

Schlüsselwörter

- NTDF-Sterilisationsverfahren
- Bio-Indikatoren für NTDF-Verfahren
- Resistometer für NTDF-Verfahren
- Resistenz von Bio-Indikatoren

Reaktionskinetik des Nieder-Temperatur-Dampf-Formaldehyd- (NTDF) Sterilisationsverfahrens

Charakterisierung von Bio-Indikatoren zur Validierung und Routinekontrolle

J. Gömann, U. Kaiser, R. Menzel

Die Kinetik des Nieder-Temperatur-Dampf-Formaldehyd-Sterilisationsverfahrens wird beschrieben. Es werden ein Verfahren für die Resistenzbestimmung zur Validierung und Überwachung des NTDF-Verfahrens und Resistenzvorgaben für entsprechende Bio-Indikatoren vorgeschlagen.

Problemstellung

Bio-Indikatoren sind notwendig, um Sterilisationsverfahren zu validieren und um Routinekontrollen durchführen zu können. Zur Bestimmung der Resistenz müssen sowohl die Reaktionskinetik des Verfahrens als auch ein dem Prozess adäquates reproduzierbares Test-Verfahren bekannt sein, das mit den in der Praxis angewendeten Verfahren vergleichbar ist. Unter diesen reproduzierbaren Bedingungen müssen Mindest- F_0 -Werte nach ISO 14937 für das jeweilige Verfahren festgelegt werden, um die Sterilisation der heute im Gesundheitsbereich verwendeten Produkte mit der nach der EN 556 geforderten Sterilisationswahrscheinlichkeit von $SAL = 10^{-6}$ (KBE/Teil) sicherzustellen.

Bio-Indikatoren zur Validierung und Routinekontrollen von NTDF-Sterilisationsprozessen wurden bereits in der DIN 58948-14 beschrieben. Dort werden mit Blutserum belastete *B. stearothermophilus* Sporenstreifen eingesetzt. Diese Zusatzbehandlung zur Erhöhung der Resistenz stellte sich als nicht reproduzierbar heraus (1) und wurde in der die DIN-Norm ersetzenden neuen Euronorm EN 866-5 gestrichen. Die Messung der Resistenz nach der alten DIN-Norm erfolgte in 2%iger

wässriger Formaldehyd-Lösung, während der Formaldehyd-Sterilisationsprozess selbst jedoch als in der Gasphase ablaufend angesehen wurde. Die gerade veröffentlichte Euronorm EN 866-5 fordert daher die Resistenzbestimmung von Bio-Indikatoren in der Gasphase bei 10 mg Formaldehyd/l bei 70 °C.

Ein Resistometer für diese Messungen wurde bisher weder in der EN-Norm beschrieben noch konnten Angaben in der Literatur gefunden werden.

Die bisher in der Literatur verwendeten Resistometer injizieren die notwendigen Formaldehyd-Mengen in wässriger Lösung in eine thermostatisierte Sterilisationskammer und verdampfen diese Lösung, um in der Kammer die nötigen Wasserdampf- und Formaldehyd-Partialdrücke herzustellen (2, 3). Mit diesem Verfahren konnten weder von uns noch von anderen Autoren in der Gasphase konstante Formaldehyd-Konzentrationen erhalten werden, da sich Formaldehyd in Kondensat-Tropfen an der Wand extrem stark löst und damit in der Gasphase verarmt.

Bau und Betrieb eines Resistometers nach EN 866-5

Durch Vorlage einer Formaldehyd-Wasser-Lösung in einem thermostatisierten Glasgefäß erzeugten wir eine konstante Konzentration von Formaldehyd und Wasserdampf in der Gasphase, die durch ihren Partialdruck über der Lösung bestimmt ist.

Der Doppelmantel eines ca. 2 Liter Glaskolbens wurde mit einem Wasser-

bad thermostatisiert. Das Gefäß war mit einem gasdichten Rührer versehen und an eine Vakuumpumpe angeschlossen. Die zu messenden Bio-Indikatorproben wurden am Haken eines Schliffstopfens befestigt und im oberen Teil des Kolbens eingebracht.

Die Reaktionskammer wurde zunächst auf 100 mbar evakuiert. Anschließend wurden 311 mbar Wasserdampf (70 °C) in die Kammer eingelassen. Diese beiden Schritte wurden zur Entfernung der Luft in der Apparatur viermal wiederholt.

