

- *B. subtilis*
- Ethylenoxid
- Sterilisationsprozess
- Kinetik-Studie

Kinetik-Studie über die Abtötung von *Bacillus-subtilis*-Sporen in Ethylenoxid-Sterilisationsprozessen

D. Heider¹, J. Gömann², U. Junghannß¹, U. Kaiser²

Es wurde die Abtötungskinetik von *Bacillus subtilis*-Sporen in Ethylenoxid-Sterilisationsprozessen bestimmt. Dabei wurden die Verfahrensparameter Ethylenoxid-Konzentration, relative Luftfeuchtigkeit, Temperatur und Inertgas-Art variiert. Die Versuche wurden in einem Ethylenoxid-Resistometer entsprechend der Norm EN 866 Teil 2 durchgeführt. Die aus der Abtötungskinetik ermittelten D-Werte waren ein Maß für die Reaktionsgeschwindigkeitsänderungen der durchgeführten Sterilisationsprozesse.

Die Untersuchung ergab bei einer Variation der Ethylenoxid-Konzentration von 50 bis 1200 mg/l, dass die Reaktionsgeschwindigkeit des Prozesses stark von der Ethylenoxid-Konzentration beeinflusst wird und über den gesamten Konzentrationsbereich in etwa einer Reaktion erster Ordnung entspricht. Bei einer Variation der relativen Luftfeuchtigkeit von 10 bis 100% ergab sich eine Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit in dem Bereich von 10 bis 60% RH, während bei höheren Luftfeuchtigkeiten keine weiteren Veränderungen beobachtet wurden. Bei Variation der Temperatur von 30 bis 64 °C ergab sich, dass eine Temperaturerhöhung um 10 K die Reaktionsgeschwindigkeit verdoppelt. Bei der Sterilisation mit einer Ethylenoxid-Konzentration von 50 bis 150 mg/l ergaben sich bei der Zugabe von Luft keine Änderungen, während bei der Zugabe von Kohlendioxid die Reaktionsgeschwindigkeit um bis zu 32% abnimmt.

Einleitung und Problemstellung

Ethylenoxid-Sterilisationsprozesse werden weltweit in großem Maßstab in der Medizinprodukte-Industrie eingesetzt, wenn thermische Prozesse oder Strahlensterilisationsprozesse mit den Produkten unverträglich sind. Um den Verbrauch, die Freisetzung von Ethylenoxid in die Umwelt und den Verbleib des Gases in den Produkten zu minimieren, wird versucht, mit möglichst geringen Ethylenoxid-Konzentrationen und kurzen Sterilisierzeiten zu arbeiten. Während die Konzentrationen sich früher zwischen 600 mg/l bis 1000 mg/l bewegten, werden heute auch Konzentrationen unter 300 mg/l eingesetzt. Weiterhin werden dem reinen Sterilisationsgas Inertgase zugesetzt, um die Explosionsgefahr zu reduzieren.

Um die Sicherheit des Sterilisationsprozesses zu gewährleisten, ist es notwendig, die Auswirkung aller relevanten Verfahrensparameter quantitativ zu erfassen, wie dies in der Norm EN-ISO 14937 gefordert wird. In dieser Arbeit wurde der Einfluss der Parameter Ethylenoxid-Konzentration, relative Luftfeuchtigkeit, Temperatur und Inertgas-Art (Luft und Kohlendioxid) auf die Reaktionsgeschwindigkeit bei Sterilisationsprozessen mit Ethylenoxid untersucht. Um den Einfluss der Parameter bewerten zu können, wurde jeweils ein Parameter variiert, während die übrigen in Anlehnung an die Normen EN 866-2 und ISO 11138-2 konstant gehalten wurden. Die experimentelle Bestimmung der Reaktionskinetik erfolgte durch Aufnahme von Überlebenskurven nach der europäischen Norm EN

866-1 und der internationalen Norm ISO 11138-1 in einem Ethylenoxid-Resistometer, das den Normen EN 866-2 und ISO 11138-2 entspricht. Aus den Ergebnissen wurde ein mathematisches Modell der Reaktionskinetik hergeleitet.

