reihe U (Ultraschall)	
	A	B	A	B	A	B
$10^{-3}$	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
$10^{-4}$	>400	>400	284	217	276	295
$10^{-5}$	45	62	32	22	47	36
$10^{-6}$	5	1	2	0	4	2
$10^{-7}$	1	0	0	0	0	1
$10^{-8}$	0	0	0	0	0	0

(Die erhaltenen Werte können nicht mit den Endresultaten verglichen werden, da hier nur mit Charge 1 der Sporensuspension gearbeitet wurde!)

Beide Ansätze, das Erhitzen und die Ultraschallbehandlung, führten nicht zu einer größeren Anzahl vereinzelter, wachstumsfähiger Sporen gegenüber der unbehandelten Suspension. Sie wurden daher nicht in das Protokoll für die Instrumententestung integriert.

Da bei diesem Vorversuch nur Charge 1 der Suspension verwendet wurde, unterscheiden sich somit die erhaltenen Sporenzahlen im Vergleich mit denen der späteren Instrumentenprüfungen. Bei diesen wurde ein Pool aus Charge 1 und 2 verwendet.

### 3.4 Ergebnisse der verschiedenen Keimrückgewinnungsmethoden

Wie in Abschnitt 2.3.3 beschrieben, wurden drei verschiedene Keimrückgewinnungsmethoden getestet. Um Varianzen aufgrund von Umsetzungsfehlern zu vermeiden, wurden diese Versuche mit dem aufgrund seiner Geometrie recht handlichen Instrument Probepfanne (Abb. 2.5 und 2.15) durchgeführt.

Der erste Versuch, die angetrockneten Sporen vom Prüfkörper zurückzugewinnen, erfolgte durch aktives Abspülen der Sporen mit Nährmedium (CaSo-Bouillon) oder NaCl-Lösung mittels einer 1000 µl-Pipette. Für eine quantitative Rückgewinnung der Sporen musste die Spülung mehrfach durchgeführt und die Spüllösung in einer sterilen Petrischale aufgefangen werden. Es zeigte sich, dass bei diesem Vorgehen die Gefahr für Kontaminationen durch andere Mikroorganismen relativ hoch war. Nach Inkubation waren nämlich Kolonien unterschiedlicher Morphologien sichtbar. Von den recht typisch geformten stäbchenförmigen gram-positiven *G. stearothermophilus* konnten andere Bakterienarten differenziert werden. Da sich diese Methode schon bei kleinen und handlichen Prüfkörpern als äußerst anfällig für Kontaminationen und zudem als schwierig und relativ aufwendig darstellte, wurde sie nicht weiter fortgeführt.

Die Inkubation des kompletten mit Sporen belasteten Prüfkörpers (Probepfanne) in Nährmedium (CaSo-Bouillon) sollte die Gefahr von Kontaminationen verringern. Hierbei resultierte zweimal eine Trübung des Mediums. Doch sind dafür schon bei kompakten Prüfkörpern eine sehr große Menge an Nährmedium und ein entsprechender Behälter nötig, was die Gefahr einer Kontamination wiederum erhöht. Zudem wäre diese Art der Keimrückgewinnung für andere Medizinprodukte (z.B. laparoskopische Faszange) aufgrund der Größe und der Menge an benötigtem Nährmedium mit hohem materiellem Aufwand verbunden.

Die Methoden des Abwischens (direkt) und die Benutzung einer Kompresse als Keimträger (indirekt) lieferten dagegen zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse. Die Durchführung ist einfach und der materielle Aufwand relativ gering. Dies schaffte unter Verwendung von sterilen Materialien die Voraussetzung für sicheres, steriles Arbeiten.

### 3.5 Ergebnisse der mikrobiologischen Prüfungen nach Sterilisation im Vollzyklus

Die Ergebnisse der mikrobiologischen Testung der sechs Medizinprodukte für den Durchlauf eines Vollzyklus zeigen, dass nach keinem der Versuche wachstumsfähige Sporen des *Geobacillus Stearothermophilus* nach Sterilisation nachgewiesen werden konnten (Tab. 3.3 – 3.8, 3.11). Alle Röhren mit dem Nährmedium CaSo-Bouillon blieben klar und wiesen keine Trübungen auf. Auch bei den Negativ-Kontrollen blieben diese aus.

Einzige Ausnahme stellen die in Tab. 3.5 und in Abschnitt 3.6 beschriebenen Ergebnisse dar. Hierbei war es durch Verwendung einer kontaminierten NaCl-Lösung zu falsch-positiven Resultaten gekommen. Aus diesem Grund wurden mit dem Instrument „Probepfanne“ zur Sicherheit drei zusätzliche Versuche (Test 4-6) durchgeführt. Bei diesen konnten keine positiven Ergebnisse nach Sterilisation festgestellt werden.

**Tab.3.3:** Ergebnisse der Testungen im Vollzyklus für den Prüfkörper **Griff von Einschläger**

Getestetes Medizinprodukt: <b>Einschläger</b>			
	Test 1	Test 2	Test 3
Instrument 1 nach Sterilisation	∅	∅	∅
Instrument 2 nach Sterilisation	∅	∅	-
Sterilitätskontrolle 1: NaCl	∅	∅	∅
Sterilitätskontrolle 2: NaCl	∅	∅	∅
Sterilitätskontrolle: Vlies-Streifen	∅	∅	∅
Keimrückgewinnungskontrolle 1 ( $10^{-5}$ )	-	X	-
Keimrückgewinnungskontrolle 2 ( $10^{-5}$ )	X	X	X
Keimrückgewinnungskontrolle 3 ( $10^{-6}$ )	X	X	-
Keimrückgewinnungskontrolle 4 ( $10^{-6}$ )	X	X	X
Keimrückgewinnungskontrolle 5 ( $10^{-7}$ )	X	X	-
Keimrückgewinnungskontrolle 6 ( $10^{-7}$ )	-	∅	X

∅ = kein Wachstum nach Inkubation, X = Wachstum nach Inkubation, - = nicht getestet

Indirekte Beimpfungen der Testungen mit anschließender Sterilisation mit **10 µl unverdünnter Sporensuspension** ( $\approx 2,6 \times 10^6$  Sporen), Durchführung der Sterilitätskontrollen mit **10 µl steriler NaCl-Lösung**, Beimpfung der Keimrückgewinnungskontrollen mit **10 µl Sporensuspension in den angegebenen Verdünnungen**

Tab.3.4: Ergebnisse der Testungen im Vollzyklus für den Prüfkörper Gasschlauch

Getestetes Medizinprodukt: <b>Gasschlauch</b>			
	Test 1	Test 2	Test 3
Instrument 1 nach Sterilisation	∅	∅	∅
Instrument 2 nach Sterilisation	∅	∅	∅
Sterilitätskontrolle 1: NaCl	∅	∅	∅
Sterilitätskontrolle 2: NaCl	∅	∅	∅
Sterilitätskontrolle: Vlies-Streifen	∅	∅	∅
Keimrückgewinnungskontrolle 1 ( $10^{-5}$ )	X	X	X
Keimrückgewinnungskontrolle 2 ( $10^{-5}$ )	-	-	-
Keimrückgewinnungskontrolle 3 ( $10^{-6}$ )	X	X	X
Keimrückgewinnungskontrolle 4 ( $10^{-6}$ )	-	X	X
Keimrückgewinnungskontrolle 5 ( $10^{-7}$ )	X	X	X
Keimrückgewinnungskontrolle 6 ( $10^{-7}$ )	∅	-	-

∅ = kein Wachstum nach Inkubation, X = Wachstum nach Inkubation, - = nicht getestet

Indirekte Beimpfungen der Testungen mit anschließender Sterilisation mit **10 µl unverdünnter Sporensuspension** ( $=2,6 \times 10^6$  Sporen), Durchführung der Sterilitätskontrollen mit **10 µl steriler NaCl-Lösung**, Beimpfung der Keimrückgewinnungskontrollen mit **10 µl Sporensuspension in den angegebenen Verdünnungen**

Tab.3.5: Ergebnisse der Testungen im Vollzyklus für den Prüfkörper Probepfanne

Getestetes Medizinprodukt: <b>Probepfanne</b>						
	Test1	Test2	Test3	Test4	Test5	Test6
Instrument 1 nach Sterilisation	∅	X	∅	∅	∅	∅
Instrument 2 nach Sterilisation	∅	X	∅	∅	∅	∅
Sterilitätskontrolle 1: NaCl	∅	X	∅	∅	∅	∅
Sterilitätskontrolle 2: NaCl	∅	X	∅	∅	∅	∅
Sterilitätskontrolle: Vlies-Streifen	∅	∅	∅	∅	∅	∅
Keimrückgewinnungskontrolle 1 ( $10^{-5}$ )	X	X	X	X	X	X
Keimrückgewinnungskontrolle 2 ( $10^{-5}$ )	X	X	X	X	-	-
Keimrückgewinnungskontrolle 3 ( $10^{-6}$ )	X	X	X	X	X	X
Keimrückgewinnungskontrolle 4 ( $10^{-6}$ )	X	X	X	X	-	-
Keimrückgewinnungskontrolle 5 ( $10^{-7}$ )	∅	X	∅	X	∅	X
Keimrückgewinnungskontrolle 6 ( $10^{-7}$ )	X	X	X	X	-	-

∅ = kein Wachstum nach Inkubation, X = Wachstum nach Inkubation, - = nicht getestet