Danach wurden ca. 500 ml der thermostatisierten Formaldehyd-Wasser-Lösung durch das Öffnen eines Glashahnes, der mit einem Formaldehyd-Wasser-Vorratsbehälter verbunden war, angesaugt. Durch Rühren der Lösung stellte sich innerhalb einer Minute der Wasserdampf- und Formaldehyd-Partialdruck her und blieb über den gesamten Messzeitraum konstant. Der Verbrauch an Formaldehyd wird kontinuierlich aus der Flüssigkeitsphase nachgeliefert. Eine Verarmung an Formaldehyd ist nicht zu befürchten, da sich die Konzentration zwischen Flüssig- und Gasphase ca. um den Faktor 10.000 unterscheidet. Am Ende des Versuches wurde die Zuleitung zur Vakuumpumpe abgestellt, die vorgelegte Formaldehyd-Lösung aus dem Glaskolben entfernt und nochmals evakuiert, um Restmengen von Formaldehyd von der Probe zu entfernen. Anschließend wurde die Probe wie im Abschnitt „Auswertung der Bioindikatoren“ beschrieben bearbeitet.

Jörn Gömann, Dr. Ulrich Kaiser, Dr. Ralf Menzel, gke-mbH, Auf der Lind 10, D-65529 Waldems-Esch

Temperatur [°C]	50	60	70
Formaldehyd-Konzentration [mol/l]	10,5	5,2	2,9
[Gew.-%]	29	15	8,5

Tab. 1 Erforderliche Konzentration von Formaldehyd zur Herstellung von 10 mg Formaldehyd/l in der Gasphase im Partialdruck-Gleichgewicht

Die von uns gemessenen Konzentrations-Werte (Tabelle 1) stimmten sehr gut mit den von Walker veröffentlichten Daten überein (4).

Mit dem Verfahren konnten bei den oben angegebenen Temperaturen gut reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden. Gleichzeitig zeigt die Tabelle 1, dass im Gleichgewicht große Mengen Formaldehyd in der Flüssigkeit vorliegen. Die Konzentration von Formaldehyd in der Flüssig- und Gasphase verteilt sich im Verhältnis von ca. 1:10.000. Damit löst sich eine große Menge an Formaldehyd aus der Gasphase in wenigen Wasser-Kondensat-Tropfen. Wird nur die vorberechnete Menge Formaldehyd injiziert, verarmt die Formaldehyd-Konzentration in der Gasphase und es werden – prinzipbedingt – keine reproduzierbaren Formaldehyd-Konzentrationen in der Gasphase erhalten.

Resistenzbestimmung von Bio-Indikatoren in der Gasphase

In dem beschriebenen Resistometer wurden Resistenzbestimmungen durchgeführt. Die halblogarithmischen Überlebenskurven waren nicht linear und knickten nach einer Plateauphase, die nicht reproduzierbar war, ab.

Messungen der Formaldehyd-Beladung auf Bio-Indikator-Trägern über die Zeit zeigten, dass sich eine Formaldehyd-Konzentration bis zur Gleichgewichtskonzentration entsprechend der Formaldehyd-Konzentration in der Lösung aufbaut. Dieser Diffusionsvorgang ist eine Zeitreaktion über 10 – 40 min und hängt stark von den Umgebungsbedingungen ab, z.B. erhöht sich die Konzentration schneller beim Einsatz eines Ventilators im Resistometer oder bei Einsatz von nackten Bio-Indikatoren ohne Glassine-Verpackung.

Das gemessene Plateau am Anfang der Überlebenskurve wird durch diesen schwer reproduzierbaren Diffusionsvorgang bestimmt. Erst nach Erreichen der Gleichgewichtskonzentration auf dem Bioindikator sind reproduzierbare Abtötungsgeschwindigkeiten zu erwarten und auch gemessen worden.

Reaktionsmedium

Mit den durchgeführten Messungen wurde bestätigt, was bereits Horn (5) veröffentlichte, dass die Abtötung nicht durch Formaldehyd in der Gasphase bewirkt wird, sondern in einem alle Oberflächen abdeckenden Kondensatfilm abläuft, der das Gut umhüllt und unter Gleichgewichtsbedingungen eine ca. 10.000fach höhere Formaldehyd-Volumen-Konzentration enthält als die Gasphase (siehe Abschnitt „Bau und Betrieb eines Resistometers nach EN 866-5“).