Material und Methoden

Die Arbeiten wurden in einem von der Firma gke-mbH entwickelten Ethylenoxid-Resistometer durchgeführt. Hauptbestandteil dieses Resistometers war ein zwei Liter Glas-Reaktionsgefäß. Die Temperierung des Gefäßes erfolgte mit Hilfe eines externen Wasserthermostats über einen Wassermantel mit einer Genauigkeit von $\pm 0,1$ K vom Sollwert. Eine vakuumdichte Rührereinrichtung in dem Gefäß sicherte homogene Verhältnisse in der Reaktionskammer. Über Magnetventil-gesteuerte Zuleitungen konnten die Wirkstoffe aus Vorratsbehältern in die Kammer geleitet werden. Der Anschluss einer Vakuumpumpe ermöglichte die Evakuierung des Reaktionsgefäßes. Die Kontrolle der Sterilisationsbedingungen erfolgte über einen Pt100-Temperatursensor der Genauigkeitsklasse B (90.2221, Firma Juchheim GmbH & Co., Fulda) und einen Druck-

¹ Hochschule Anhalt, Bernburger Str. 52-57, D-06366 Köthen

² gke-mbH, Auf der Lind 10, D-65529 Waldems-Esch

sensor mit einer Kennlinienabweichung von 0,5% (4753, Firma Juchheim GmbH & Co., Fulda) und wurde auf einem Linienschreiber (L 250, Firma Linseis, Selb) protokolliert. Die Proben wurden mit Hilfe eines Probenhalters in der Reaktionskammer fixiert.

Als Prüfkeime wurden Bioindikator-Streifen der Firma gke-mbH mit dem Testkeim *Bacillus subtilis* (ATCC 9372) verwendet. Die mittlere Population betrug $2,0 \times 10^6$ KBE/Streifen. Unter Standardbedingungen nach EN 866-2 wurde bei 54 °C ein D_{EIO} -Wert von 2,9 Minuten ermittelt.

Als Referenz-Testbedingung wurde das Testverfahren der Normen EN 866-2 und ISO 11138-2 zur Bestimmung des D-Wertes bei 54 °C gewählt (siehe Tabelle 1). Für die Ermittlung der Abhängigkeiten wurde jeweils ein Verfahrensparameter verändert und die Veränderung der Reaktionsgeschwindigkeit über die Messung des D-Wertes ermittelt.

Für die Messung wurden nach der Thermostatisierung des Resistometers auf Betriebstemperatur die zu messenden Bioindikatoren am Probenhalter in den oberen Teil des Reaktionsgefäßes gehängt. Der Rührer wurde eingeschaltet, um im gesamten Reaktionsgefäß homogene Bedingungen zu garantieren. Das Reaktionsgefäß wurde zur Entfernung der Luft auf 60 mbar evakuiert. Da die Luft nicht vollständig entfernt werden konnte, war bei jeder Messung eine Restluftkonzentration von 2,2 mmol/l vorhanden. Nach Evakuierung des Reaktionsgefäßes wurden die erforderlichen Wirkstoffe eingelassen. Für die Vorkonditionierung wurde aus einem thermostatisierten Wasservorratsgefäß der zur Einstellung der relativen Luftfeuchtigkeit notwendige Wasserdampf zugegeben und für 30 min gehalten. Anschließend wurden die weiteren Gase zudosiert. Die Konzentration der Gase wurde durch Messung ihrer Partialdrücke eingestellt. Bei Sterilisationen mit den Inertgasen Luft (als Umgebungsluft) oder Kohlendioxid wurden die Gase bis zum Erreichen des Umgebungsdrucks von 1000 mB zudosiert, um eine möglichst hohe Konzentration der Inertgase zu erreichen. Bis zum Ende der Begasungsdauer blieben

Parameter	Referenzbedingungen nach EN 866-2	Variationsbreite der Parameter in dieser Arbeit
EtO-Konz.	600 mg/l ± 30 mg/l	50 – 1200 mg/l ± 10 mg/l
Relative Luftfeuchte	60% RH ± 10%	10 – 100% RH ± 3%
Temperatur	54 °C ± 1 °C	30 – 64 °C ± 0,1 °C
Inertgas-zusatz	Ohne*	Ohne*, Luft, CO ₂