**Test 2: X = falsch-positive Ergebnisse durch kontaminierte NaCl-Lösung, Testung mehrfach wiederholt (Test 4-6)!**

Direkte Beimpfungen der Testungen mit anschließender Sterilisation mit **10 µl unverdünnter Sporensuspension** ( $=2,6 \times 10^6$  Sporen), Durchführung der Sterilitätskontrollen mit **10 µl steriler NaCl-Lösung**, Beimpfung der Keimrückgewinnungskontrollen mit **10 µl Sporensuspension in den angegebenen Verdünnungen**

Tab.3.6: Ergebnisse der Testungen im Vollzyklus für den Prüfkörper laparoskopische Fasszange

Getestetes Medizinprodukt: laparoskopische Fasszange			
	Test 1	Test 2	Test 3
Instrument 1 nach Sterilisation	∅	∅	∅
Instrument 2 nach Sterilisation	∅	∅	∅
Sterilitätskontrolle 1: NaCl			
	∅	∅	∅
Sterilitätskontrolle 2: NaCl			
	∅	∅	∅
Sterilitätskontrolle: Vlies-Streifen			
	∅	∅	∅
Keimrückgewinnungskontrolle 1 ( $10^{-5}$ )			
	X	X	X
Keimrückgewinnungskontrolle 2 ( $10^{-5}$ )			
	-	-	-
Keimrückgewinnungskontrolle 3 ( $10^{-6}$ )			
	X	X	X
Keimrückgewinnungskontrolle 4 ( $10^{-6}$ )			
	X	-	-
Keimrückgewinnungskontrolle 5 ( $10^{-7}$ )			
	∅	∅	∅
Keimrückgewinnungskontrolle 6 ( $10^{-7}$ )			
	-	-	-

∅ = kein Wachstum nach Inkubation, X = Wachstum nach Inkubation, - = nicht getestet

Direkte Beimpfungen der Testungen mit anschließender Sterilisation mit **10 µl unverdünnter Sporensuspension** ( $=2,6 \times 10^6$  Sporen), Durchführung der Sterilitätskontrollen mit **10 µl steriler NaCl-Lösung**, Beimpfung der Keimrückgewinnungskontrollen mit **10 µl Sporensuspension in den angegebenen Verdünnungen**

Tab.3.7: Ergebnisse der Testungen im Vollzyklus für den Prüfkörper Schraubendreher kanüliert

Getestetes Medizinprodukt: Schraubendreher kanüliert				
	Test 1	Test 2	Test 3	Test 4
Instrument 1 nach Sterilisation	∅	∅	∅	∅
Instrument 2 nach Sterilisation	∅	∅	∅	∅
Sterilitätskontrolle 1: NaCl				
	∅	∅	∅	∅
Sterilitätskontrolle 2: NaCl				
	∅	∅	∅	∅
Sterilitätskontrolle: Vlies-Streifen				
	∅	∅	∅	∅
Keimrückgewinnungskontrolle 1 ( $10^{-5}$ )				
	X	-	X	X
Keimrückgewinnungskontrolle 2 ( $10^{-5}$ )				
	X	-	X	X
Keimrückgewinnungskontrolle 3 ( $10^{-6}$ )				
	X	X	X	X
Keimrückgewinnungskontrolle 4 ( $10^{-6}$ )				
	X	X	X	X
Keimrückgewinnungskontrolle 5 ( $10^{-7}$ )				
	X	X	X	∅
Keimrückgewinnungskontrolle 6 ( $10^{-7}$ )				
	X	∅	∅	∅

∅ = kein Wachstum nach Inkubation, X = Wachstum nach Inkubation, - = nicht getestet

Indirekte Beimpfungen der Testungen mit anschließender Sterilisation mit **10 µl unverdünnter Sporensuspension** ( $=2,6 \times 10^6$  Sporen), Durchführung der Sterilitätskontrollen mit **10 µl steriler NaCl-Lösung**, Beimpfung der Keimrückgewinnungskontrollen mit **10 µl Sporensuspension in den angegebenen Verdünnungen**

Tab.3.8: Ergebnisse der Testungen im **Vollzyklus** für den Prüfkörper **T-Griff Spannbohrfutter**

Getestetes Medizinprodukt: <b>T-Griff Spannbohrfutter</b>			
	Test 1	Test 2	Test 3
Instrument 1 nach Sterilisation	∅	∅	∅
Instrument 2 nach Sterilisation	-	∅	-
Sterilitätskontrolle 1: <b>NaCl</b>	∅	∅	∅
Sterilitätskontrolle 2: <b>NaCl</b>	∅	∅	∅
Sterilitätskontrolle: <b>Vlies-Streifen</b>	∅	∅	∅
Keimrückgewinnungskontrolle 1 ( $10^{-5}$ )	-	X	-
Keimrückgewinnungskontrolle 2 ( $10^{-5}$ )	-	X	-
Keimrückgewinnungskontrolle 3 ( $10^{-6}$ )	X	X	X
Keimrückgewinnungskontrolle 4 ( $10^{-6}$ )	X	X	X
Keimrückgewinnungskontrolle 5 ( $10^{-7}$ )	∅	∅	∅
Keimrückgewinnungskontrolle 6 ( $10^{-7}$ )	X	X	∅

∅ = kein Wachstum nach Inkubation, X = Wachstum nach Inkubation, - = nicht getestet

Indirekte Beimpfungen der Testungen mit anschließender Sterilisation mit **10 µl unverdünnter Sporensuspension** ( $\approx 2,6 \times 10^6$  Sporen), Durchführung der Sterilitätskontrollen mit **10 µl steriler NaCl-Lösung**, Beimpfung der Keimrückgewinnungskontrollen mit **10 µl Sporensuspension in den angegebenen Verdünnungen**

### 3.6 Ergebnisse der mikrobiologischen Prüfungen nach Sterilisation im Halbzyklus

Nach keinem der beiden Sterilisations-Durchgänge im Halbzyklus konnten wachstumsfähige Sporen des *Geobacillus* nachgewiesen werden (Tab. 3.9, 3.10). Sowohl bei der Testung des Gasschlauches mit der indirekten Methode, also einem belasteten Vliesstreifen, als auch bei der laparoskopischen Faszange nach der direkten Methode (s. Abschnitte 2.3.2 + 2.3.3) blieb eine Trübung des Nährmediums aus. Insgesamt wurden dabei elf Instrumente an zwei Versuchstagen geprüft.

Bei allen Positiv-Kontrollen konnte innerhalb von zwei Wochen Wachstum dokumentiert werden. Alle Negativ-Kontrollen blieben klar.

**Tab.3.9:** Ergebnisse der Testungen im Halbzyklus für den Prüfkörper **Gasschlauch**

Getestetes Medizinprodukt: <b>Gasschlauch</b>		
	Test 1	Test 2
Instrument 1 nach Sterilisation	∅	∅
Instrument 2 nach Sterilisation	∅	∅
Instrument 3 nach Sterilisation	-	∅
Sterilitätskontrolle 1: <b>NaCl</b>		
	∅	∅
Sterilitätskontrolle 2: <b>NaCl</b>		
	∅	∅
Sterilitätskontrolle: <b>Vlies-Streifen</b>		
	∅	∅
Keimrückgewinnungskontrolle 1 ( $10^{-5}$ )		
	X	X
Keimrückgewinnungskontrolle 2 ( $10^{-5}$ )		
	X	X
Keimrückgewinnungskontrolle 3 ( $10^{-6}$ )		
	X	X
Keimrückgewinnungskontrolle 4 ( $10^{-6}$ )		
	X	X
Keimrückgewinnungskontrolle 5 ( $10^{-7}$ )		
	X	X
Keimrückgewinnungskontrolle 6 ( $10^{-7}$ )		
	X	X

∅ = kein Wachstum nach Inkubation, X = Wachstum nach Inkubation, - = nicht getestet

Indirekte Beimpfungen der Testungen mit anschließender Sterilisation mit **10 µl unverdünnter Sporensuspension** ( $=2,6 \times 10^6$  Sporen), Durchführung der Sterilitätskontrollen mit **10 µl steriler NaCl-Lösung**, Beimpfung der Keimrückgewinnungskontrollen mit **10 µl Sporensuspension in den angegebenen Verdünnungen**

Tab.3.10: Ergebnisse der Testungen im Halbzyklus für den Prüfkörper laparoskopische Faszange

Getestetes Medizinprodukt: laparoskopische Faszange		
	Test 1	Test 2
Instrument 1 nach Sterilisation	Ø	Ø
Instrument 2 nach Sterilisation	Ø	Ø
Instrument 3 nach Sterilisation	Ø	Ø
Sterilitätskontrolle 1: NaCl	Ø	Ø
Sterilitätskontrolle 2: NaCl	Ø	Ø
Sterilitätskontrolle: Vlies-Streifen	Ø	Ø
Keimrückgewinnungskontrolle 1 ( $10^{-5}$ )	X	X
Keimrückgewinnungskontrolle 2 ( $10^{-5}$ )	X	X
Keimrückgewinnungskontrolle 3 ( $10^{-6}$ )	X	X
Keimrückgewinnungskontrolle 4 ( $10^{-6}$ )	X	X
Keimrückgewinnungskontrolle 5 ( $10^{-7}$ )	X	X
Keimrückgewinnungskontrolle 6 ( $10^{-7}$ )	X	X

Ø = kein Wachstum nach Inkubation, X = Wachstum nach Inkubation

Direkte Beimpfungen der Testungen mit anschließender Sterilisation mit **10 µl unverdünnter Sporensuspension** ( $=2,6 \times 10^6$  Sporen), Durchführung der Sterilitätskontrollen mit **10 µl steriler NaCl-Lösung**, Beimpfung der Keimrückgewinnungskontrollen mit **10 µl Sporensuspension in den angegebenen Verdünnungen**

### 3.7 Zusammenfassung der Ergebnisse der mikrobiologischen Prüfungen

Insgesamt wurden im Halb- und Vollzyklus 26 Versuchsdurchläufe durchgeführt und dabei jeder der 6 verschiedenen Prüfkörper 4 bis 12-mal getestet. Die Gesamtzahl der geprüften Objekte beläuft sich somit auf 52 (Tab. 3.11).

