

Matrixfreie Kontamination von Medizinprodukten zur Prüfung ihrer Aufbereitbarkeit



Bodenlehenstraße 15
5500 Bischofshofen
office@whu-lab.at
www.whu-lab.at

SORGER ARNO
SORGER THEODOR
GHIMPAU ADINA

Prüfung der Aufbereitbarkeit

- ÖNORM EN ISO 17664-x: Aufbereitung von Produkten für die Gesundheitsfürsorge - Vom Medizinprodukt-Hersteller bereitzustellende Informationen für die Aufbereitung von Medizinprodukten
 - Teil 1: Kritische und semi-kritische Medizinprodukte
 - Teil 2: Unkritische Medizinprodukte
 - Teil 3: Leitfaden für die Einstufung eines wiederverwendbaren Medizinprodukts in eine quantitative Reinigungsklasse
- ISO 17664-1
 - 4.1 Der Hersteller des Medizinprodukts muss jeden Prozess validieren, der in den dem Medizinprodukt beiliegenden Informationen aufgeführt ist. Die Validierung muss nachweisen, dass jeder Prozess für die Aufbereitung des Medizinprodukts geeignet ist.
 - 4.2 Der Hersteller des Medizinprodukts muss über objektive Nachweise verfügen, dass die Validierung der Aufbereitungsverfahren durchgeführt wurde, um zu bestätigen, dass das jeweilige Medizinprodukt bei vorschriftsmäßiger Aufbereitung sauber, desinfiziert, sterilisiert oder alle drei Eigenschaften aufweist.

Prüfverfahren

objektive Nachweise und Validierung

- Um einen Prozess als „validiert“ zu erhalten, muss
 - objektiv nachgewiesen werden, dass die Anforderung erfüllt wird
 - eine Fixierung der Bedingungen für die Aufbereitung / den Aufbereitungsschritt erfolgt sein
 - ein Verfahren zum Nachweis der Erfüllung der festgelegten Parameter vorhanden sein
- Objektive Nachweise
 - (Chemische) Reinigung: „sauber“
 - Verfahren zur Prüfung der Reinigung: Entfernung einer relevanten Prüfanschmutzung
 - Mikrobiologische Reduktion: Sterilisation, Desinfektion
 - Verfahren zur Prüfung der Inaktivierung

Prüfverfahren

Verfahren zur Prüfung der Inaktivierung

- Kontamination des Medizinproduktes mit relevanten Mikroorganismen
- Durchführung des Aufbereitungsschrittes
- Prüfung der Restkontamination

- Fragen:
 - Was sind die relevante Mikroorganismen
 - In welcher Matrix werden die Mikroorganismen aufgebracht
 - Wie werden die Mikroorganismen wieder zurückgewonnen / reaktiviert

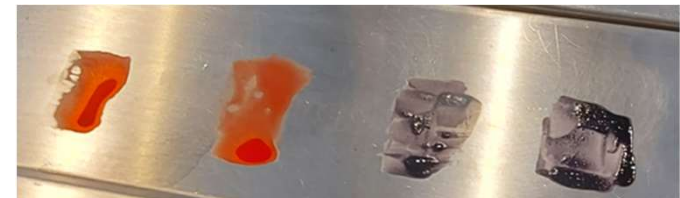
Prüfverfahren

Prüfung einer Sterilisationswirkung

- Je nach Sterilisationsverfahren, kann dieses parametrisch auf die Einhaltung der Sterilisationsbedingungen, unter denen die Sterilisation gesichert abläuft, geprüft werden.
- Die Prüfung der Sterilisierbarkeit kann NICHT parametrisch belegt werden. Hierfür sind mikrobiologische Prüfungen erforderlich
- Fragen / Probleme
 - Welches sind die relevanten Mikroorganismen
 - Auf dem Medizinprodukt zu erwartende Mikroorganismen
 - Resistentester Mikroorganismus
 - Wie stelle ich die zu erzielende Inaktivierung sicher dar.
 - Vollzyklus / Halbzyklus
 - SAL

Prüfung der mikrobiologischen Inaktivierung

- Eine Desinfektion erfolgt üblicherweise an einem zuvor gereinigten Medizinprodukt.
- Eine Sterilisation erfolgt üblicherweise an einem zuvor gereinigten und desinfizierten Medizinprodukt
- Ist bei der Prüfung eine Matrix zu berücksichtigen?
 - Blut
 - Fett
 - Andere Körpersekrete (Speichel, Genitalsekrete, Urin, Faeces)
 - Spülflüssigkeiten etc.
 - Benötigen die Mikroorganismen eine Matrix?