Tabelle 1 Bedingungen des Standardverfahrens nach EN 866-2 und der Variationsbreite der untersuchten Parameter in dieser Arbeit

* kleine Restluftmengen blieben verfahrensbedingt in der Reaktionskammer zurück

die Geräteeinstellungen unverändert. Dabei wurden Druck- und Temperaturwerte laufend auf Übereinstimmung mit dem Sollwert geprüft. Bei Versuchsende wurden die Gase aus der Reaktionskammer abgezogen und die Kammer belüftet. Die Entlüftung wurde viermal wiederholt, um das Ethylenoxid vollständig zu entfernen. Die verwendeten Bioindikatoren wurden aus dem Reaktionsgefäß entnommen und sofort der Populationsbestimmung zugeführt. Für die Populationsbestimmung wurden die Bioindikatoren in einem mit 100 ml Wasser gefüllten Rührgefäß homogenisiert. Die erhaltene Suspension wurde definiert verdünnt und auf CaSo-Festmedium nach USP 24 und DAB 10 ausplattiert. Nach zweitägiger Inkubation bei 35 °C wurden die Kolonien ausgezählt. Die Population der überlebenden Keime wurde durch Multiplikation mit den Verdünnungsfaktoren berechnet.

Nach den Vorgaben der EN 866-2 ist eine Neutralisation des Ethylenoxids nicht notwendig. Durch das abschließende mehrfache Evakuieren der Reaktionskammer wird das Ethylenoxid vollständig entfernt. Zudem werden durch die Weiterbehandlung der biologischen Indikatoren mögliche Ethylenoxid-Reste stark verdünnt.

Die Auswertung der Experimente erfolgte über die Bestimmung der D-Werte der eingesetzten biologischen Indikatoren. Der D-Wert ist definiert als die Zeit in Minuten, die erforderlich ist, um die Ausgangskeimzahl für einen bestimmten Mikro-Organismus unter den in der Norm festgelegten

Bedingungen um eine Zehnerpotenz herabzusetzen bzw. die Keimzahl um 90% zu verringern. Durch die Messung des D-Wertes kann auf die Reaktionsgeschwindigkeit des Sterilisationsprozesses geschlossen werden. Der D-Wert ist zu der Reaktionsgeschwindigkeit r des Prozesses umgekehrt proportional ($D \sim 1/r$).

Nach graphischer Auftragung der experimentellen D-Werte gegen die Versuchsvariable wurden die Einflüsse der gemessenen Parameter dargestellt.

Für die Kinetik-Studie wurde der Einfluss der Parameter Ethylenoxid-Konzentration, relative Luftfeuchte, Temperatur und Zugabe von Luft und Kohlendioxid als sogenannte Inertgase untersucht.

Ergebnisse

Einfluss der Ethylenoxid-Konzentration

Es wurde die Abhängigkeit des D-Wertes von der Ethylenoxid-Konzentration über einen Konzentrationsbereich von 50 mg/l bis 1200 mg/l gemessen (Abbildung 1). Über den gesamten Messbereich war der D-Wert der Ethylenoxid-Konzentration in etwa umgekehrt proportional.

Einfluss der relativen Luftfeuchtigkeit

Hier wurde die Abhängigkeit des D-Wertes von der relativen Luftfeuchtigkeit von 10 – 100% RH gemessen (Abbildung 2). Bei einer relativen Luftfeuchtigkeit zwischen 10 und 30% ergab sich eine starke Abhängigkeit des

STERILISATION

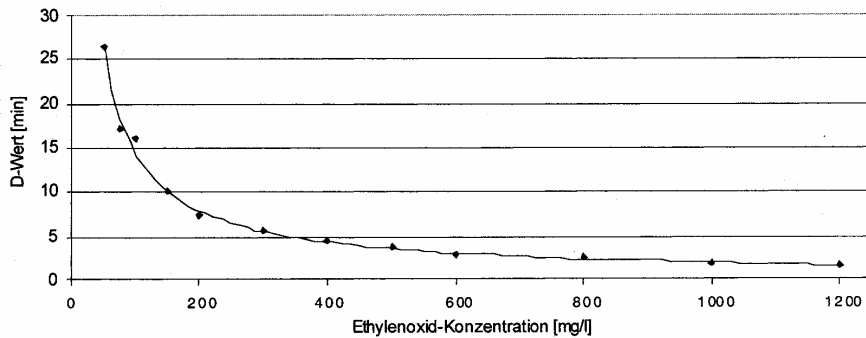


Abbildung 1 Abhängigkeit des D-Wertes von der Ethylenoxid-Konzentration (bei 54°C, 60% RH)

