

	Technische Information	730-067-DE		V12
	Populationsbestimmung von Bioindikatoren	Erstellt	04.01.2006	JG
		Änderung	11.10.2021	HeK
		Prüfung	12.10.2021	UK
		Freigabe	12.10.2021	UK
Ablage-Nr.: 3.0				

Hintergrundinformation

Das Verfahren einer Populationswiederfindung unterscheidet sich bei verschiedenen Bioindikatortypen vor allem beim Aufschluss der Probe. Hier geht es vor allem darum die Probe so in Lösung zu bringen, dass alle Sporen des Bioindikators (BI) idealerweise vereinzelt und unbeschädigt nach dem Ablöseprozess vorliegen. Eine Schädigung von Sporen durch Ultraschall oder Mixer ist nicht bekannt. Danach sind verwendete Suspensionsmittel, die genaue Beachtung eines germinationsfördernden Hitzeschocks und frischer Nähragar von guter Qualität sehr wichtige Variablen einer guten Populationswiederfindung. Bei Durchführung der Verdünnungsreihen sollte auf Glasgefäße zurückgegriffen werden, da sich bei Verwendung von Plastikgefäßen durch die hohe Hydrophobizität des Plastiks, Sporen vermehrt an den Wandungen ablagern können.

Bei Verwendung von Suspensionen ist kein Aufschluss notwendig, aber beim Arbeiten damit kann jede Temperaturerhöhung auf Raumtemperatur mit einem Verlust von Population verbunden sein. Sobald die Suspension auf Trägern getrocknet vorliegt, besteht dieses Problem nicht mehr. Es wird daher grundsätzlich beim Arbeiten mit Suspensionen die Verwendung einer Kühlbox oder das Arbeiten auf Eis empfohlen, um die Populationsverluste möglichst gering zu halten.

Aufschluss der Probe abhängig vom Material:

Sporenträger aus Materialien, welche mit Hilfe eines Mixers oder Turrax zerkleinert werden können: z.B. Streifen, Fäden oder Disks aus Papier und Glasfaser (Tyvek, PET, anderes Material etc. je nach Leistung des Zerkleinerers)

Mindestens 4 unbehandelte **Träger (z.B. Sporenstreifen)** aseptisch aus dem Glassine-Umschlag entnehmen und mit 100 ml sterilem Wasser in einen sterilen Hochgeschwindigkeitsmixer geben und 3-5 min homogenisieren, bis keine größeren Partikel in der Suspension zu sehen sind. Bei der Nicht-Verwendung eines Mixers (z.B. Ersatz durch Gasperlen) ergeben sich erfahrungsgemäß geringere Populationen. Ein anschließender Einsatz eines Ultraschallbades kann sich sehr positiv auf die Wiederfindung auswirken, da so potentiell aggregierte Sporen vereinzelt werden.

Sporenträger aus Materialien, welche nicht mit Hilfe eines Mixers oder Turrax zerkleinert werden können (bzw. es steht kein Mixer zur Verfügung): z.B. Streifen oder Disks aus Edelstahl, feste Glasträger oder Plastikmaterialien (auch Tyvek kann sich schwierig im Aufschluss verhalten)

Mindestens 4 unbehandelte Träger (z.B. Sporenstreifen) für mindestens 10 min einweichen und wenn möglich mit einem sterilen Magnetrührer in der Flüssigkeit rühren. Danach 10 min im Ultraschallbad behandeln und anschließend gründlich mittels Vortex mischen oder ein weiteres Mal 10 min mit Magnetrührer behandeln.

Bei allen festen Trägern, wie z.B. Metallstreifen oder Disks (PET/Tyvek etc.), kann es bei zu geringer mechanischer Einwirkung während des Ablöseprozesses Probleme einer zu geringen Populationswiederfindung geben. Dies lässt sich sehr gut mit einer Zugabe von Detergenzien lösen, welche nicht das Wachstum beeinflussen.

	Technische Information	730-067-DE		V12
	Populationsbestimmung von Bioindikatoren	Erstellt	04.01.2006	JG
		Änderung	11.10.2021	HeK
		Prüfung	12.10.2021	UK
		Freigabe	12.10.2021	UK
Ablage-Nr.: 3.0				

Als sehr gute Hilfsmittel haben sich bei internen Tests geringe Mengen Tween 80 oder das Reagenz Fluid D (s.a. ASTM E 2314) erwiesen. [Vorsicht! Dieses Verfahren steht trotz guter Eignung im Widerspruch zur USP55, welche eine Rückgewinnung in sterilem Wasser vorsieht.]

