

**OXYCARE GmbH**  
Medizin- u. Rehathechnik  
Tel. 04 21 - 48 996-6 / Fax -99  
Zentrale:  
28307 Bremen · Holzweide 6

# Effektivität verschiedener Aufbereitungsverfahren

## zur Inaktivierung Infektiöser Prionen unter Beachtung des Diskussionspapiers des Robert-Koch-Instituts

von K. Roth<sup>1</sup>, Z. Yan<sup>1</sup>, P. Heeg<sup>4</sup>, S. Gaedt<sup>2</sup>, E. Pfaff<sup>3</sup>, L. Stitz<sup>3</sup>, H.P. Zenner<sup>2</sup>, P.S. Mauz<sup>2</sup>

<sup>1</sup>SMP GmbH, Tübingen; <sup>2</sup>Universitätsklinik HNO Tübingen; <sup>3</sup>Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten, Tübingen;

<sup>4</sup>Universitätsklinik Tübingen – Mikrobiologie und Klinikhygiene

### Einleitung

Mit dem Auftreten der neuen Variante von CJK wurden in verschiedenen Ländern neue Vorschriften zur Aufbereitung von chirurgischen Instrumenten erlassen. Teilweise wurde selbst die Wiederverwendung von speziellen Instrumenten verboten (Tonsillektomie- und Adenotomieinstrumente; Grossbritannien, 2002). Diese drastischen Maßnahmen begründen sich auf empirisch erfasste Daten. Untersuchungen wurden meist nur mit alkalischen Reinigern und Dampfsterilisation durchgeführt, da man bei nichtalkalischer Reinigung und Niedertemperatursterilisationsverfahren von einer prinzipiellen Unwirksamkeit ausging. Zusätzlich wurde bei keiner Untersuchung bisher verfahrenstechnisch das Material und Design der Instrumente berücksichtigt. Ziel unserer Untersuchung war die Überprüfung der Effektivität verschiedener Aufbereitungsverfahren zur Inaktivierung infektiöser Prionen. Dabei wurden besonders auch Verfahren untersucht, die für thermolabile und empfindliche Instrumente, wie z.B. Endoskope geeignet sind. Auf Grund der niedrigen Sensitivität von Westernblot und anderen Nachweisverfahren wurde als Prüfmodell der Bioassay gewählt.

### Methoden und Verfahren

#### Scrapie Material

Ein mit dem 263 K Scrapie Stamm infiziertes Hamstergehirn wurde vom Robert Koch Institut Berlin zu Verfügung gestellt. 20 µl 10% Hirnhomogenat wurde gesunden Hamstern intracerebral injiziert. Nach Auftreten von Symptomen wurden die Tiere getötet und das Gehirn für die weitere Untersuchung entnommen. Proben dieser Gehirne wurden zusätzlich nach Protease K Verdau im Westernblot auf die Anwesenheit des infektiösen Prion Proteins untersucht.

#### Präparation des Trägers

Drähte aus chirurgischem Stahl (1.4301) mit 0,2 mm Durchmesser und einer Länge von 5 mm simulierten chirurgische Instrumente und dienten als Träger für das infektiöse Prionenmaterial. Sie wurden durch Eintauchen (16 Stunden) in 10% prionenhaltigem Hirnhomogenat in PBS bei Raumtemperatur kontaminiert. Anschließend wurden die Drähte eine Stunde an der Luft getrocknet bevor sie mit den unten beschriebenen Verfahren aufbereitet wurden. Bei der Aufbereitung wurden jeweils

die Herstellerangaben bezüglich Konzentration, Einwirkzeit und Anwendungstemperatur der Chemie berücksichtigt. Einige Verfahren wurden aber auch modifiziert, um deren Wirksamkeit zu verbessern. Der Aufbereitung folgte eine Spülung mit PBS und ein dreimaliges Nachspülen mit sterilem destilliertem Wasser.

#### Implantation des Drahtes

Die aufbereiteten Drähte wurden den Hamstern unter Narkose in den Thalamus implantiert. Zur genauen Platzierung wurde ein Stereotaxer verwendet (Koordinaten vom Bregma aus gemessen: caudal 2,0 mm, mediolateral 2,0 mm; dorsoventral 6,0 mm).

#### Bewertung der Aussagen des Bioassays

Die Negativkontrolle (nicht kontaminierter Draht) zeigt, dass der Draht alleine keine Auswirkung auf die Vitalität der Tiere hat. Die Verlängerung der Überlebenszeit der Tiere, die mit einem aufbereiteten Draht infiziert wurden, verglichen mit Tieren, die mit einem nicht aufbereiteten Draht infiziert wurden (Positivkontrolle), gibt Auskunft über die Wirksamkeit des gewählten Aufbereitungsverfahrens.

Tabelle 1: Infektiösität der Stahldrähte mit und ohne Aufbereitung.