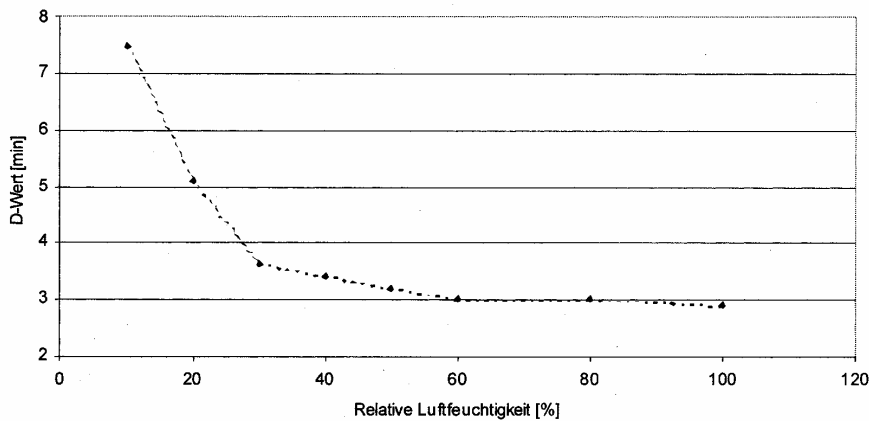


Abbildung 2 Abhängigkeit des D-Wertes von der relativen Luftfeuchtigkeit (bei 54°C, 600 mg/l EtO)

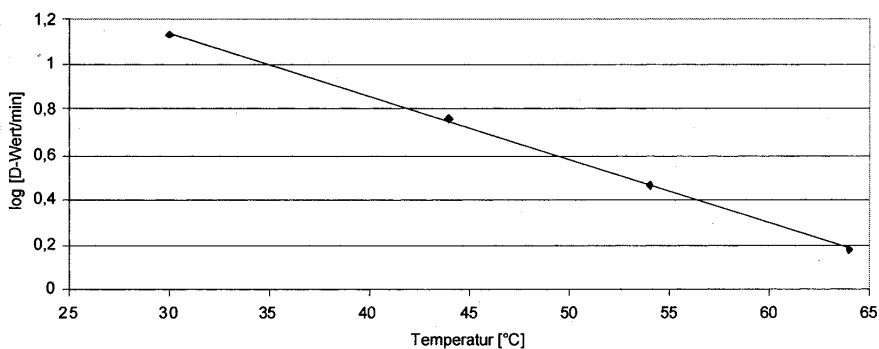


Abbildung 3 Bestimmung des z-Wertes (bei 60% RH, 600 mg/l EtO)

T [°C]	30	44	54	64
D-Wert [min]	13,6	5,7	2,9	1,5

Tabelle 2 D-Werte in Abhängigkeit von der Temperatur (600 mg/l EtO, 60% RH)

D-Werts von der relativen Luftfeuchtigkeit. Im Bereich von 30 bis 50% relative Luftfeuchtigkeit konnte eine Art Übergangsbereich beobachtet werden, während sich bei Erhöhungen der rela-

tiven Luftfeuchtigkeit über 60% der D-Wert einem Sättigungswert näherte.

Einfluss der Temperatur

Weiterhin wurde die Abhängigkeit des D-Wertes von der Temperatur bei 30 bis 64 °C untersucht. Eine Erhöhung der Temperatur bewirkte eine Verringerung des D-Werts (siehe Tabelle 2) und damit eine Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit.