**Tab.3.11:** Übersicht über **Versuchsanzahl und Gesamtzahl** der getesteten Instrumente für **Halb- und Vollzyklus** insgesamt

Instrument	Versuchstage/ Instrument	Anzahl d. getesteten Instrumente gesamt	Wachstum nach Sterilisation
Probepfanne	6	12	2*
Einschläger	3	5	0
T-Griff Spannbohrfutter	3	4	0
kanül. Schraubendreher	4	8	0
lap. Faszange	5	12	0
Gasschlauch	5	11	0
<b>Gesamt</b>	<b>26</b>	<b>52</b>	<b>2*</b>

\* dazugehörige Negativkontrolle ebenfalls positiv (s. Kap. 3.5, Tab. 3.5)

An einem Versuchstag wurden vermehrungsfähige Sporen **nach Sterilisation** auf dem Medizinprodukt „Probepfanne“ nachgewiesen. Die dazugehörigen Sterilitätskontrollen der NaCl-Lösung wiesen ebenfalls eine Trübung in der Nährlösung (Wachstum) auf und wurden somit als „positiv“ dokumentiert (Tab. 3.5, Kap. 3.5). Für den Prüfkörper Probepfanne wurden deshalb drei zusätzliche Versuche zur Abklärung durchgeführt, welche negative Ergebnisse (kein Wachstum) lieferten. Bei den folgenden Testungen wurden aus diesem Grund nur noch frische und noch verschlossene NaCl-Lösungen verwendet. Das Problem trat danach nicht mehr auf.

Der Nachweis wachstumsaktiver Sporen nach Beimpfung mit der 7. Verdünnungsstufe gelang bei 27 von 43 Versuchen (62,8%) (Tab. 3.12).

**Tab.3.12:** Übersicht über Anzahl und Ergebnisse der Keimrückgewinnungskontrollen der Testungen im Halb- und Vollzyklus

<b>Instrument</b>	<b>Anzahl der Keimrückgewinnungskontrollen</b>	<b>Keimrückgewinnungskontrollen der 7. Verd.stufe / davon positiv</b>
Probepfanne	30	10 / 7
Einschläger	13	4 / 3
T-Griff Spannbohrfutter	14	6 / 2
kanül. Schraubendreher	22	8 / 4
laparoskopische Fasszange	22	7 / 4
Gasschlauch	24	8 / 7
<b>Gesamt</b>	<b>125</b>	<b>43 / 27</b>

Dieser Wert deckt sich in etwa mit den Ergebnissen der auf Blutplatten ausgestrichenen 7. Verdünnungsstufe (Tab. 3.1, Kap. 3.2). Hier waren im Mittel 0,45 Kolonien auf den Platten gewachsen.

Nach Belastungen mit 10 µl aus den Verdünnungen  $10^{-5}$  und  $10^{-6}$  wurden dagegen in allen Versuchen Sporen zurückgewonnen. Demnach lassen sich mit der beschriebenen Methode weniger als 10 Sporen von einem Instrument zurückgewinnen und nachweisen.

## 4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung einer mikrobiologischen Prüfung chirurgischer Instrumente, bei denen vorab im Rahmen einer Validierung des Sterilisationsprozesses während Dampfsterilisation keine ausreichend hohen bzw. ausreichend lang gehaltenen Temperaturen messbar gewesen waren [45]. Dies war bei sechs Instrumenten verschiedener Geometrie und unterschiedlicher Materialien der Fall. Die mikrobiologische Prüfmethode sollte möglichst einfach und reproduzierbar sein und die Wirksamkeit der Dampfsterilisation sicher belegen. Das Verfahren sollte soweit wie möglich den Anforderungen der DIN 58946-6 [44] entsprechen.

Von den sechs bei der Validierung beanstandeten und deshalb mikrobiologisch nachzutestenden Instrumenten besitzt die laparoskopische Fasszange (Art.-Nr.: 8.393.254, Fa. Wolf, Abb. 2.9) ein besonders enges Lumen, welches im zusammengebauten Zustand von der so genannten Seele (Abb. 2.8, 2.15) ausgefüllt wird. Diese Eigenschaft macht es bei physikalischen Messungen sehr schwierig oder sogar unmöglich, elektronische Sensoren in dem Hohlraum anzubringen. Aus diesem Grund gibt es Überlegungen, derartige Instrumente vor dem Sterilisationsprozess in Einzelteile zu zerlegen. Ein solches Vorgehen beinhaltet aber wiederum einige Nachteile, wie erhöhten Zeitaufwand, Gefahr des schnelleren Verschleißes und Fehler beim Zusammenbau der Instrumente sowie höhere Kosten. Hinsichtlich der Qualität der Dekontamination scheint ein Zerlegen der Instrumente keine Vorteile zu bieten [25].

Die Sensoren liefern bei thermo-elektrischen Messungen lediglich quantitative Werte (Temperatur, Druck). Doch ist es mit ihnen nicht möglich Aussagen über die Qualität des Dampfes zu treffen, also zwischen Dampf (Kondensat), nicht kondensierbaren Gasen (NKG) und Luft unterscheiden zu können [52]. Somit kann nicht überprüft werden, ob ein Vordringen von Wasserdampf an bestimmten Stellen durch Lufteinschlüsse bei Hohlkörpern verhindert wird, was für die Sterilisationswirkung entscheidend ist.

Der Gasschlauch (ohne Nr., Fa. Wolf) besitzt gegenüber der Fasszange ein größeres Lumen, besteht aber aus Kunststoff. Bei der thermo-elektrischen Prüfung könnte der Kunststoff als Isolator gewirkt haben oder das Lumen ebenfalls zu klein zum Anbringen der Sonden gewesen sein.

Ähnliche Effekte mit Kunststoff-Beschichtungen werden bei den Instrumenten „Probepfanne“ (Art.-Nr. ICH 006400, Fa. Mecron), „Einschläger“ (ICH 8008-20, Fa. Mecron), „Schraubendreher-kanüliert“ (Art.-Nr. 201-100, Fa. Tantum) und „T-Griff- Spannbohrfutter“ (Art.-Nr. 200-110, Fa. Tantum) vermutet. Die Probleme bei den thermo-elektrischen Messungen verwundern, da es sich bei letztgenannten Instrumenten um unkomplizierte und leicht zugängliche Instrumente handelt. Ähnliche Situationen müssten auch bei anderen Instrumenten mit ähnlicher Geometrie und gleichen Materialien auftreten.

Falls die thermoelektrische Methode nicht möglich ist oder fehlerhafte Ergebnisse liefert, kann und soll mit belasteten Prüfkörpern die Qualität der Aufbereitung bestimmt werden (DIN 866-3).

Solche mikrobiologischen Prüfungen sind jedoch mit einem ungleich höheren Aufwand verbunden, denn jeder Prüfkörper muss mit geeigneten Prüforganismen (z.B. Sporen von *G. stearothermophilus*) beimpft werden. Außerdem soll ein quantitativer Nachweis des Prüforganismus vom Prüfkörper möglich sein, der für jeden Prüfkörper evaluiert werden muss. Der höhere Aufwand wirkt sich entsprechend auf die Kosten einer Prüfung aus. Das Ergebnis der mikrobiologischen Prüfung liegt erst nach entsprechender Inkubationszeit des Prüforganismus vor und ist nicht wie bei physikalischen Methoden sofort ablesbar. Die mikrobiologische Prüfung liefert ja/nein-Resultate bezüglich eines Keim-Wachstums am Ende eines aus mehreren Verfahrensschritten bestehenden Prozederes und keine eindeutigen Messwerte wie die Temperaturmessung. Folglich ist bei der mikrobiologischen Prüfung das Risiko individueller und systematischer Fehler, die vor allem vom Untersucher abhängen höher als bei Messung physikalischer Parameter. Dieses individuelle Risiko muss durch genaue Festlegung einer Standardarbeitsanweisung sowie durch Schulung des Untersuchers minimiert werden. Trotz der offensichtlichen Vorteile können die geometrischen Eigenschaften oder das Material eines Prüfkörpers den Einsatz der Temperaturmessung für die Prüfung limitieren, z.B. bei sehr engen Lumina oder Kunststoffoberflächen. Mit Sporensuspensionen kann dagegen praktisch direkt jede Stelle des Testobjekts beimpft und die Qualität des Sterilisationsprozesses überprüft werden. Wenn kein fertiger beimpfter Keimträger an den kritischen Stellen des Medizinproduktes angebracht werden kann, ist dafür eine direkte Beimpfung des Medizinproduktes mittels einer Suspension vorzunehmen (DIN 58946-6).