Inokulation	Krank/Total	Inkubations- Zeit ± s.d. Tage
<b>Kontrollexperimente</b>		
Draht mit normalem 10% Gehirnhomogenat	0/8	> 592
Draht mit krankem 10% Gehirnhomogenat	5/5	81
Intracerebral mit krankem 1% Gehirnhomogenat 0,02ml	10/10	80
Draht mit krankem 10% Gehirnhomogenat, 5 min Verweildauer	9/9	101 ± 5
<b>Dekontaminationsexperimente der Drähten</b>		
<b>Gruppe A</b>		
Sterrad, Standard Zyklus (ohne Reinigung)	9/9	97 ± 4
134°C 18min autoklavieren (ohne Reinigung)	1/10	> 174
1M NaOH Bad 24 h plus 134°C 18 min autoklavieren	2/10	197 ± 199*
<b>Gruppe B</b>		
59% Wasserstoffperoxid tauchen 10 min	3/10	> 264 ± 35
59% Wasserstoffperoxid tauchen 20 min	4/10	> 308 ± 35
<b>Gruppe C</b>		
Enzymatisches Reinigungsmittel (1:50) waschen	10/10	95 ± 0,4
Enzymatisches Reinigungsmittel (1:50) waschen plus CIDEX OPA	10/10	107 ± 4
Enzymatisches Reinigungsmittel (1:50) waschen plus 134°C 18 min autoklavieren	10/10	145 ± 17
Enzymatisches Reinigungsmittel (1:50) waschen plus Sterrad, Standard Zyklus	10/10	111 ± 12
Enzymatisches Reinigungsmittel (1:1) tauchen 24 h	10/10	93 ± 1
Enzymatisches Reinigungsmittel (1:1) tauchen 30 min	10/10	94 ± 2
Enzymatisches Reinigungsmittel (1:1) tauchen 30 min plus CIDEX OPA	10/10	118 ± 9
Enzymatisches Reinigungsmittel (1:1) tauchen 30 min plus Sterrad, vier Injektionen	7/8	190 ± 61
<b>Gruppe D</b>		
Nu-Cidex tauchen 5 min (0,35% Peressigsäure)	10/10	95 ± 3
<b>Gruppe E</b>		
Alkalisches Reinigungsmittel (pH 11) waschen bei 70°C		
plus CIDEX OPA	2/10	> 318 ± 88
plus 134°C 18 min autoklavieren	2/9	> 263
plus Sterrad, vier Injektionen	0/9	> 397
Bei den kranken Tieren wurde im nachhinein mithilfe des Westernblots der Nachweis von pathologischem Prionprotein geführt		
* Ein Tier starb am Tag 151, ein anders an Tag 432, alle weiteren Tiere in dieser Gruppe sind noch nicht klinisch auffällig nach 579 Tagen.		

## Diskussion

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass Stahldrähte, die mit pathologischem Prionproteine kontaminiert wurden eine hohe Infektiösität aufweisen, nachdem sie Hamstern implantiert wurden. Selbst eine Kontaktzeit von 5 min war ausreichend um eine Infektion hervorzurufen. Dieses Prüfmodell wird auch vom Robert-Koch-Institut beschrieben und wird von anderen Gruppen angewandt.

Wir untersuchten Reinigungs- und Desinfektionsmittel zum Teil in Verbindung mit Sterilisationsverfahren auf ihre Effizienz hinsichtlich einer Inaktivierung des pathologischen Prionproteins (PrP<sup>sc</sup>). In diesem ersten Bericht, bei dem das beschriebene Prüfverfahren angewandt wurde, wurde die Bewertung allein an Hand der Überlebenszeit der Versuchstiere vorgenommen. Eine Übereinstimmung zwischen Überlebenszeit und Wirksamkeit des Verfahrens konnte getroffen werden.

Das Diskussionspapier des Robert Koch Instituts beschreibt ein Verfahren als effektiv bei dem eine Verdoppelung der Überlebenszeit erreicht wird. Am 01.10.2003 war diese Verdoppelung 80 Tagen auf 160 Tagen für alle Gruppen gegeben.

## Zusammenfassung

Die vorläufigen Ergebnisse zeigen, dass

- Die Implantationsdauer des Drahtes keinen wesentlichen Einfluss auf die Überlebenszeit hat.
- Hochkonzentriertes Wasserstoffperoxid (59%) einen starken inaktivierenden Einfluss auf PrP<sup>sc</sup> hat.
- Dampfsterilisation bei 134°C, 18 min in Kombination mit enzymatischer Reinigung nicht die erwartete Wirkung auf PrP<sup>sc</sup> hat.
- Reinigung mit dem hier getesteten alkalischen Reinigern mit einem pH Wert von 11 gute Ergebnisse im gewählten Testmodell zeigen.
- Alkalischer Reinigung mit dem getesteten Reiniger gefolgt von Sterilisation im STERRAD ein wirksamer Prozess zur Inaktivierung von Prionenkontamination ist.
- Nur eine Kombination von alkalischer Reinigung gefolgt von Desinfektion oder Sterilisation einen hohen Effekt zeigt.