Prüfung der mikrobiologischen Inaktivierung - Sterilisation

- Sterilisationsverfahren werden meist mit Sporen geprüft
- Sporen gelten als die resistenste Mikroorganismengruppe
- Medizinprodukte zur Sterilisation sind üblicherweise „rein“
 - Sporen lassen sich leicht „matrixfrei“ aufbringen
 - Aufbewahrung der Sporensuspension in Ethanol
 - Ethanol verdunstet nach dem Aufbringen rückstandsfrei
- Weiterer Vorteil der ethanolschen Lösung: einfaches gleichmäßiges Aufbringen auf hydrophile und hydrophobe Oberflächen

Warum nur Sporen

- Vegetative Mikroorganismen werden ab 90°C (ausgenommen Archaeobacteria) vollständig inaktiviert.
- Bei Niedertemperaturverfahren gibt es aber keine Begründung, warum Sporen „sicher“ resistenter sind.
- Auch vegetative Mikroorganismen haben Schutzfunktionen gegenüber chemischen Einflüssen.
- Zu Berücksichtigen ist die Gefahr einer „scheinbaren Inaktivierung“
 - (vorübergehender) VBNC-Zustand vegetativer Mikroorganismen
 - (unbekannter) Germinationsreiz zur Sporenauskeimung

Kontamination mit vegetativen Mikroorganismen

- Typische Kontaminationsflüssigkeiten vegetativer Mikroorganismen
 - Mit organischer Matrix - die organische Matrix stabilisiert die Mikroorganismen
 - Blut: Starke interagierende organische Matrix
 - BSA 3g/l: starke organische Matrix
 - Trypton 1g/l / phys. NaCl: mittlere organische Matrix
 - BSA 0,3 g/l: geringe organische Matrix
 - Mit anorganischer Matrix – die anorganische Matrix verhindert Zellzerstörung aufgrund des osmotische Druckes
 - PBS (Phosphatgepufferte phys. NaCl): Phosphat wirkt stabilisierend
 - Phys. NaCl: Beim Antrocknen kann der hohe osmotisch Druck stören

Matrixfreie Kontamination?

- Anzucht der Mikroorganismen auf geeignetem Nährmedium
 - Erzeugen eines Pellets nach Anzucht auf Nährmedien
 - Spülen mit PBS
 - Aufnahme mit RO-Wasser
-
- Das Verfahren funktioniert, aber
 - Die Mikroorganismen sind extrem instabil
 - Wasser trocknet nur langsam auf
 - RO-Wasser verteilt sich nur auf hydrophilen Oberflächen gleichmäßig
 - Die Mikroorganismen neigen zur Agglomeratbildung





Matrixfreie Kontamination

- Wie kann eine hydrophobe Oberfläche GLEICHMÄSSIG mit Mikroorganismen kontaminiert werden?
 - Medizinprodukte für Niedertemperaturverfahren weisen sehr viele hydrophobe Kunststoffoberflächen auf.
 - Niedertemperaturverfahren sind in ihrer „Durchdringung“ begrenzt. Agglomerate von Mikroorganismen können die Wirksamkeit stark reduzieren (diese sollten aber auch üblicherweise nicht vorkommen)
 - Zum Nachweis einer ausreichenden Wirksamkeit („SAL“) muss das Medizinprodukt mit einer deutlich höheren mikrobiologischen Belastung kontaminiert werden, als in der Realität auftritt.
- Wir müssen vegetative Mikroorganismen gleichmäßig und vital in hoher Konzentration auf hydrophoben Oberflächen aufbringen