Mit diesen Beobachtungen stellt sich die Frage, ob es sinnvoll ist, ein Resistometer zu verwenden, das in der Gasphase arbeitet, da die Reaktion selbst in der Flüssigkeitsphase d.h. in einem Kondensatfilm abläuft und daraus resultierend die Reproduzierbarkeit in der Gasphase grundsätzlich nicht gewährleistet sein kann.

Daher wurden alle weiteren Messungen zur Bestimmung der Reaktionskinetik in der Flüssigkeitsphase mit wässrigen Formaldehyd-Lösungen durchgeführt.

Die verwendeten Formaldehydlösungen wurden durch Lösen von Paraformaldehyd (Fa. Merck) in Wasser hergestellt. Es wurde kein Methanol zur Stabilisierung der Lösung zugegeben, da der Formaldehyd-Dampfdruck über einer wässrigen Formaldehydlösung und der Gehalt von freiem, nicht hydratisierten Formaldehyd in der Lösung vom Gehalt an Methanol mit beeinflusst wird (4).

Die Konzentrationen in der Gasphase können über die Gleichgewichts-Partialdrücke zu den Konzentrationen in der Flüssigphase korreliert werden.

Kritiker bemängeln, dass die Messungen der Resistenz, wie vorgeschlagen, nicht unter gleichen Bedingungen ausgeführt werden, wie sie in üblichen

NTDF-Verfahren in der Gasphase gängig sind. Dagegen ist einzuwenden, dass:

1. der mikrobiozide Effekt tatsächlich in der flüssigen Kondensatphase abläuft, und
2. fast alle realen NTDF-Verfahrensprozesse unter Nichtgleichgewichtsbedingungen ablaufen. Damit sind die Formaldehyd-Konzentrationen, die über den Diffusionsprozess in dem Kondensatfilm aufgebaut werden, unbestimmt.

Die hier vorgeschlagene Methode in der Flüssigphase, die dem NTDF-Verfahren auch tatsächlich am nächsten kommt, ermöglicht reproduzierbare Kinetikmessungen.

Auswertung der Bio-Indikatoren

Wenn Bio-Indikatoren aus dem Reaktionsgefäß, ob aus der Gas- oder Flüssigkeitsphase, entnommen werden, haften an ihnen Formaldehyd, das das Auskeimen hemmen kann. Die Bio-Indikatoren müssen vor der Bebrütung von Formaldehyd befreit werden. Dies kann durch Zugabe von Histidin und Cystein in die Nährlösung oder durch vorhergehende Neutralisation mit Natriumsulfatlösung (Na₂SO₃) erfolgen.

Wir verwendeten eine vom RKI Berlin entwickelte und von uns modifizierte Methode (6):

1. Eintauchen in 2%ige Na₂SO₃-Lösung für 10 min
 2. 1 h Hitzeaktivierung bei 90 – 93 °C
 3. Inkubation bei 55 °C für 5 Tage
- Ohne Hitzeaktivierung kann sich die Auskeimung von *B. stearothermophilus* über 14 Tage hinziehen.

Reaktionskinetik

Spicher und Peters (7, 8) stellten bereits fest, dass die Abtötungsgeschwindigkeit von Keimen in Formaldehyd-Lösungen temperatur-, konzentrations- und keimzahlabhängig ist. Wir führten Messungen in 1-, 2- und 3-molaren Formaldehyd-Lösungen bei 50 und 70 °C durch (Tabelle 2).

Dabei konnten wir feststellen, dass die Abtötungsgeschwindigkeit in etwa

Temperatur [°C]	FA-Exponent n	Formaldehyd-Konzentration [M]	1	2	3
50	1,3	D _{FA} [min]	27,1	11,8	6,0
		D [M min]	27,1	23,6	18
70	1,0	D _{FA} [min]	3,0	1,5	0,9
		D [M min]	3,0	3,0	2,7
		z-Wert [°C]	21	23	24

Tab. 2 D- und z-Werte bei unterschiedlichen Temperaturen und Formaldehyd-Konzentrationen

proportional mit der Formaldehyd-Konzentration zunimmt. Der ermittelte z-Wert liegt zwischen 21 und 24 °C. Ob diese Streuung durch Messfehler oder durch die Komplexität der Reaktion bedingt ist, wurde von uns nicht ermittelt.