Dazu wurde für die in dieser Arbeit dargestellten Prüfungen eine selbst hergestellte Sporensuspension aus Agarkulturen von *G. Stearothermophilus* verwendet. Gemäß EN 866-1:1997 (Abschnitt 5.1) wurden Prüfkeime eines definierten Stammes ausgewählt [32].

Die Reinheit der Suspension wurde durch verschiedene Methoden sichergestellt bzw. geprüft. Durch mehrmaliges Waschen und Aufbewahrung in Ethanol wurden Nicht-Sporen-Bildner abgetötet [42]. Dazu verhindert die hohe Inkubationstemperatur von 56 °C im Brutschrank das Wachstum fast aller anderen Mikroorganismen. Auch die typische Koloniemorphologie, der Geruch sowie die mikroskopische Darstellung nach Gramfärbung sicherte die Homogenität der Sporenpräparation.

Kleinere Verunreinigungen vor allem durch Bestandteile lysierter vegetativer Zellen waren auch nach zusätzlichen Reinigungsschritten nicht vermeidbar. Der Einfluss dieser Zellbestandteile auf die Prüfung konnte nicht untersucht werden. Die Abtötung der Sporen durch Sterilisation wird voraussichtlich durch Membran und Proteinbestandteile jedoch eher erschwert, so dass hierdurch keine falsch negativen Ergebnisse zu erwarten sind. Bei im Vorfeld durchgeführten Versuchen durch Hitzeaktivierung oder Ultraschallbehandlung wurde keine Steigerung der Wachstumsaktivität der Sporen erreicht (Tab. 3.2). Außerdem gab es aufgrund konstanter und zuverlässiger Zahlen vermehrungsfähiger Sporen (Tab. 3.1) ohne Aktivierung und der damit eher geringen Bedeutung für die Testung keinen Anlass diesen Ansatz weiter zu verfolgen. Hinweise auf eine Abnahme der Wachstumsaktivität über den Versuchszeitraum waren nicht zu erkennen (Abb. 3.3). Auch die statistische Auswertung (lineare Regression) ergab keine Anhaltspunkte, die für eine Zu- oder Abnahme der Kolonie-bildenden Einheiten sprechen. Die aufgetretenen Schwankungen der Lebendkeimzahlen können dabei als normal betrachtet werden. Durch zwei Bestimmungen an jedem Versuchstag ist die Sicherheit für verlässliche und gleich bleibende Bedingungen für alle Versuchsdurchführungen gegeben.

Wenn möglich wurde bei der Beimpfung der Prüfkörper der direkten Methode der Vorzug gegeben. Bei ihr wurde die Suspension in der für die Probe benötigten Konzentration aufgetrocknet und mit einem sterilen und angefeuchteten Vlies-Streifen bei der Rückgewinnung abgewischt. Die Sporen wurden somit direkt auf der Oberfläche des Instruments platziert und somit eine Kontamination erreicht wie sie im

alltäglichen Betrieb entstehen könnte. War bei schwierig zu erreichenden Teststellen eine Beimpfung auf diese Weise nicht möglich oder die Handhabung zu unsicher, wurde nach der indirekten Methode verfahren. Bei ihr musste der „Umweg“ über einen beimpften Vlies-Streifen für eine zuverlässige und gut durchführbare Prüfung in Kauf genommen werden. Nachteil dabei ist, dass die Sporen sich nicht direkt auf der Oberfläche des Prüfkörpers bei der Sterilisation befinden, sondern unmittelbar darüber. Dagegen hat dies den Vorteil, dass der Vlies-Streifen bei der Rückgewinnung einfach mit einer sterilen Pinzette entnommen werden kann und somit ein Abwischen der Teststelle entfällt. Es ist dadurch anzunehmen, dass die aufgebrachte Menge an Sporen nahezu gleich der rückgewonnenen ist und somit wahrscheinlich geringere Verluste resultieren.

Ein beimpftes Instrument, das zur Prüfung eines Sterilisationsprozesses eingesetzt wird, ist als mikrobiologischer Prüfkörper anzusehen. In der DIN 866-3:1997-05, Abschnitt 8 wird für mikrobiologische Prüfkörper die Bestimmung eines D-Wertes gefordert. Der D-Wert ist die Zeit in Minuten, bei der die Menge eines Testorganismus bei festgelegter Temperatur um den Faktor 10 reduziert wird. Material und Oberflächenstruktur des Sterilisiergutes sowie des Suspensionsmittels, bzw. dessen Trocknungsrückstände, beeinflussen die Abtötungskinetik des Prüfkeims und somit auch dessen D-Wert. Werden unterschiedliche Sterilisationsverfahren miteinander verglichen, muss die Menge des Prüfkeims auf dem Prüfkörper dem D-Wert angepasst werden. In der vorliegenden Arbeit waren Verfahren, Temperatur und Zeit des Sterilisationsprozesses vorgegeben, sodass eine Reduktion des Testkeims um 6 log-Stufen auf jedem der einzelnen Instrumente bzw. auf den Kompressen als Zielvorgabe definiert wurde. Die Wirksamkeit eines vorgegebenen Verfahrens wurde an unterschiedlichen Instrumenten überprüft. Auf eine D-Wert-Bestimmung für jeden Prüfkörper konnte daher verzichtet werden.

Es wurden zusätzliche Versuche mit halbiertes Haltezeit (2,5 Min., Halbzyklus) durchgeführt, wie dies auch in DIN 58946-6:2002-04 (Seite 26) vorgeschlagen wird [44]. Dies bedeutet eine zusätzliche Sicherheit für den Nachweis einer funktionierenden Keimabtötung an den getesteten Stellen ausgehend von einer nachgewiesenen Sterilität nach 5 Minuten Haltezeit. Bei einer Belastung mit  $>2 \times 10^6$  Sporen, ist bei Sterilität nach bereits 2,5 Minuten von einer Reduktion um mindestens 9 log-Stufen bei 5 Minuten Haltezeit auszugehen.

Grundlage einer validen Prüfung ist die Gewissheit über die Menge der auf den Prüfkörper aufgebracht und später nachweisbaren Sporen. Die DIN 58946-6:2002-04 A.6 fordert daher die Quantifizierung der aufgetragenen Sporen nach Rückgewinnung vom belasteten Prüfkörper.

Die quantitative Keimrückgewinnung erfolgt üblicherweise durch Abspülen der Sporen mit Medium, kultureller Anzucht auf Festmedien und Zählung der Kolonien. Die Anzahl der so nachzuweisenden Sporen bestimmt die Menge der vor Sterilisation aufzubringenden Sporen. Nach Sterilisation dürfen keine Sporen mehr auf dem Instrument nachweisbar sein. Der quantitative Nachweis von Sporen ist labortechnisch aufwendig und beinhaltet mehrere Fehlerquellen, die eine Reproduzierbarkeit erschweren. Die größten Ungenauigkeiten treten bei der Rückgewinnung vom Prüfkörper auf. So ist beim Abspülen die Gefahr der Fremdkontamination hoch und die Reproduzierbarkeit einer quantitativen Rückgewinnung schwer zu erzielen. Ein Teil der Sporen könnte an Gefäßen vor und beim Ausplattieren auf Nährmedium hängen bleiben. Zusätzlich besteht die Fehlerquelle einer ungenauen Auszählung der gewachsenen Kolonien.

In der vorliegenden Arbeit wurde nicht die auf das Instrument aufgetragene Sporenzahl quantifiziert, sondern die auf dem Instrument minimal nachweisbare Sporenmenge mit Hilfe von Verdünnungen der Sporensuspension titriert. Durch die Titration der minimal nachweisbaren Menge entfiel die Notwendigkeit der quantitativen Sporenbestimmung auf dem Instrument. Nach Belastung mit der minimal nachweisbaren Sporenmenge ist lediglich ein qualitativer Nachweis, also Wachstum oder kein Wachstum nötig. Die Instrumente wurden für die Prüfung mit der  $10^6$ -fachen Menge der titrierten minimal nachweisbaren Menge Sporen belastet. Bei jeder Testung wurden mehrere Kontrollen zur mindestens nachweisbaren Keimzahl durchgeführt. Dazu wurden gleiche Instrumente mit 5 bis 7 log-Stufen verdünnten Suspensionen parallel zur eigentlichen Prüfung mit unverdünnter Suspension belastet. Aus der unverdünnten und der verdünnten Suspension wurde die Sporenzahl durch Ausplattierung auf eine Blutplatte und Auszählung der gewachsenen Kolonien quantifiziert. Durch diese Methode entfällt die aufwendige und fehleranfällige Quantifizierung von Sporen, die nach Belastung und Antrocknung zurückgewonnen werden müssen. Die Notwendigkeit einer solchen Quantifizierung auf dem Prüfkörper wäre lediglich bei der Annahme gegeben, dass der akzidentelle Verlust durch Abrieb oder ein Absterben der Sporen vor der Sterilisation bei

Belastung mit einer Verdünnung anteilig größer sei. Bei der hohen Umweltresistenz von *G. stearothermophilus*-Sporen [32, 41] ist diese theoretische Annahme jedoch praktisch auszuschließen.