Matrixfreie Kontamination hydrophober Oberflächen

- RO-Wasser bildet schlecht verdunstende Tropfen mit Agglomeratbildung
- Ein Detergenzzusatz (z.B. Protein) bedeutet „Matrix“
- Ethanol ist für vegetative Mikroorganismen nicht geeignet

- Wir suchen ein hydrophobes Lösungsmittel, das vollständig verdunstet, KEINE mikrobiozide Wirkung aufweist und die Zellstruktur nicht schädigt

- „Uraltes Medizinprodukt“ – früher verbreitet eingesetzt - jetzt etwas „aus der Mode“ (weil es „keine Wirkung“ hat):
- Wundbenzin (als Reinstoff: **HEXAN**)

Hexan als Trägerflüssigkeit für Mikroorganismen

- Das Verfahren ist geprüft für
 - *S. aureus*
 - *C. albicans*
- Diese Mikroorganismen sind Katalasebildner.
 - Das Enzym Katalase baut Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff ab und verhindert so eine mikrobizide Wirkung
- Desinfektionsverfahren und Sterilisationsverfahren auf Basis von Wasserstoffperoxid können durch die Bildung von Katalase gestört werden

Präparation der Hexanlösung

- Mikroorganismen auf Nährmedium anzüchten
- Abspateln mit Verdünnungsflüssigkeit (Trypton-NaCl)
- Abzentrifugieren
- Waschen mit RO-Wasser
- Abzentrifugieren
- Aufnahme mit Hexan

Kontamination mit Hexanlösung - Oberflächen

- Folgende Oberflächen wurden auf gleichmäßige Kontamination geprüft:

Kürzel	Bezeichnung	Beispiel
V4A	Edelstahl	Medizinprodukte
PU	Polyurethan	Oberflächen/Gehäuse von Medizinprodukten
PTFE	Teflon	Schläuche
PVC	Polyvinylchlorid	Schläuche, Dichtungen, Oberflächen
PP	Polypropylen	Oberflächen/Gehäuse von Medizinprodukten, Becher
PC	Polycarbonat	Oberflächen/Gehäuse von Medizinprodukten, DaVinci-Instrumente
PS	Polystyrol	Durchsichtige Teile auf/in Medizinprodukten
PMMA	Polymethylmethacrylat	Durchsichtige Teile auf/in Medizinprodukten

Beispiel für eine Kontamination

Verd. 10 ⁻ⁿ	S. aureus Variante 1	S. aureus Variante 2	S. aureus Variante 3	C. albicans Variante 1	C. albicans Variante 2	C. albicans Variante 3
-3	n	n	n	n	n	n
-4	n	n	n	108	184	118
-5	95	316	120	17	25	93
-6	9	42	11	1	0	1
	7,67 log KBE/PK	8,32og KBE/PK	7,77 log KBE/PK	6,92 log KBE/PK	7,09 log KBE /PK	7,06 log KBE /PK

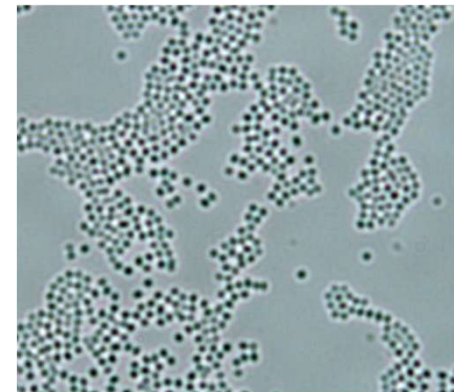
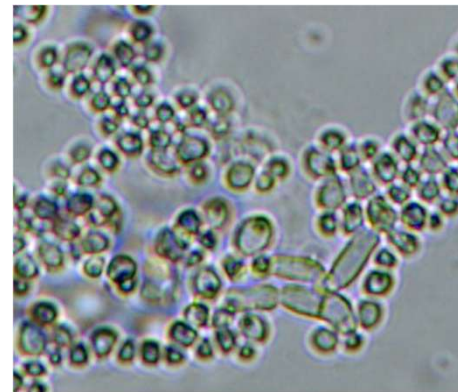
Rückgewinnung:

Variante 1: Prüfkörper ab gespült mit 5 ml CSL

Variante 2: Prüfkörper mit 5 ml CSL geschüttelt

Variante 3: Prüfkörper mit feuchtem Tupfer 2x abgestrichen, Tupfer eluiert in 5 ml CSL

Beispiel für eine Kontamination



Vergleich mit anderen Alkanen und Varianten

- Pentan:
 - Muss zuvor tiefgekühlt werden
 - Verdampft sehr schnell
 - Ausgasung beim Zentrifugieren zu stark
- Heptan
 - Die erzielbare Konzentration an Mikroorganismen ist deutlich geringer (ca. 2 Zehnerpotenzen)
- Mischung mit RO-Wasser
 - Bildung einer Emulsion
 - Hexan verdunstet zuerst, danach „hydrophil“

Conclusio

- Mit dem Wissen, dass *G. stearothermophilus* auf Wasserstoffperoxid in Desinfektionsprüfungen sensibel reagiert, ist die Verwendung als alleiniger Prüforganismus in Wasserstoffperoxid-Sterilisationsverfahren zu hinterfragen
- Mit dem Wissen, dass katalasebildende Mikroorganismen in der Regel begrenzend für die Wirksamkeit von wasserstoffperoxidbasierenden Desinfektionsverfahren sind, ist zu hinterfragen, wieso diese nicht als Prüforganismen eingesetzt werden
- Mit der beschriebenen Methode zur gleichmäßigen matrixfreien Aufbringung vegetativer Mikroorganismen auf hydrophobe Oberflächen steht einem Einsatz dieser Prüfstämme um Nachweis der Wirksamkeit wasserstoffperoxidbasierter Sterilisations- und Desinfektionsverfahren nichts entgegen.

**Danke an alle meine Mitarbeiter,
die an der Erarbeitung der Methode
mitgewirkt haben**



Arno Sorger, W.H.U. GmbH, Bodenlehenstraße 15, 5500 Bischofshofen
sorger@whu-lab.at office@whu-lab.at



Matrixfreie Kontamination von Medizinprodukten zur Prüfung ihrer Aufbereitbarkeit



Bodenlehenstraße 15
5500 Bischofshofen
office@whu-lab.at
www.whu-lab.at

SORGER ARNO
SORGER THEODOR
GHIMPAU ADINA

Prüfung der Aufbereitbarkeit

- ÖNORM EN ISO 17664-x: Aufbereitung von Produkten für die Gesundheitsfürsorge - Vom Medizinprodukt-Hersteller bereitzustellende Informationen für die Aufbereitung von Medizinprodukten
 - Teil 1: Kritische und semi-kritische Medizinprodukte
 - Teil 2: Unkritische Medizinprodukte
 - Teil 3: Leitfaden für die Einstufung eines wiederverwendbaren Medizinprodukts in eine quantitative Reinigungsklasse
- ISO 17664-1
 - 4.1 Der Hersteller des Medizinprodukts muss jeden Prozess validieren, der in den dem Medizinprodukt beiliegenden Informationen aufgeführt ist. Die Validierung muss nachweisen, dass jeder Prozess für die Aufbereitung des Medizinprodukts geeignet ist.
 - 4.2 Der Hersteller des Medizinprodukts muss über objektive Nachweise verfügen, dass die Validierung der Aufbereitungsverfahren durchgeführt wurde, um zu bestätigen, dass das jeweilige Medizinprodukt bei vorschriftsmäßiger Aufbereitung sauber, desinfiziert, sterilisiert oder alle drei Eigenschaften aufweist.