Der z-Wert gibt die Temperatur in °C oder K an, die erforderlich ist, um den D-Wert um eine Zehnerpotenz zu verändern. Der Q_{10} -Wert wird als Quotient der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten k für jede Temperaturänderung um 10 K angegeben. Aus den Ergebnissen wurde ein z-Wert von 35,4 °C (Abbildung 3) und ein Q_{10} -Wert von 2,0 ermittelt. Letzteres bedeutet, dass sich die Reaktionsgeschwindigkeit bei einer Temperaturänderung um 10 K verdoppelt.

Einfluss von Luft oder Kohlendioxid

Anschließend wurde die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Zugabe von Luft oder Kohlendioxid gemessen. Hierzu wurden die D-Werte bei Sterilisation mit einem Ethylenoxid-Wasserdampf-Gemisch mit einer geringen Restluftmenge als Standard mit jenen eines Ethylenoxid-Wasserdampf-Luft-Gemisches und eines Ethylenoxid-Wasserdampf-Kohlendioxid-Gemisches verglichen. Die Ergebnisse (siehe Tabelle 3) zeigen, dass gegenüber dem Standard die Zugabe von Luft den D-Wert bzw. die Reaktionsgeschwindigkeit kaum veränderte, die Zugabe von Kohlendioxid den D-Wert aber um bis zu 32% erhöhte.

Bei den Untersuchungen zur D-Wert-Bestimmung unter Kohlendioxid-Zugabe wurde gemeinsam mit den Sporenstreifen ein pH-Papier exponiert. Das pH-Papier zeigte während der Sterilisation einen pH-Wert = 4,5 an.

Diskussion

Aus den Ergebnissen wird ersichtlich, dass der D-Wert sehr stark von der Ethylenoxid-Konzentration abhängt. Eine Erhöhung der Ethylenoxid-Kon-

Versuchsreihe EtO [mg/l]	Gesamtdruck im Reaktionsgefäß [mbar]	Konzentrationen der Komponenten [mmol/l]				D-Werte [min]
		EtO	H ₂ O	Luft	CO ₂	
50	181	1,12	3,31	2,21	–	26,5
	1000	1,12	3,31	32,36	–	26,6
	1000	1,12	3,31	2,21	30,15	28,1
100	212	2,24	3,31	2,21	–	16,0
	1000	2,24	3,31	31,24	–	15,8
	1000	2,24	3,31	2,21	29,03	19,4
150	243	3,37	3,31	2,21	–	10,0
	1000	3,37	3,31	30,11	–	10,1
	1000	3,37	3,31	2,21	27,91	13,2

Tabelle 3 Abhängigkeit der D-Werte von der Zugabe von Luft oder Kohlendioxid. Es wurden drei Versuchsreihen mit einer Ethylenoxid-Konzentration von 50, 100 und 150 mg/l und unterschiedlichen Konzentrationen an den Gasen Luft und Kohlendioxid bei gleichbleibender Temperatur von 54 °C und RH von 60% durchgeführt.

zentration verringert den D-Wert und beschleunigt somit den gesamten Sterilisationsprozess. Die Ergebnisse aus dieser Messreihe wurden für die Aufstellung der Reaktionskinetik herangezogen, die im nachfolgenden Kapitel beschrieben ist. Die in dieser Untersuchung verwendeten Konzentrationsbereiche waren weiter gefasst als die in den von Ernst und Shull (4) durchgeführten Messungen. In der vorliegenden Arbeit wurde bewiesen, dass selbst bei einer Steigerung der Ethylenoxid-Konzentration auf 1200 mg/l die Reaktionsgeschwindigkeit noch beschleunigt wird und einer Reaktion 1. Ordnung folgt.

Die Untersuchungen zur relativen Luftfeuchtigkeit zeigen, dass sich bei einer Luftfeuchtigkeit von weniger als 60% RH der D-Wert signifikant verlängert und bei allzu geringer Luftfeuchtigkeit geradezu sprunghaft ansteigt. Damit die Effektivität des Verfahrens zu keinem Zeitpunkt der Sterilisation negativ beeinflusst wird, ist es empfehlenswert, eine relative Luftfeuchtigkeit von über 60% RH an allen inneren und äußeren Oberflächen, die sterilisiert werden sollen, zu gewährleisten.