Der qualitative Nachweis von Sporen auf dem Prüfkörper wurde in Vorversuchen mit drei verschiedenen Methoden erprobt. Dabei erwies sich das Inkubieren des kompletten Medizinproduktes in Nährmedium wegen der Größe einzelner Instrumente als unpraktikabel. Es werden große Behälter für die Inkubation benötigt, was erhöhten Bedarf an Medium und Raum in entsprechenden Brutschränken erforderlich macht. Zudem ist vor allem in großen, flachen Behältnissen mit großer Oberfläche (z.B. Wannen) die Gefahr einer Fremdkontamination erhöht. Die Problematik der Fremdkontamination zeigte sich auch bei dem Versuch, Keime durch mehrmaliges Abspülen mit Nährmedium zurückzugewinnen. Außerdem können angetrocknete Sporen, besonders bei komplizierten Instrumenten (z.B. Instrumente mit Lumina), nur sehr schwer oder gar nicht von der Spüllösung erreicht werden, was ebenfalls zu unsicheren Ergebnissen führt. Dagegen stellte sich das Abwischen mit einem mit steriler NaCl-Lösung leicht angefeuchteten sterilen Tupfer als eine sehr zuverlässige Methode heraus. An komplizierten schwer erreichbaren Stellen (z.B. Lumina) lieferte das indirekte Verfahren die verlässlichsten Ergebnisse. Dabei wurden sterile Tupfer in erforderlicher Größe mit der entsprechenden Sporenzahl belastet und zur Rückgewinnung wieder entnommen.

Ein entscheidendes Element jeder mikrobiologischen Sterilitätskontrolle ist der Ausschluss von Kontaminationen, die zu falsch positiven Ergebnissen führen. Die Möglichkeiten einer Kontamination nach Sterilisation, die dann zu einem solchen falschen Ergebnis führen würden sind vielseitig. Besonders kritisch ist der Ausschluss von Laborkontaminationen mit *G. stearothermophilus*-Sporen. Bei Transport aus der ZSVA sind die Instrumente durch die Aufbewahrung in den Packsieben und dem vorsichtigen Transport auf einem Rollwagen vor Kontamination sicher geschützt. Entscheidend sind die Handhabung nach Öffnung der sterilisierten Siebe und die Sorgfalt im Umgang mit allen verwendeten Materialien und Lösungen. Sterilitätskontrollen der Kochsalzlösung und der sterilen Tupfer sind obligat ebenso bei jeder Prüfung eine Probe von einem nicht belasteten Instrument. Durch die Sterilitätskontrollen zum Ausschluss von Kontaminationen konnte ein positives Ergebnis als falsch-positiv wegen gleichzeitiger positiver Sterilitätskontrolle bewertet

werden. Die Ursache dafür lag mit hoher Wahrscheinlichkeit an einer kontaminierten Kochsalz-Lösung. Die Prüfung wurde nach Ausschluss aller Fehlerursachen gemäß DIN 58946-6:2002-04 A.8.1 mehrfach wiederholt (Tab. 3.5, Tests 4-6) und für jeden Versuch eine neue und noch ungeöffnete Flasche mit steriler NaCl-Lösung benutzt. Das Problem falsch-positiver Ergebnisse trat danach nicht mehr auf.

Daneben wurde darauf geachtet, die Aufbewahrung und Transportbedingungen der Instrumente bei der mikrobiologischen Prüfung unter den gleichen Bedingungen durchzuführen wie im Routinebetrieb. Dies beinhaltet auch die Verpackung, die Anordnung des Gutes in der Verpackung, die Menge und Anordnung der gesamten Beladung und den Verfahrensablauf (DIN 58946-6:2002-04 A5). Die in der Arbeit dargestellten Prüfungen wurden an maschinell chemisch-thermisch gereinigten und desinfizierten Instrumenten durchgeführt. Gegenstand dieser Arbeit war lediglich die Überprüfung der Sterilisation an bestimmten Stellen der Instrumente. Mögliche Fehler in den vorhergehenden Schritten der Instrumentaufbereitung wurden nicht überprüft. Zum Beispiel könnten nicht entfernte Verschmutzungen (z.B. Blut, Proteinreste, Fetthüllen) an Instrumenten zu einem Überleben von wachstumsaktiven Keimen und somit zu abweichenden Ergebnissen führen. Dies könnte Gegenstand weiterer Versuchsdurchführungen werden.

Da bei Belastung der Instrumente mit der um mindestens 6 log-Stufen verdünnten Sporensuspension in allen Fällen Wachstum nachgewiesen werden konnte und bei Belastung mit unverdünnter Suspension nach Dampfsterilisation in keinem Fall Wachstum erfolgte, kann mit diesem Verfahren eine Keimzahlreduzierung um mindestens 6 log-Stufen nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen somit, dass die mikrobiologische Nachtestung an den sechs Instrumenten keine Hinweise auf ein Ausbleiben der Sterilisationswirkung liefert. Auch die Prüfungen an zwei Instrumenten mit halbierten Haltezeit (Halbzyklus, 2,5 Min.), welche eine Minute unter der vorgeschriebenen Mindestdauer und 2,5 Minuten unter der im Routinebetrieb üblichen Haltezeit liegt, ergaben keinen Anhaltspunkt auf ein Überleben wachstumsaktiver Keime.

Somit ist davon auszugehen, dass die Ergebnisse der thermo-elektrischen Prüfung auf Probleme in der Versuchsanordnung oder Fehler bei der Durchführung (z.B. durch Beschädigungen oder Verrutschen der Messsonden) zurückzuführen sind. Dabei könnten auch die Oberflächeneigenschaften der Kunststoff-Beschichtung

einiger Instrumente eine Rolle gespielt haben. Für die laparoskopische Faszange, bei welcher das Lumen für das Einbringen der Sensoren zu klein war, konnte mikrobiologisch der Nachweis der Sporenabtötung durch den Sterilisationsprozess erbracht werden.

Die beschriebenen Kontrollen belegen, dass die vorgestellte Methode der mikrobiologischen Testung von Medizinprodukten richtige und zuverlässige Ergebnisse liefert. Dies zeigt auch die aufgeführte falsch-positive Probe, welche durch kontaminierte Materialien produziert wurde (Tab. 3.5, 3.11). Die Durchführung des Verfahrens ist technisch unkompliziert, schnell und leicht reproduzierbar. Die Testung sollte dennoch, wie in EN 866-1:1997, A4.1.4 gefordert, von entsprechend ausgebildetem Laborpersonal mit mikrobiologischer Erfahrung durchgeführt werden. Die Kosten sind gering, würden beim Kauf der Sporensuspension, wie in zertifizierten Laboren möglicherweise erforderlich, jedoch steigen.

Die Messung der physikalischen Parameter Druck, Dampfsättigung und Temperatur bleibt mit Blick auf Reproduzierbarkeit, Verlässlichkeit und Aufwand bei der Durchführung die Methode der Wahl bei der Validierung von Sterilisatoren. Innerhalb enger Lumina, wie bei der Faszange, oder auf bestimmten Oberflächen scheint sie jedoch fehlerhafte oder keine Ergebnisse zu liefern. Dabei sind gerade an diesen Stellen die erreichten Temperaturen und damit die Sterilisationswirkung von Bedeutung. Hier kann eine mikrobiologische Prüfung der Instrumente Sicherheit erbringen. Für ein recht unkompliziertes Instrument wie den Einschläger wirft das Versagen der thermoelektrischen Prüfung Zweifel an der Messtechnik auf. Dies mag ein im vorgestellten Fall einmaliges Ereignis sein, sollte aber Grund zur kritischen Beurteilung für künftige Prüfungen sein. Derartige Ergebnisse schaffen große Unsicherheit in einem so sensiblen und für die Infektionsprävention wichtigen Bereich wie der zentralen Sterilgutaufbereitung.

Trotz der in der vorliegenden Arbeit vereinfachten Methode einer mikrobiologischen Prüfung stellt ein solches Verfahren für jeden Betreiber einen hohen Aufwand dar. Besonders bei komplizierten kritischen Instrumenten sollten schon die Hersteller Empfehlungen zur Überprüfung der Sterilisation erarbeiten, wie dies laut DIN EN ISO 17664 auch gefordert wird. Für die Testung und den Sterilisationsprozess problematische Stellen sollten vor der Markteinführung ausgiebig getestet und beschrieben werden. Verbleibende individuelle

Unsicherheiten bei der Beurteilung des Sterilisationsprozesses einzelner Instrumente können mit dieser zuverlässigen und praktikablen Methode mikrobiologisch überprüft werden.

## 5. Zusammenfassung

### 5.1 Zusammenfassung (deutsch)

Die Prüfung von Sterilisationsprozessen erfolgt üblicherweise über eine Messung der thermophysikalischen Parameter. Bei bestimmten Oberflächen oder bei Instrumenten mit sehr engen Lumina führt die thermophysikalische Prüfung entweder zu negativen Ergebnissen – z.B. nicht erreichten Haltezeiten – oder ist technisch nicht möglich. Aus diesem Grund kann für solche Instrumente eine mikrobiologische Prüfung notwendig werden. Eine solche Forderung kann zu erheblichen Kosten und zu rechtlichen Unsicherheiten führen.