Prüfverfahren

objektive Nachweise und Validierung

- Um einen Prozess als „validiert“ zu erhalten, muss
 - objektiv nachgewiesen werden, dass die Anforderung erfüllt wird
 - eine Fixierung der Bedingungen für die Aufbereitung / den Aufbereitungsschritt erfolgt sein
 - ein Verfahren zum Nachweis der Erfüllung der festgelegten Parameter vorhanden sein
- Objektive Nachweise
 - (Chemische) Reinigung: „sauber“
 - Verfahren zur Prüfung der Reinigung: Entfernung einer relevanten Prüfanschmutzung
 - Mikrobiologische Reduktion: Sterilisation, Desinfektion
 - Verfahren zur Prüfung der Inaktivierung

Prüfverfahren

Verfahren zur Prüfung der Inaktivierung

- Kontamination des Medizinproduktes mit relevanten Mikroorganismen
- Durchführung des Aufbereitungsschrittes
- Prüfung der Restkontamination

- Fragen:
 - Was sind die relevante Mikroorganismen
 - In welcher Matrix werden die Mikroorganismen aufgebracht
 - Wie werden die Mikroorganismen wieder zurückgewonnen / reaktiviert

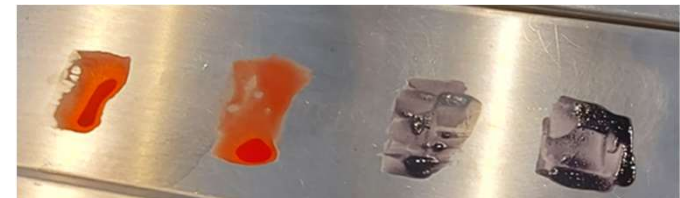
Prüfverfahren

Prüfung einer Sterilisationswirkung

- Je nach Sterilisationsverfahren, kann dieses parametrisch auf die Einhaltung der Sterilisationsbedingungen, unter denen die Sterilisation gesichert abläuft, geprüft werden.
- Die Prüfung der Sterilisierbarkeit kann NICHT parametrisch belegt werden. Hierfür sind mikrobiologische Prüfungen erforderlich
- Fragen / Probleme
 - Welches sind die relevanten Mikroorganismen
 - Auf dem Medizinprodukt zu erwartende Mikroorganismen
 - Resistentester Mikroorganismus
 - Wie stelle ich die zu erzielende Inaktivierung sicher dar.
 - Vollzyklus / Halbzyklus
 - SAL

Prüfung der mikrobiologischen Inaktivierung

- Eine Desinfektion erfolgt üblicherweise an einem zuvor gereinigten Medizinprodukt.
- Eine Sterilisation erfolgt üblicherweise an einem zuvor gereinigten und desinfizierten Medizinprodukt
- Ist bei der Prüfung eine Matrix zu berücksichtigen?
 - Blut
 - Fett
 - Andere Körpersekrete (Speichel, Genitalsekrete, Urin, Faeces)
 - Spülflüssigkeiten etc.
 - Benötigen die Mikroorganismen eine Matrix?



Prüfung der mikrobiologischen Inaktivierung - Sterilisation

- Sterilisationsverfahren werden meist mit Sporen geprüft
- Sporen gelten als die resistensteste Mikroorganismengruppe
- Medizinprodukte zur Sterilisation sind üblicherweise „rein“
 - Sporen lassen sich leicht „matrixfrei“ aufbringen
 - Aufbewahrung der Sporensuspension in Ethanol
 - Ethanol verdunstet nach dem Aufbringen rückstandsfrei
- Weiterer Vorteil der ethanolschen Lösung: einfaches gleichmäßiges Aufbringen auf hydrophile und hydrophobe Oberflächen

Warum nur Sporen

- Vegetative Mikroorganismen werden ab 90°C (ausgenommen Archaeobacteria) vollständig inaktiviert.
- Bei Niedertemperaturverfahren gibt es aber keine Begründung, warum Sporen „sicher“ resistenter sind.
- Auch vegetative Mikroorganismen haben Schutzfunktionen gegenüber chemischen Einflüssen.
- Zu Berücksichtigen ist die Gefahr einer „scheinbaren Inaktivierung“
 - (vorübergehender) VBNC-Zustand vegetativer Mikroorganismen
 - (unbekannter) Germinationsreiz zur Sporenauskeimung

Kontamination mit vegetativen Mikroorganismen

- Typische Kontaminationsflüssigkeiten vegetativer Mikroorganismen
 - Mit organischer Matrix - die organische Matrix stabilisiert die Mikroorganismen
 - Blut: Starke interagierende organische Matrix
 - BSA 3g/l: starke organische Matrix
 - Trypton 1g/l / phys. NaCl: mittlere organische Matrix
 - BSA 0,3 g/l: geringe organische Matrix
 - Mit anorganischer Matrix – die anorganische Matrix verhindert Zellzerstörung aufgrund des osmotische Druckes
 - PBS (Phosphatgepufferte phys. NaCl): Phosphat wirkt stabilisierend
 - Phys. NaCl: Beim Antrocknen kann der hohe osmotisch Druck stören

Matrixfreie Kontamination?