Anders als im Dampf-Sterilisationsprozess liegt hier keine Reaktionskinetik 1. Ordnung sondern 2. Ordnung vor:

$$-\frac{dN}{dt} = k \times [FA]^n \times N \quad (1)$$

Der gemessene Exponent n für die Formaldehyd-Konzentration hat bei 50 °C den Wert n = 1,3 und bei 70 °C den Wert n = 1,0. Peters und Spicher (7) fanden im Temperaturbereich 50 °C – 80 °C einen Exponenten von 1,05 ± 0,1. Innerhalb der Messgenauigkeit stimmt dies mit einer Reaktionskinetik 2. Ordnung und einem linearen Zusammenhang zwischen Formaldehydkonzentration und Abtötung überein.

Unter der Annahme von n = 1 führt die Integration der Gleichung (1) in den Grenzen von N₀ bis N:

$$\lg \frac{N}{N_0} = \lg N_0 - \lg N = \frac{1}{D} \times [FA] \times t = IF \quad (2)$$

IF = Inaktivierungsfaktor (Anzahl der dezimalen Reduktionsstufen)

N₀ = Ausgangskeimzahl [KBE/Teil]

N = Restkeimzahl nach Sterilisierzeit t [KBE/Teil]

t = Sterilisierzeit [min]

M = Molare Konzentration [mol/l]

[FA] = Formaldehyd-Konzentration [M] im Kondensat oder in der Vorlage

k' = $\frac{1}{D}$ = Reaktionsgeschwindigkeits-Konstante $\frac{1}{M \times \text{min}}$

D_{70°C, 1M FA} = dezimaler Reduktionsfaktor gemessen bei 70 °C und 1 M FA [min]

n = Exponent der FA-Konzentration (dimensionslos)

D_{FA} = D-Wert bezogen auf eine bestimmte [FA] [min]

Durch die Reaktionskinetik zweiter Ordnung hat der D-Wert die Dimension [M min]. Obwohl der D-Wert von der Formaldehyd-Konzentration unabhängig ist, steigt die Reaktionsgeschwindigkeit mit steigender Formaldehyd-Konzentration.

Damit ist der Quotient $\frac{D}{FA} = D_{FA}$ dem D-Wert bei einer Reaktionskinetik 1. Ordnung gleichzusetzen, d.h. z.B. bei Verdopplung der Formaldehyd-Konzentration halbiert sich der Quotient und damit die Reaktionszeit.

Neuer Normenvorschlag

Aus den gesammelten Erfahrungen stellen wir für die Überarbeitung der EN 866-5 anlässlich der Erstellung einer neuen ISO-EN-Norm folgende Werte zur Diskussion:

1. Resistometer: 1 M Formaldehyd-Lösung bei 60 °C
2. Inkubation wie unter „Auswertung der Bioindikatoren“ beschrieben
3. Bio-Indikatoren
Keim: *B. stearothermophilus*
Keimträger: Glasvlies
Population: 10⁵ – 10⁷ KBE/Streifen

	Dimension	SAL	IF	bei 1 M FA		bei 2 M FA	
				min	max	min	max
D	M min			5	6	2,5	3
F _{BIO}	M min			30	36	15	18
Überlebenszeit	min	10 ²	4	20	24	10	12
Abtötungszeit	min	10 ⁴	10	50	60	25	30
Fenster	min	–	–	20	60	10	30
Wachstum (W) – Abtötung (A)				W	A	W	A

Tab. 3 Grenzwerte des Abtötungs-Überlebensfensters bei 60°C

4. Resistenz:

Die Gesamt-Resistenz eines Bio-Indikators wird nicht nur durch die Keimzahl sondern auch durch die Resistenz (D-Wert) des verwendeten Keimes bestimmt. Die Gesamt-Resistenz des Bio-Indikators wird damit durch seinen F_{BIO}-Wert bestimmt:

$$F_{BIO, 60^\circ C, 1M FA} = \frac{D}{[FA]} \times \lg N = \frac{\geq 30 \leq 36}{[FA]} \text{ [min]} \quad (3)$$

Dies entspricht einem D-Wert-Fenster von:

$$D_{60^\circ C, 1M FA} \geq 4 \leq 7 \text{ [M min]}$$

Der F_{BIO}-Wert gibt bei einer definierten Formaldehyd-Konzentration und Temperatur an, wie lange sterilisiert werden muss, um die Keimzahl im Durchschnitt auf den Wert 1 [KBE/Streifen] zu reduzieren.

Für andere Formaldehyd-Konzentrationen gelten entsprechend angepasste Werte.