In der hier präsentierten Studie wurden für Instrumente, die entweder die thermophysikalische Prüfung nicht bestanden oder bei denen eine solche aus technischen Gründen durch einen zertifizierten Validierer nicht durchführbar war, ein Protokoll für eine mikrobiologische Prüfung entwickelt. Die Instrumente wurden mit  $>10^6$  Sporen aus einer Suspension mit *G. stearothermophilus* belastet. In den Positivkontrollen wurden die Instrumente mit einer um 6 bzw 7 log-Stufen verdünnten Suspension belastet. Es wurden verschiedenen Instrumente mit Kunststoffoberflächen und laparoskopische Instrumente mit sehr engen Lumina untersucht. Die Sterilisation erfolgte in fraktioniertem Vakuumverfahren bei 134 °C. Die Sporen wurden mit sterilen Tupfern von den Instrumenten abgewischt, die Tupfer anschließend bei 56 °C in CaSo-Bouillon 7 Tage bebrütet.

Bei Belastung der Instrumente mit der um mindestens 6 log-Stufen verdünnten Sporesuspension konnte in allen Fällen Wachstum nachgewiesen werden. Bei den bisher durchgeführten Versuchen wurde nach Dampfsterilisation bei den mit der unverdünnten Sporesuspension belasteten Instrumenten in keinem Fall Wachstum beobachtet. Damit konnte eine Reduktion der Sporenzahl um mindestens 6 log-Stufen gezeigt werden.

Die Daten dokumentieren eine Möglichkeit der mikrobiologischen Nachtestung von Medizinprodukten die aufgrund ihrer Oberflächeneigenschaften oder ihrer Geometrie nicht mit thermophysikalischen Methoden prüfbar sind. Besonders bei engen Lumina, bei denen gegebenenfalls die Dampfdringung nicht gewährleistet ist, könnte eine solche Methode eine wichtige Ergänzung zu den thermophysikalischen Methoden darstellen.

## 5.2 Summary (english)

Testing of sterilisation process is commonly performed by assessment of thermo-physical parameters. For complex surgical instruments thermo-physical testing might not ensure sterilisation, either because of special characteristics of material or geometry of the instrument. Therefore, microbiological testing might be asked to complete validation of sterilisation process of certain instruments.

In the presented study different instruments, which failed validation after assessment of the sterilisation process by thermo-physical parameters, were tested by microbiological methods. The selection of instruments comprised instruments with plastic surfaces and instruments with extreme tight lumens. Instruments were charged with a suspension of *Geobacillus stearothermophilus* spores. Positive controls were charged with dilutions of the spore suspension to demonstrate the rate of recovery. Sterilisation was performed by vapour sterilisation at 134 °C under vacuum fractionation. Spores were recovered with sterile swabs which were incubated in CaSo-bouillon at 56 °C for seven days.

Recovery of spores or growth of *G. stearothermophilus* respectively was shown even after charge with a 6-log dilution of spore suspension. So far, no bacterial growth was shown after performance of vapour sterilisation. Although, for tight lumens sterilisation effectiveness seems to range in a borderline area, which was shown by assessments performed under “half cycle” conditions.

Uncertainties of thermo-physical assessment of sterilisation of complex surgical instruments require systematic assessment. To avoid these uncertainties, which might also implicate forensic consequences, validation of sterilisation processes by manufacturers of instruments including microbiological testing should be discussed.

## 5. Literaturverzeichnis

1. Ayliffe, G.: *Decontamination of minimally invasive surgical endoscopes and accessories*. J Hosp Infect, 2000. 45(4): p. 263-77.
2. Töre, H.: *Medizintechnische Geräte und Instrumente als Ursache nosokomialer Infektionen, eine Literaturstudie*. 1999.
3. Ulualp, K.M., et al.: *Is it possible to resterilize disposable laparoscopy trocars in a hospital setting?* Surg Laparosc Endosc Percutan Tech, 2000. 10(2): p. 59-62; discussion 62-5.
4. Eikmann, T., Christiansen, B., Exner, M., Herr, C., Kramer, A.: *Hygiene in Krankenhaus und Praxis*. Vol. 2. Erg.-Lfg. 2006. Kap. 4.11.2, S.1-8.
5. Rüden, H., Daschner, F., Schumacher, M.: *Nosokomiale Infektionen in Deutschland: Erfassung und Prävention; (NIDEP-Studie)*. 1995: Nomos-Verlagsgesellschaft mbH & Co KG, Baden-Baden. S. 56.
6. Nichols, R.L. and S. Florman: *Clinical presentations of soft-tissue infections and surgical site infections*. Clin Infect Dis, 2001. 33 Suppl 2: p. S84-93.
7. NRZ: *KISS Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System in Modul OP-KISS 2002-2006*. 2007, Nationales Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen. p. 3,4,20,21.
8. Barie, P.S., Eachempati, S. R.: *Surgical site infections*. Surg Clin North Am, 2005. 85(6): p. 1115-35, viii-ix.
9. Sorensen, L.T., et al.: *Risk factors for tissue and wound complications in gastrointestinal surgery*. Ann Surg, 2005. 241(4): p. 654-8.

10. Inigo, J.J., et al.: *Surgical site infection in general surgery: 5-year analysis and assessment of the National Nosocomial Infection Surveillance (NNIS) index*. Cir Esp, 2006. 79(4): p. 224-30.
11. Babcock, H.M., et al.: *Surgical site infections after arthroscopy: Outbreak investigation and case control study*. Arthroscopy, 2003. 19(2): p. 172-81.
12. Asensio, A. and J. Torres: *Quantifying excess length of postoperative stay attributable to infections: a comparison of methods*. J Clin Epidemiol, 1999. 52(12): p. 1249-56.
13. Kirkland, K.B., et al.: *The impact of surgical-site infections in the 1990s: attributable mortality, excess length of hospitalization, and extra costs*. Infect Control Hosp Epidemiol, 1999. 20(11): p. 725-30.
14. Merle, V., et al.: *Assessment of prolonged hospital stay attributable to surgical site infections using appropriateness evaluation protocol*. Am J Infect Control, 2000. 28(2): p. 109-15.
15. Wong, E.S.: *The price of a surgical-site infection: more than just excess length of stay*. Infect Control Hosp Epidemiol, 1999. 20(11): p. 722-4.
16. Zoutman, D.E., et al., *The state of infection surveillance and control in Canadian acute care hospitals*. Am J Infect Control, 2003. 31(5): p. 266-72; discussion 272-3.
17. Kramer, A.: *Krankenhaus- und Praxishygiene*. Vol. 1. Auflage. 2001: Urban & Fischer Verlag, München.
18. Bundesgesundheitsblatt: *Anforderungen an die Hygiene bei der Aufbereitung von Medizinprodukten*. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz, 2001.

19. Röhlig, H.-W.: (1998) *ZSVA-Spiegel - "Validierung in Recht und Praxis"*.  
URL:<http://www.hygiene-arge.de/BAG/PDF/9816.PDF>
20. Kramer, A., Assadian, O.: *Wallhäußers Praxis der Sterilisation, Desinfektion, Antiseptik und Konservierung*. 2008: Verlag: Thieme, Stuttgart.
21. IMIKRO: *Hygiene Skript - Sterilisation - gestufter Wirkungsbereich*. Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene des Universitätsklinikums Rostock. 5,  
URL:[http://www.imikro.uni-rostock.de/Doku/Lehre/VHyg/V\\_Desinfektion\\_Sterilisation.pdf](http://www.imikro.uni-rostock.de/Doku/Lehre/VHyg/V_Desinfektion_Sterilisation.pdf)
22. Wallhäußer, K.H.: *Praxis der Sterilisation, Desinfektion, Konservierung, Keimidentifizierung, Betriebshygiene*. Vol. Auflage: 5., 2005: Thieme, Stuttgart. 705.
23. van Doornmalen, J.P., Dankert, J.: *A validation survey of 197 hospital steam sterilizers in The Netherlands in 2001 and 2002*. *J Hosp Infect*, 2005. 59(2): p. 126-30.
24. Steiger, E., Gräfe, H., Havlin, I.: *Sterilisation durch gespannten Dampf. Handbuch der Desinfektion und Sterilisation, Band II Grundlagen der Sterilisation von Horn, Privora, Weuffen*. 1973: Verlag Volk und Gesundheit Berlin. 104-119.
25. Marshburn, P.B., et al.: *Gas and steam sterilization of assembled versus disassembled laparoscopic equipment. Microbiologic studies*. *J Reprod Med*, 1991. 36(7): p. 483-7.
26. Nagpal, A.K., Shrinivas, A. K.: *Principles of steam sterilization*. *Health Popul Perspect Issues*, 1978. 1(1): p. 40-50.