- Anzucht der Mikroorganismen auf geeignetem Nährmedium
 - Erzeugen eines Pellets nach Anzucht auf Nährmedien
 - Spülen mit PBS
 - Aufnahme mit RO-Wasser
-
- Das Verfahren funktioniert, aber
 - Die Mikroorganismen sind extrem instabil
 - Wasser trocknet nur langsam auf
 - RO-Wasser verteilt sich nur auf hydrophilen Oberflächen gleichmäßig
 - Die Mikroorganismen neigen zur Agglomeratbildung





Matrixfreie Kontamination

- Wie kann eine hydrophobe Oberfläche GLEICHMÄSSIG mit Mikroorganismen kontaminiert werden?
 - Medizinprodukte für Niedertemperaturverfahren weisen sehr viele hydrophobe Kunststoffoberflächen auf.
 - Niedertemperaturverfahren sind in ihrer „Durchdringung“ begrenzt. Agglomerate von Mikroorganismen können die Wirksamkeit stark reduzieren (diese sollten aber auch üblicherweise nicht vorkommen)
 - Zum Nachweis einer ausreichenden Wirksamkeit („SAL“) muss das Medizinprodukt mit einer deutlich höheren mikrobiologischen Belastung kontaminiert werden, als in der Realität auftritt.
- Wir müssen vegetative Mikroorganismen gleichmäßig und vital in hoher Konzentration auf hydrophoben Oberflächen aufbringen

Matrixfreie Kontamination hydrophober Oberflächen

- RO-Wasser bildet schlecht verdunstende Tropfen mit Agglomeratbildung
- Ein Detergenzzusatz (z.B. Protein) bedeutet „Matrix“
- Ethanol ist für vegetative Mikroorganismen nicht geeignet

- Wir suchen ein hydrophobes Lösungsmittel, das vollständig verdunstet, KEINE mikrobiozide Wirkung aufweist und die Zellstruktur nicht schädigt

- „Uraltes Medizinprodukt“ – früher verbreitet eingesetzt - jetzt etwas „aus der Mode“ (weil es „keine Wirkung“ hat):
- Wundbenzin (als Reinstoff: **HEXAN**)

Hexan als Trägerflüssigkeit für Mikroorganismen

- Das Verfahren ist geprüft für
 - *S. aureus*
 - *C. albicans*
- Diese Mikroorganismen sind Katalasebildner.
 - Das Enzym Katalase baut Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff ab und verhindert so eine mikrobizide Wirkung
- Desinfektionsverfahren und Sterilisationsverfahren auf Basis von Wasserstoffperoxid können durch die Bildung von Katalase gestört werden

Präparation der Hexanlösung

- Mikroorganismen auf Nährmedium anzüchten
- Abspateln mit Verdünnungsflüssigkeit (Trypton-NaCl)
- Abzentrifugieren
- Waschen mit RO-Wasser
- Abzentrifugieren
- Aufnahme mit Hexan

Kontamination mit Hexanlösung - Oberflächen

- Folgende Oberflächen wurden auf gleichmäßige Kontamination geprüft:

Kürzel	Bezeichnung	Beispiel
V4A	Edelstahl	Medizinprodukte
PU	Polyurethan	Oberflächen/Gehäuse von Medizinprodukten
PTFE	Teflon	Schläuche
PVC	Polyvinylchlorid	Schläuche, Dichtungen, Oberflächen
PP	Polypropylen	Oberflächen/Gehäuse von Medizinprodukten, Becher
PC	Polycarbonat	Oberflächen/Gehäuse von Medizinprodukten, DaVinci-Instrumente
PS	Polystyrol	Durchsichtige Teile auf/in Medizinprodukten
PMMA	Polymethylmethacrylat	Durchsichtige Teile auf/in Medizinprodukten