Die übereinstimmenden Q₁₀- und z-Werte der durchgeführten Studie mit Daten aus der Literatur (2, 4) zeigen, dass eine gute Reproduzierbarkeit der Messungen erreicht wurde. Die Erhöhung der Temperatur ist als ein einfaches Mittel anzusehen, um die Reaktionszeit bei der Ethylenoxid-Sterilisation herabzusetzen.

In industriellen Verfahren werden Ethylenoxid-Konzentrationen von 3 bis 15% in Kohlendioxid bei erhöhtem Druck von 2 – 5 bar durchgeführt. Diese Bedingungen entsprechen EtO-Konzentrationen von ca. 100 – 300 mg/l. Die Reaktionsgeschwindigkeit von chemischen Reaktionen ist im Bereich unter 10 bar so gut wie nicht druckabhängig. Die erhöhten Drücke dienen lediglich der absoluten EtO-Konzentrationserhöhung bei gleichzeitiger niedriger Gemischkonzentration mit dem Inertgas. Die erhaltenen Ergebnisse zei-

gen, dass mit der Kohlendioxid-Zugabe eine langsamere Ethylenoxid-Sterilisation erreicht wird und der Prozess bei Zusatz von CO₂ gegenüber reinem EtO oder Luft als Inertgas verlängert werden muss. Eine mögliche Ursache wäre die durch die Kohlendioxidzugabe verursachte pH-Wert-Reduzierung im Reaktionsraum. Die Beimischung von Luft führte zu keiner Änderung der Reaktionsgeschwindigkeit.

Reaktionskinetik

Es wurde festgestellt, dass die Reaktionsgeschwindigkeit in Ethylenoxid-Sterilisationsprozessen nach EN 866-2 von der Zahl der abzutötenden Keime, der Konzentration an Ethylenoxid und Wasserdampf sowie der Temperatur abhängt. Die Reaktionsgeschwindigkeit, welche die Erniedrigung der Keimzahl über die Zeit darstellt, wird allgemein durch folgende Gleichung beschrieben:

$$r = -dN/dt = k \times N \times [EtO]^m \times [H_2O]^n \tag{1}$$

Reaktionsgeschwindigkeit

Zeichen	Einheit	Beschreibung
N	[KBE/Streifen]	Keimzahl/ Streifen
r	[–KBE/min]	Reaktionsgeschwindigkeit
T	[min]	Zeit
k		temperaturabhängige Reaktionsgeschwindigkeitskonstante
[EtO]	[mg/l] od. [mmol/l]	Ethylenoxidkonzentration
[H ₂ O]	[mg/l] od. [mmol/l]	Wasserdampfkonzentration
m, n	Zahl	Exponenten für die [EtO] bzw. [H ₂ O]

Für den Exponent m der Ethylenoxidkonzentration wurde experimentell ein Wert von 1,2 bei 30 °C und 0,9 bei 54 °C

bestimmt (siehe Abbildung 1), sodass in erster Näherung ein Wert von $m = 1$ angenommen werden kann. Bei Luftfeuchtigkeiten größer 60% betrug der Exponent n Null (siehe Abbildung 2). Somit ergibt sich bei Luftfeuchtigkeiten größer 60% nach Integration der Gleichung von N_0 bis N_t und Umrechnen von k auf den dekadischen Logarithmus

$$\lg N_0 - \lg N_t = k' \leftrightarrow [\text{EtO}]^1 \times t = \frac{[\text{EtO}]^1}{D_{\text{Ref EtO}}} \times t = \text{IF} \quad (2)$$

Der Inaktivierungsfaktor IF, auch als dezimaler Reduktionsfaktor bezeichnet, beschreibt die Keimzahlminderung und ist die Hochzahldifferenz des dekadischen Logarithmus der Ausgangskonzentration und der verbleibenden Restpopulation nach der Zeit t .