Sporensuspensionen und Stearo-Ampullen

Bioindikator-Suspensionen und Stearo-Ampullen mit Nährmedium, bei denen die Sporen bereits in Suspension vorliegen, können nach Vortexen direkt eingesetzt werden. Jedoch sollte vor Verdünnung dort auch eine kurze Ultraschallbehandlung von 5 min vorgenommen werden um sicherzustellen, dass Sporenagglomerate aufgelöst werden.

Sonderfall Proben, die aus NTDF-Prozessen kommen

Wenn Sporenstreifen (oder andere Bioindikatoren [BI]) Formaldehyd ausgesetzt waren (z.B. zur Prüfung nach einem Formaldehyd-Sterilisationsverfahren), müssen die BIs (z.B. Streifen) vor der Populationsbestimmung nachbehandelt werden, um sie von wachstumshemmenden („maskierenden“) Formaldehydresten zu befreien. Hierzu werden die sterilisierten Sporenstreifen aseptisch für 10 min in 2 %-Na₂SO₃-Lösung überführt und dann für eine Stunde bei 90-93°C hitzeaktiviert. Anschließend werden die Streifen, wie oben beschrieben homogenisiert. Eine weitere Hitzeschock-Behandlung (siehe unten) ist nicht mehr notwendig. Für weitere Informationen dazu siehe DIN EN ISO 11138-5 oder Gömann et al.: Reaktionskinetik des Nieder-Temperatur-Dampf-Formaldehyd (NTDF) -Sterilisationsverfahrens, Zentr. Steril. 2000, 8 (5): 290-296.

Verdünnung der (vorbereiteten) Suspension

Mit sterilisiertem, destilliertem und gemäß USP (United States Pharmacopeia) gekühltem (2-8°C) Wasser ist eine Verdünnungsreihe derart zu erstellen, dass eine Konzentration von ca. 10² KBE/ml (Kolonie bildende Einheiten/ml) erreicht wird.

(Anmerkung: Erfahrungsgemäß ergeben sich höhere Populationswerte bei Verwendung von gekühltem (4-8°C) Wasser bei allen Verdünnungsschritten)

Am besten wird dies je Verdünnungsschritt durch Verdünnung von 1 ml der Ausgangskonzentration mit 9 ml sterilem destilliertem Wasser erreicht (1:10 Verdünnung).

Es ist immer darauf zu achten, dass die Suspension beim Verarbeiten homogen durchmischt wird. Aus Sicherheitsgründen wird empfohlen, von der Ausgangssuspension 2 verschiedene Verdünnungsreihen herzustellen und auszuwerten (Doppelansatz). Ist die Ausgangskonzentration der Proben nur ungefähr bekannt, müssen mehrere Verdünnungsstufen hergestellt und ausgewertet werden. Für die Auswertung wird dann die Verdünnungsstufe verwendet, die eine Keimkonzentration von etwa 30 – 300 KBE/ml enthält.

(Anmerkung: ein guter Aufschluss der Proben ist sicherzustellen. ggf. ist die Durchführung einer Ultraschallbehandlung der ersten 1:10 oder 1:100 Verdünnung noch vor Durchführung des Hitzeschocks sinnvoll (Ultraschall der Intensität eines Reinigungsbad schadet den Sporen nicht)).

	Technische Information	730-067-DE		V12
	Populationsbestimmung von Bioindikatoren	Erstellt	04.01.2006	JG
		Änderung	11.10.2021	HeK
		Prüfung	12.10.2021	UK
		Freigabe	12.10.2021	UK
Ablage-Nr.: 3.0				

Durchführung mit und ohne Hitzeschock

Nach USP sollen die Sporen mit einem Hitzeschock behandelt werden. Es empfiehlt sich, die Hälfte der Suspension mit nachfolgenden Temperaturen und Zeiten zu behandeln und den Rest unbehandelt zu lassen. Der Hitzeschock stellt ein Germinationssignal für die Sporen dar und soll eigentlich zu einer höheren Wiederfindung führen. Im Falle von *B. atrophaeus* kann aber auch eine geringere Population aus der Hitzeschockbehandlung resultieren, da die Sporen gegenüber feuchter Hitze wenig Resistenz besitzen – dies stellt keinen Mangel dar. Die Populationsangaben auf dem GKE-Zertifikat beziehen sich immer auf die Wiederfindung nach durchgeführtem Hitzeschock.