Beispiel für eine Kontamination

Verd. 10 ⁻ⁿ	S. aureus Variante 1	S. aureus Variante 2	S. aureus Variante 3	C. albicans Variante 1	C. albicans Variante 2	C. albicans Variante 3
-3	n	n	n	n	n	n
-4	n	n	n	108	184	118
-5	95	316	120	17	25	93
-6	9	42	11	1	0	1
	7,67 log KBE/PK	8,32og KBE/PK	7,77 log KBE/PK	6,92 log KBE/PK	7,09 log KBE /PK	7,06 log KBE /PK

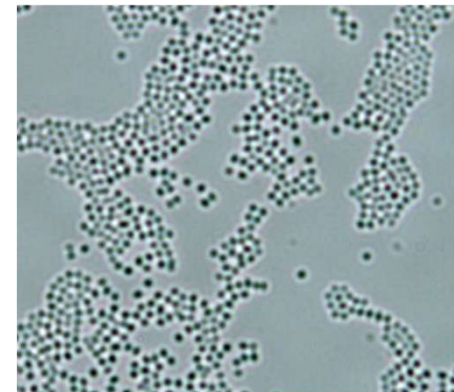
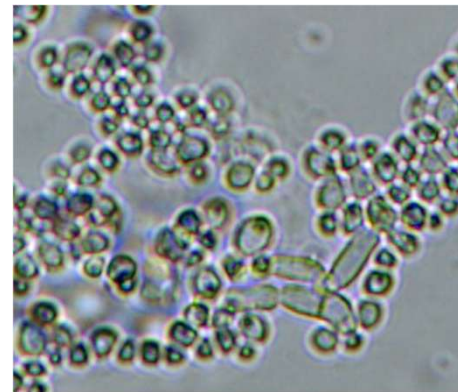
Rückgewinnung:

Variante 1: Prüfkörper ab gespült mit 5 ml CSL

Variante 2: Prüfkörper mit 5 ml CSL geschüttelt

Variante 3: Prüfkörper mit feuchtem Tupfer 2x abgestrichen, Tupfer eluiert in 5 ml CSL

Beispiel für eine Kontamination



Vergleich mit anderen Alkanen und Varianten

- Pentan:
 - Muss zuvor tiefgekühlt werden
 - Verdampft sehr schnell
 - Ausgasung beim Zentrifugieren zu stark
- Heptan
 - Die erzielbare Konzentration an Mikroorganismen ist deutlich geringer (ca. 2 Zehnerpotenzen)
- Mischung mit RO-Wasser
 - Bildung einer Emulsion
 - Hexan verdunstet zuerst, danach „hydrophil“

Conclusio

- Mit dem Wissen, dass *G. stearothermophilus* auf Wasserstoffperoxid in Desinfektionsprüfungen sensibel reagiert, ist die Verwendung als alleiniger Prüforganismus in Wasserstoffperoxid-Sterilisationsverfahren zu hinterfragen
- Mit dem Wissen, dass katalasebildende Mikroorganismen in der Regel begrenzend für die Wirksamkeit von wasserstoffperoxidbasierenden Desinfektionsverfahren sind, ist zu hinterfragen, wieso diese nicht als Prüforganismen eingesetzt werden
- Mit der beschriebenen Methode zur gleichmäßigen matrixfreien Aufbringung vegetativer Mikroorganismen auf hydrophobe Oberflächen steht einem Einsatz dieser Prüfstämme um Nachweis der Wirksamkeit wasserstoffperoxidbasierter Sterilisations- und Desinfektionsverfahren nichts entgegen.

**Danke an alle meine Mitarbeiter,
die an der Erarbeitung der Methode
mitgewirkt haben**



Arno Sorger, W.H.U. GmbH, Bodenlehenstraße 15, 5500 Bischofshofen
sorger@whu-lab.at office@whu-lab.at