27. Spicher, G., Peters J., Borchers U.: *Microbiological efficacy of superheated steam. I. Communication: results with spores of Bacillus subtilis and Bacillus stearothermophilus and with spore earth.* Zentralbl Hyg Umweltmed, 1999. 201(6): p. 541-53.
28. Schmidt, J., Naumann, G., Horsch, W.: *Sterilisation, Desinfektion und Entwesung.* 1968: Thieme Verlag Leipzig.
29. Steam Quality, *Dampfqualitätsprüfung - Hinweise und Tipps*, 2008,  
URL: [http://www.ksapharma.com/German/Steamhinttip\\_GERMAN.html](http://www.ksapharma.com/German/Steamhinttip_GERMAN.html)
30. GZM - Gesellschaft für Zentralsterilisation von Medizinprodukten,  
*Dampfsterilisation - Verfahren und Qualitätssicherungen.* 2005,  
URL:<http://www.gzm.de>.
31. Fleischhack, R., Kober, P., Kühne, Th., Scheel, K.: *Überhitzung durch hygroskopische Kondensation bei der Dampf-Sterilisation poröser Güter – ein vergessenes Phänomen von sehr praktischer Bedeutung.* Zentralsterilisation 4, 2004.
32. CEN: *Biologische Systeme für die Prüfung von Sterilisatoren und Sterilisationsverfahren - Teil 1: Allgemeine Anforderungen.* 1997, Europäisches Komitee für Normung.
33. Wikipedia Foundation Inc. (2008): *Dipicolinsäure*,  
URL: <http://de.wikipedia.org/wiki/Dipicolins%C3%A4ure>.
34. SPECTARIS - Deutscher Industrieverband für Deutscher Industrieverband für optische, medizinische und mechatronische Technologien e. V.,  
*Qualitätssicherung bei der Aufbereitung von Medizinprodukten - Leitfaden für die Prozessvalidierung, Schwerpunkt Dampfsterilisation*, März 2005,  
URL:[www.mmmgroup.de/files/Prospekte/Spectaris\\_Dampf.pdf](http://www.mmmgroup.de/files/Prospekte/Spectaris_Dampf.pdf).

35. Schweizerisches Heilmittelinstitut - Swissmedic, *Wegleitung für die Validierung und die Routineüberwachung von Sterilisationsprozessen mit feuchter Hitze in der Gesundheitsfürsorge*. 2003, URL: [www.swissmedic.ch/md.asp](http://www.swissmedic.ch/md.asp).
36. Bundesgesetzbuch: *Medizinproduktegesetz*, 1994.
37. Bundesgesundheitsministerium: *Medizin-Produkte-Betreiberverordnung (MPBetreibV)*. 2002.
38. DGKH, DGSV, AKI: *Leitlinie von DGKH, DGSV und AKI für die Validierung und Routineüberwachung maschineller Reinigungs- und Desinfektionsprozesse für thermostabile Medizinprodukte und zu Grundsätzen der Geräteauswahl*, 2005, URL: [http://a-k-i.org/pdf/val\\_I05.pdf](http://a-k-i.org/pdf/val_I05.pdf).
39. SPECTARIS - Deutscher Industrieverband für Deutscher Industrieverband für optische, medizinische und mechatronische Technologien e. V, *Leitfaden für die Prozessvalidierung für Reinigungs- und Desinfektionsgeräte (RDG)*. 2003, URL: [www.aseptica.com/pdf/Spectaris\\_RDG.pdf](http://www.aseptica.com/pdf/Spectaris_RDG.pdf).
40. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz: *Anforderungen an die Hygiene bei der Aufbereitung von Medizinprodukten*, 2001, Verlag: Springer, URL: [www.excc.net/pdf/2001\\_11\\_rki\\_hygiene\\_aufbereitung.pdf](http://www.excc.net/pdf/2001_11_rki_hygiene_aufbereitung.pdf).
41. Spicher, G., Peters, J., Borchers, U.: *Suitability of Bacillus subtilis and Bacillus stearothermophilus spores as test organism bioindicators for detecting superheating of steam*. Zentralbl Hyg Umweltmed, 1997. 199(5): p. 462-74.
42. Leusden, F.P., Erichsen, H., *Medical Microbiology and Immunology*. Sporentwicklungshemmung durch Alkohol, Volume 122, Number 1 / August 1939, 2005: Springer Berlin / Heidelberg.
43. DIN - Deutsches Institut für Normung e.V.: *prEN 285:2002 - Sterilisation - Dampf-Sterilisatoren - Groß-Sterilisatoren*. 2002.

44. DIN - Deutsches Institut für Normung e.V.: *Anhang A (normativ) - Mikrobiologische Prüfung auf Wirksamkeit DIN 58946-6:2002-04*. 2003. p. 29-31.
45. Scholl, L.: *Thermoelektrische Prüfungen, Prüfbericht 31.1.-03.02.2006*. Dampfsterilisator 12 (MMM Euroselectomat 9618 2G-V1) im Universitätsklinikum Gießen, ZSV 2, 2006, Dipl. Ing. Lothar Scholl, Siegen
46. Wikipedia Foundation Inc.: *Geobacillus Stearothermophilus*, 2008, URL:[http://de.wikipedia.org/wiki/Bacillus\\_stearothermophilus](http://de.wikipedia.org/wiki/Bacillus_stearothermophilus).
47. The Lab Rat: *Geobacillus Stearothermophilus, 2007*: URL: <http://www.thelabrat.com/restriction/sources/Bacillusstearothermophilus.shtml>
48. Kayser, O., Müller, R.H.: *Pharmaceutical Biotechnology: Drug Discovery and Clinical Applications*. 2004, Verlag: Wiley-VCH.
49. Merck: *Malachitgrün-Oxalat (C.I. 42000) für die Mikroskopie*, 2004, URL:<http://www.merck.de/servlet/PB/show/1235090/115942de.pdf>.
50. Finley, N. and Fields, M.L., *Heat activation and heat-induced dormancy of Bacillus stearothermophilus spores*. Appl Microbiol, 1962. 10: p. 231-6.
51. Firma MM München, *Bedienungsanleitung Dampfsterilisator SELECTOMAT S 3000*.
52. gke-GmbH: *Erfahrungsaustausch der Validierer von Sterilisationsprozessen im Gesundheitsdienst - Collegium Glashütten am 11.09.2006*, S.11, URL: [http://www.gke-mbh.de/gke/de/validierung/protokoll\\_erfahrungsaustausch.pdf](http://www.gke-mbh.de/gke/de/validierung/protokoll_erfahrungsaustausch.pdf)

## 6. Anhang

### 6.1 Abbildungsverzeichnis

- Abb.1.1: Schematische Darstellung von Einflussfaktoren bei der Prävention postoperativer Wundinfektionen (S. 3)  
(Eikmann, T., Christiansen, B., Exner, M., Herr, C., Kramer, A., *Hygiene in Krankenhaus und Praxis*. Vol. 2. Erg.-Lfg. 2006. Kap. 4.11.2, S.3)
- Abb.1.2: Übersicht der Gesetze und Verordnungen für die Sterilgutaufbereitung (S.10) (eigene Darstellung)
- Abb.1.3: Beispielhafte Darstellung der wichtigen Einflussgrößen auf die Sterilisation (S. 12) (eigene Darstellung)
- Abb.1.4: Auszug aus Seite 2 des Prüfberichtes, Dipl.-Ing. Lothar Scholl (S. 16)  
(Thermoelektrische Prüfungen, Dampfsterilisator 12 im Universitätsklinikum Gießen ZSV 2, Prüfbericht 31.1.-03.02.2006)
- Abb. 2.1: auf einer Blutplatte gewachsene Kolonien von *G. stearothermophilus* (S. 18) (eigenes Foto)
- Abb.2.2: Arbeitsschritte der Herstellung der Sporen-Suspension (links), Sporen-Ethanol-Suspension (rechts) (S.20)
- Abb.2.3: Vorgang der Herstellung einer Verdünnungsreihe (S. 21)  
(eigene Darstellung)
- Abb.2.4: Schematische Darstellung der Herstellung einer Verdünnungsreihe (doppelte Ausführung) (S. 22) (eigene Darstellung)
- Abb. 2.5: Endoprothesen-Set in Sieb, Probepfannen (rote Pfeile) und Einschläger (gelber Pfeil) (S. 24) (eigene Darstellung)
- Abb.2.6: beimpfter Einschläger (S. 24) (eigene Darstellung)
- Abb.2.7: T-Griff Spannbohrfutter, mit beimpftem Tupfer (S. 25) (eigene Darstellung)
- Abb.2.8: Schraubendreher-Set im Sieb (S.25) (eigene Darstellung)
- Abb.2.9: laparoskopische Fasszange (S. 26) (eigene Darstellung)
- Abb.2.10: beimpfte Seele der lap. Fasszange (S. 26) (eigene Darstellung)
- Abb.2.11: Gasschlauch (S. 26) (eigene Darstellung)
- Abb.2.12: Metall-Einsatz am Gasschlauch (S.26) (eigene Darstellung)
- Abb.2.13: sterile Vlies-Streifen (S.27) (eigene Darstellung)
- Abb.2.14: beimpfter Schraubendreher (S.27) (eigene Darstellung)