- *Bacillus atrophaeus* bei 80 - 85°C für 10 min Einwirkzeit
- *Geobacillus stearothermophilus* bei 95 – 100°C für 15 min Einwirkzeit

Hierbei ist die Aufwärmzeit der Proben zu berücksichtigen, so dass effektiv längere Zeiten als 10 Minuten bzw. 15 Minuten nötig sind (Die Einwirkzeit beginnt mit Erreichen der unteren Einwirktemperaturgrenze).

(Anmerkung: Die Zeit des Hitzeschocks beginnt wirklich erst ab Erreichen der angegebenen Temperaturwerte (80°C bei *B. atrophaeus* bzw. 95°C bei *G. stearothermophilus*). Um die angegebenen Temperaturbänder überhaupt innerhalb der Testgefäße erreichen zu können, empfiehlt sich ein eher höherer Einstellwert des Bades, vor allem bei *G. stearothermophilus* (z.B. 99°C Einstellwert).

Nach der Behandlung die Suspensionen rasch im Eiswasserbad (0-4°C) abkühlen.

Ausplattierung der Proben

Jeweils 1 ml der hitzebehandelten und unbehandelten Suspension in verschiedene Petrischalen geben und diese mit 15-20 ml auf ca. 45°C temperiertem, flüssigem TSA (Tryptic-Soja-Agar) übergießen. Die Lösungen so schnell wie möglich durch gleichmäßige Rotation der Agarplatte vermischen. Jeder Ansatz sollte dreifach bestimmt werden.

(Anmerkung: Für die Inkubation sollte man immer frischen Agar verwenden, der nur insgesamt einmal aufgekocht wurde. Durch wiederholtes Aufkochen verschlechtert sich die Qualität des Agars, was sich mit hoher Wahrscheinlichkeit in einer geringen Wiederfindung äußern kann. Verschiedene Hersteller bieten verschieden gut geeignete Nährmedien für Sporen an (GKE verwendet TSA von BD)).

Als Negativkontrolle eine weitere Petrischale mit verwendetem, sterilem Wasser und als Positivkontrolle eine weitere Petrischale mit einer Suspension bekannter Population herstellen.

	Technische Information	730-067-DE		V12
	Populationsbestimmung von Bioindikatoren	Erstellt	04.01.2006	JG
		Änderung	11.10.2021	HeK
		Prüfung	12.10.2021	UK
		Freigabe	12.10.2021	UK
Ablage-Nr.: 3.0				

Alle Platten 48 Stunden bei optimalen Wachstumstemperaturen inkubieren:

- *Bacillus pumilus* und *Bacillus atrophaeus* bei 33 - 37°C
- *Geobacillus stearothermophilus* bei 55 - 60°C

(Anmerkung: Bei falscher Temperaturwahl ist kein Wachstum möglich. Eine nicht ausreichende Einhaltung der Inkubationszeit von 48 h ergibt schlechtere Ausbeuten.)

Nach erfolgter Inkubation die Bakterienkolonien auf den Platten auszählen, die zwischen 30 und 300 KBE liegen sollten, und die durchschnittliche Population der drei behandelten Platten ermitteln. Platten unter 10 Kolonien sollten wegen möglicher Absorptionerscheinungen an Oberflächen und der damit verbundenen Fehler nicht mit in die Berechnung einbezogen werden. Es ist darauf zu achten, dass bei der Ermittlung der durchschnittlichen Population die hitzeschockbehandelten Platten getrennt von den unbehandelten Platten ausgewertet werden.

Abschließend kann mittels der gezählten KBE pro Agarplatte unter Einbeziehung des Verdünnungsfaktors die Population des Bioindikators errechnet werden.

Die erhaltenen Daten der unbehandelten und der hitzeschockbehandelten Inkubationsergebnisse vergleichen. Es ist möglich, dass es durch die Hitzeschockbehandlung zu höheren Wiederfindungsraten kommt als bei den Ergebnissen ohne Wärmebehandlung, da die Hitzeeinwirkung ein Auskeimsignal darstellt. Die Populationszahlen der GKE-Zertifikate werden bestimmt nach erfolgtem Hitzeschock und Inkubation gemäß der USP. Nach DIN EN ISO 11138-1 muss die Wiederfindungsrate von Sporenstreifen im Fenster bei - 50 + 300% liegen, bezogen auf die im Zertifikat der Charge angegebenen Werte.