Zeichen	Einheit	Beschreibung
N_0	[KBE]	Keimkonzentration zum Beginn des Betrachtungszeitraums
N_t	[KBE]	Keimkonzentration zum Ende des Betrachtungszeitraums
t	[min]	Zeit
IF	[Anzahl der dezimalen Reduktionsstufen]	Inaktivierungsfaktor
k'		modifizierte Reaktionskonstante
[EtO]	[mg/l] oder [mmol/l]	Ethylenoxid-Konzentration
D_{EtO}	[min]	tatsächliche dezimale Reduktionszahl bei vorgegebener [EtO]
D_{RefEtO}	mg/l EtO · min z.B.: 600 mg/l, 54 °C	dezimale Referenz-Reduktionszahl

Bei Dampf-Sterilisationsprozessen liegt eine Reaktion erster Ordnung vor. Das heißt, dass die Reaktionsgeschwindigkeit bei diesem Prozess bei konstanter Temperatur nur von der Keimzahl abhängt. Der D-Wert zur Beschreibung der Resistenz in Dampf-Sterilisationsprozessen hat die Einheit [min]. Im Gegensatz hierzu liegt bei dem in dieser Arbeit untersuchten Ethylenoxid-Sterilisationsprozess eine Reaktion zweiter Ordnung vor. Hier hängt die Reaktionsgeschwindigkeit neben der Keimzahl auch von der EtO-Wirkstoffkonzentration ab. Bei dieser Reaktion hat der D-Wert nicht die Einheit [min], sondern [mg/l x min] oder [mol/l x min]. Der D-Wert gilt nur für die während der Bestimmung einge-

stellten Versuchsbedingung. Wenn andere Ethylenoxid-Konzentrationen eingesetzt werden, muss der D-Wert des Bioindikators mit Formel (3) umgerechnet werden.

Ist der D_{EtO} -Wert bei einer Ethylenoxid-Konzentration bekannt, kann er zu einem Referenz-D $_{\text{RefEtO}}$ -Wert oder zu einem D_{EtO} -Wert mit beliebiger Ethylenoxidkonzentration umgerechnet werden:

$$D_{\text{EtO}} = \frac{D_{\text{Ref EtO}}}{[\text{EtO}]} = \left[\frac{\text{mg EtO} \times \text{min}}{1} \times \frac{1}{\text{mg EtO}} \right] = [\text{min}] \quad (3)$$

Bei Einsetzen des D_{EtO} -Wertes vereinfacht sich die Gleichung (2) zur Berechnung des Inaktivierungsfaktors zu

$$\text{IF} = \frac{t [\text{min}]}{D_{\text{EtO}} [\text{min}]} \quad (4)$$

Weiterhin kann bei einer Luftfeuchtigkeit größer 60% RH und einer konstanten Ethylenoxid-Konzentration ein geeigneter D-Wert nach folgender Formel von der bekannten Temperatur T_1 auf eine andere Temperatur T_2 umgerechnet werden, wenn [EtO] konstant bleibt und der z -Wert bekannt ist:

$$D_{\text{EtO bei } T_2} = D_{\text{EtO bei } T_1} \times 10^{(T_1 - T_2)/z} \quad (5)$$

In den Experimenten wurde ein z -Wert von 35,4°C bestimmt (siehe Abbildung 3).

Literatur

1. Joslyn, L J: Gaseous Chemical Sterilization, aus: Block, S S: Disinfection, Sterilization, and Preservation. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001: 337–359.
2. Caputo, R I and Rohn, K J: The Effects of EtO Sterilization variables on BI Performance. Medical Devices & Development 1982, 36–41.
3. Euronorm EN 866-2. Biologische Systeme für die Prüfung von Sterilisatoren und Sterilisationsverfahren. Teil 2: Spezielle Systeme für den Gebrauch von Ethylenoxid-Sterilisatoren. Beuth Verlag 1997.
4. Ernst, R R and Shull, J J: Ethylene Oxide Sterilization, I. Concentration and Temperature Effects. Soc. Am. Microb. 1962; 337–341.
5. Ernst, R R and Shull, J J: Ethylene oxide gaseous sterilization, II. Influence of Method of Humidification. Appl. Microbiol. 1969; 10: 342–344.
6. Gilbert, G L, Gambill, V M, Spinner, D R: Effect of moisture in ethylene oxide sterilization. Appl. Microbiol. 1964; 12: 496–509.