- Abb.2.15: Endoprothese mit 10µl Sporensuspension während des Antrocknens unter Abluft (S.27) (eigenes Foto)
- Abb.2.16: unter Abluft angetrocknete Sporensuspension auf der Seele der laparoskopischen Fasszange (S.27) (eigene Darstellung)
- Abb.2.17: Vlies-Streifen in Nährmedium (CaSo-Bouillon) vor Inkubation (S. 29) (eigenes Foto)
- Abb.2.18: Druck-Kurve des Sterilisierprogramms P4 nach dem Sterilisierverfahren SECURIA für Wäsche und Instrumente bei 134° C Sterilisiertemperatur mit intensivierter Trocknung, Phasen Fraktionieren (blau), Sterilisieren (rot), Trocknen (grün), (S. 32) (bearbeitete Darstellung aus dem Handbuch für Dampfsterilisator SELECTOMAT S 3000, M&M, Seite 27 unten)
- Abb.2.19: ergänzter Ausdruck der Druck (blau) – Temperatur (rot) – Kurve des Vollzyklusses eines Versuchstages (S. 32) (Dampfsterilisator SELECTOMAT S 3000, ZSVA Gießen)
- Abb.2.20: ergänzter Ausdruck der Druck (blau) – Temperatur (rot) – Kurve des Halbzyklusses eines Versuchstages (S. 33) (Dampfsterilisator SELECTOMAT S 3000, ZSVA Gießen)
- Abb.2.21: Flussdiagramm: Durchführung eines Versuch-Durchlaufs (S. 35) (eigene Darstellung)
- Abb.3.1: Malachitgrün-Oxalat-Färbung der Sporensuspension (S. 37) (Aufnahme der selbst hergestellten Sporensuspension durch Prof. Dr. Eugen Domann, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Gießen)
- Abb.3.2: : logarithmische Darstellung der arithmetischen Mittelwerte der Kolonienzahlen der verschiedenen Verdünnungsreihen, die Verdünnungen  $10^{-1}$  und  $10^{-2}$  wurden nicht ausplattiert (S. 40) (eigene Darstellung)
- Abb.3.3: Verlauf der Ergebnisse der Versuchsreihen in den Verdünnungen  $10^{-5}$  (blau) und  $10^{-6}$  (rot) über den Versuchszeitraum (S. 41) (eigene Darstellung)

## 6.2 Tabellenverzeichnis

- Tab.1.1: Beispiele für Gesamtzahlen (alle Risikogruppen) von Wundinfektionen bei 4 ausgewählten Operationsarten (S. 4)  
(NRZ - Nationales Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen, *KISS Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System in Modul OP-KISS 2002-2006, 2007*,. p. 3,4,20,21)
- Tab.1.2: gestufter Wirkungsbereich entsprechend der Thermoresistenz der Mikroorganismen (S. 9)  
(Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene des Universitätsklinikums Rostock)
- Tab.1.3: Auswahl an relevanten DIN-Normen für die Aufbereitung von Medizinprodukten (S. 11) (eigene Darstellung)
- Tab.3.1: Ergebnisse der Auszählungen der auf Blutplatten gewachsenen Kolonien der jeweiligen Verdünnungsreihen im Zeitraum vom 23.04 – 19.06.2007 (S. 39) (eigene Darstellung)
- Tab.3.2: Kolonienanzahl auf Blutplatten nach Ausplattieren von 100 µl Sporensuspension in verschiedenen Verdünnungsstufen im Vergleich mit vorheriger Hitzeaktivierung (20 Min., 95°C) und Ultraschallbehandlung (10min, 35kHz) (S. 42) (eigene Darstellung)
- Tab.3.3: Ergebnisse der Testungen im Vollzyklus für den Prüfkörper Griff von Einschläger (S. 44) (eigene Darstellung)
- Tab.3.4: Ergebnisse der Testungen im Vollzyklus für den Prüfkörper Gasschlauch (S. 45) (eigene Darstellung)
- Tab.3.5: Ergebnisse der Testungen im Vollzyklus für den Prüfkörper Probepfanne (S. 45) (eigene Darstellung)
- Tab.3.6: Ergebnisse der Testungen im Vollzyklus für den Prüfkörper lap. Fassung (S. 46) (eigene Darstellung)
- Tab.3.7: Ergebnisse der Testungen im Vollzyklus für den Prüfkörper Schraubendreher (kanüliert) (S. 46) (eigene Darstellung)
- Tab.3.8: Ergebnisse der Testungen im Vollzyklus für den Prüfkörper T-Griff Spannbohrfutter (S. 47) (eigene Darstellung)
- Tab.3.9: Ergebnisse der Testungen im Halbzyklus für den Prüfkörper Gasschlauch (S. 48) (eigene Darstellung)
- Tab.3.10: Ergebnisse der Testungen im Halbzyklus für den Prüfkörper laparoskopische Fassung (S. 49) (eigene Darstellung)

Tab.3.11: Übersicht über Versuchsanzahl und Gesamtzahl der getesteten Instrumente für Halb- und Vollzyklus insgesamt (S. 50) (eigene Darstellung)

Tab.3.12: Übersicht über Anzahl und Ergebnisse der Keimrückgewinnungskontrollen der Testungen im Halb- und Vollzyklus (S. 51) (eigene Darstellung)

### 6.3 Abkürzungsverzeichnis

γ	Gamma-Strahlen
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
Art.-Nr.	Artikel-Nummer
ATCC	American type culture collection
B.	Bacillus
bar, mbar	SI-Einheit für Druck (1 bar = 10 <sup>5</sup> Pascal = 10 <sup>5</sup> Newton/m <sup>2</sup> ), Millibar
BSE	Bovine spongiforme Enzephalopathie
°C	Grad Celsius
CaSo	Casein-Pepton, Sojapepton
CEN	Comité Européen de Normalisation
CJK	Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
D-Wert	Dezimalreduktionswert, Destruktionswert, decimal reduction time
DIN	Deutsches Institut für Normung e.V.
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
EN	Europäische Norm
Fa.	Firma
G.	Geobacillus
g	Gramm
h	Stunde
HAV	Hepatitis-A-Virus
HBV	Hepatitis-B-Virus
ISO	International Organization for Standardization
kcal	Kilocalorie (Einheit für Energie, 1 kcal = 4184 Joule)
kg	Kilogramm
kHz	Kilohertz
KISS	Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System
log	Logarithmus
mg	Milligramm
mm	Millimeter
MnSO <sub>4</sub>	Mangan(II)-Sulfat
MPBetreiberV	Medizinproduktebetreiber-verordnung
MPG	Medizinproduktegesetz
NaCl	Natriumchlorid, Kochsalz
NCTC	National collection of type cultures
NKG	nicht kondensierbare Gase
NRZ	Nationales Referenzzentrum f. Surveillance von nosokomialen Infektionen
ppm	parts per million („Teile von einer Million“, steht für die Zahl 10 <sup>-6</sup> )
prEN	veröffentlichter europäischer Normenentwurf
RCF	relative centrifugal force
RKI	Robert-Koch-Institut
RPM	revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute
SAL	Sterility Assurance Level
UV	Ultraviolett (Strahlung)
vCJK	Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
ZSVA	Zentrale Sterilgutversorgungsabteilung
z-Wert	Temp.erhöhung (z) wird benötigt um den D-Wert um eine Zehnerpotenz zu reduzieren

## 6.4 Materialliste

- G. stearothermophilus-Stamm, *NCTC 10003, ATCC 7953, DSM 22*
- sterile, physiologische NaCl-Lösung
- Ethanol 70%
- Lysozym (from egg white) (Fa. Merck)
- Malachitgrün-oxalat für die Mikroskopie und Mikrobiologie  
(Art.Nr. 1.01398, Colour Index No.: 42000, Basic green 4, Fa. Merck)
- Gram-Färbung (Kristallviolettlösung, Lugols Lösung stabilisiert, Entfärbelösung, Safraninlösung, Fa. Merck)
- Spore agar  
(1,5% Nähragar 70148, 0,05% Glukose, 30 ppm  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , Fa. Fluka)
- CaSo-Bouillon (Casein-Pepton, Sojapepton, Universalmedium, Fa. Merck)
- Blutplatten (Nährsubstrat 20,0%, NaCl 5%, Agar-Agar 15%, Blut 50-80ml/Liter)
- Einmal-Injektions-Kanülen  
(Sterican, Gr.1, 0,90 x 40 mm + Gr.18, 0,45 x 25 mm, Fa. Braun)
- Vlieskompressen (steril, 30 g, 5x5 cm, REF 31089, Fa. Fuhrmann)
- Eppendorf-Pipetten (10  $\mu\text{l}$ - 1000  $\mu\text{l}$ ) (Fa. Eppendorf)
- 1,5 ml Reaktionsgefäße (Fa. Eppendorf)
- Zentrifuge (Rotanta/S, Fa. Hettich)
- Brutschrank (Typ BK 3108, Fa. Ehret, Emmendingen)
- Dampfsterilisator (SELECTOMAT, S 3000, Fa. MM, München)
- Objektträger (76 x 26 mm, geschnitten, Menzel-Gläser)
- Mikroskop (Olympus BH-2)
- Ultraschallbad  
(Sonorex RK 255 Transistor, 35 kHz Betriebsfrequenz, Fa. Bandelin)
- Wasserbad (Fa. Memmert)
- Pinzetten
- Gasbrenner

## 8. Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die ich sinngemäß aus veröffentlichten oder unveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

## 9. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Thomas Eikmann für die Überlassung des Dissertationsthemas.

Für die wertvollen Anregungen und die Unterstützung bei der Bearbeitung des Themas gilt mein besonderer Dank Herrn Dr. Andreas Knaust.

Für die freundliche Mithilfe bei der Durchführung der Versuche danke ich Herrn Rolf Vogl (Technischer Sterilisationsassistent und Qualitätsbeauftragter der ZSVA des Universitätsklinikums Giessen) ebenso wie Herrn Klaus Grün (Technischer Sterilisationsassistent und Pflegegruppenleitung ZSVA 1 und 2),

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeiter/innen des Instituts für Hygiene und Umweltmedizin Giessen, die mir bei der Laborarbeit hilfreich zur Seite standen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Eugen Domann vom Institut für Medizinische Mikrobiologie in Gießen für das Fotografieren der *G. stearothermophilus*-Sporen und Herrn Wolfgang Papst vom Institut für medizinische Informatik in Gießen für die Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Meinen Eltern danke ich sehr herzlich für die Unterstützung.