Das vorgeschlagene Abtötungs-Überlebens-Fenster entspricht in etwa den derzeit auf dem Markt befindlichen NTDF-Sterilisationsprozessen bei 60 °C mit einer Einwirkzeit von 60 min.

Bei Verwendung des z-Wertes von 22 °C aus der Tabelle 2, als Mittelwert von 1 und 2 M Formaldehyd-Konzentration entnommen, ergeben sich für Bio-Indikatoren bei Erhöhung der Temperatur auf 70 °C die in Tabelle 4 aufgeführten Grenzwerte entsprechend Tabelle 3.

Für andere Formaldehyd-Konzentrationen gelten entsprechend angepasste Werte.

Die vorgeschlagenen Werte sollten bei verschiedenen Temperaturen und Formaldehyd-Konzentrationen nach den Forderungen der ISO 14937 überprüft werden.

bei $N_0=10^6$ KBE/Teil	Dimension	SAL	IF	bei 1 M FA		bei 2 M FA	
				min	max	min	max
D	M min			1,7	2,1	0,85	1,05
F_{bio}	M min			10,2	12,6	5,1	6,3
Überlebenszeit	min	10^2	4	6,8	8,4	3,4	4,2
Abtötungszeit	min	10^{-4}	10	17	21	8,5	10,5
Fenster	min	–	–	6,8	21	3,4	10,5
Wachstum (W) – Abtötung (A)				W	A	W	A

Tab. 4 Grenzwerte des Abtötungs-Überlebensfensters bei 70°C

Schlussbetrachtungen

- 1) Das vorgeschlagene Verfahren kann als Grundlage für die Resistenzbestimmung von Bio-Indikatoren für NTDF-Sterilisationsverfahren dienen.
- 2) Die gefundenen stark zeitabhängigen Diffusionsprozesse des Formaldehyds von der Gasphase in den Kondensatfilm auf der Oberfläche des zu sterilisierenden Gutes erfordert neben der Überwachung der hier beschriebenen Reaktionskinetik die genaue Überwachung der Penetrationskinetik des Formaldehyds auf alle äußeren und inneren Oberflächen des zu sterilisierenden Gutes. Die Überwachung der Penetrationskinetik des Sterilisiergases auf innere

Oberflächen kann nur mit geeigneten Prüfkörpern (Process Challenge Device = PCD) erfolgen und muss bei der Validierung und Routinekontrolle besondere Beachtung finden.

- 3) Deshalb ist die Erarbeitung einer Norm für die Validierung dieses Verfahrens notwendig. *

Literatur

- 1 Mecke P, Christiansen B, Pirk A Zur Eignung handelsüblicher Bio-Indikatoren mit Sporen von *B. stearothermophilus* für die Prüfung von Gas-Sterilisatoren. Zbl. Hyg. 1991; 192: 25-32.
- 2 Wright AM, Hoxey EV, Soper CJ, Davies DJG Biological indicators for

low temperature steam and formaldehyde sterilization: Investigation of the effect of change in temperature and formaldehyde concentration on spores of *Bacillus stearothermophilus*. NCIMB 8224. Journal of Applied Bacteriology 1996; 80: 259.

- 3 Handlos V Formaldehyde sterilization – II formaldehyde steam-sterilization, the process and its influence on the formaldehyde residuals. Arch. Pharm. Chemi 1978; Sci Ed. 7: 1–11.
- 4 Walker JF Formaldehyde, 3rd Ed. New York: Reinhold Publishing, 1964.
- 5 Horn, Privora, Weuffen, Handbuch der Desinfektion und Sterilisation, Band I. Berlin: VEB Verl. Volk und Gesundheit, 1972: 267 f.
- 6 Interne Mitteilung Robert Koch Institut, Berlin (RKI).
- 7 Spicher G, Peters J. Resistenz mikrobieller Keime gegenüber Formaldehyd: II. Abhängigkeit des mikrobiziden Effektes von der Konzentration und der Einwirkdauer des Formaldehyds. Zbl. Bakt. Hyg. 1981; I. Abt. Orig. B 174: 133–150.
- 8 Spicher G, Peters J Resistenz mikrobieller Keime gegenüber Formaldehyd: III. Abhängigkeit des mikrobiziden Effektes von der Temperatur bei *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium* und Sporen von *Bacillus stearothermophilus*. Zbl. Hyg. 1995; 196, 545–561.