Eine Übertragung der Ergebnisse von einem Reiniger auf einen anderen Reiniger ist aber

nur bedingt möglich. So zeigten Ergebnisse anderer Gruppen bei enzymatischen Reinigern deutlich bessere Ergebnisse, die allerdings noch nicht ausreichend nach dem RKI-Diskussionspapier einzustufen sind. Die Wirksamkeit jedes Aufbereitungsverfahrens muss demnach individuell nachgewiesen werden.

**Danksagung**

Die Arbeiten wurden unterstützt von Advanced Sterilization Products und in Teilen mit Mitteln aus dem «TSE-Programm Baden-Württemberg/Deutschland».

**References**

1. Prusiner SB. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 1982;216:136-44.
2. Prusiner SB. Prion diseases and the BSE crisis. *Science* 1997;278:245-51.
3. Aguzzi A, Weissmann C. Prion research: the next frontiers. *Nature* 1997;389:795-8.
4. Wadsworth JD, Joiner S, Hill AF, et al. Tissue distribution of protease resistant prion protein in variant Creutzfeldt-Jakob disease using a highly sensitive immunoblotting assay. *Lancet* 2001;358:171-80.
5. Hilton DA, Ghani AC, Conyers L, et al. Accumulation of prion protein in tonsil and appendix: review of tissue samples. *BMJ* 2002;325:633-4.
6. Taylor DM, Fraser H, McConnell I, et al. Decontamination studies with the agents of bovine spongiform encephalopathy and scrapie. *Arch Virol* 1994;139:313-26.
7. Taylor DM. Inactivation of transmissible degenerative encephalopathy agents: A review. *Vet J* 2000;159:10-7.
8. Laurenson IF, Whyte AS, Fox C. Iatrogenic prion infection. *N Engl J Med* 2001;345:840-1.
9. Zobeley E, Flechsig E, Cozzio A, Enari M, Weissmann C. Infectivity of scrapie prions bound to a stainless steel surface. *Mol Med* 1999;5:240-3.
10. Flechsig E, Hegyi I, Enari M, Schwarz P, Collinge J, Weissmann C. Transmission of scrapie by steel-surface-bound prions. *Mol Med* 2001;7:679-84.
11. Bruce ME, McConnell I, Will RG, Ironside JW; Detection of variant Creutzfeldt-Jakob disease infectivity in extraneural tissues. *Lancet* 2001;358:208-9.
12. Bertram J., Mielke M., Beekes M. Lemmer K., Baier M. and Pauli G. (2004) Inaktivierung und Entfernung von Prionen bei der Aufbereitung von Medizinprodukten – Ein Beitrag zur Prüfung und Deklaration geeigneter Verfahren. Bundesgesundheitsbl – Gesundheitsforsch – Gesundheitsschutz 47:36-40.
13. Yan Z, Stitz L, Heeg P, Pfaff E, Roth K; Infectivity of prion protein bound to stainless steel wires: a model for testing decontamination procedures for transmissible spongiform encephalopathies. *ICHE* 2004;4:280-284.
14. Sehulster LM; Editorial: Prion inactivation and medical instruments reprocessing: challenges facing healthcare facilities. *ICHE* 2004;4:276-279.

**Technische STERILISATIONsassistentin/-assistent**

Fachkunde I: 14.-26. Juni 2004  
 Fachkunde II: 13.-25. September 2004  
 Fachkunde III: 08.-19. Nov. 2004 und Frühj. 2005

**EO und FA – STERILISATOREN  
 RAUMDESINFEKTION mit Formaldehyd**  
 27.-29. Sept. 2004 Vollkurs  
 27.-28. Sept. 2004 Auffrischkurs

**Effektive MITARBEITERFÜHRUNG**  
 09.-10. Dez. 2004 Seminar

**KONFLIKT – MANAGEMENT**  
 21.-22. Sept. 2004 Seminar

**Rhetorik und Präsentation – DIE FREIE REDE**  
 05.-06. Febr. 2004 Seminar


**FÜHREN und MODERIEREN von Team- und  
 Gruppenbesprechungen**  
 22.-23. April 2004 Seminar

**Erfolgreiche VERHANDLUNGSFÜHRUNG**  
 11. – 12. März 2004 Seminar

**Fortbildung im Gesundheits- und  
 Krankenhauswesen 2004**

- **Krankenhausmanagement**  
*Fachkurse Sterilisation / Desinfektion*
- **Führungstraining, Kommunikation, Teamarbeit**  
*Konfliktmanagement, Mitarbeiterführung, Rhetorik, Präsentation, Verhandlungsführung.*
- **Medizin und Medizintechnik**  
*onkologische/immunolog. Untersuchungsmethoden Tumorthapien, Röntgen, Strahlenschutz, LSC*
- **Biotechnologie**
- **Psychotherapeutische Zusatzausbildungen**  
*Hypnose, Autogenes Training, Verhaltenstherapie*
- **Gedächtnisstörungen / Rehabilitation**  
*Neuropsychologische Diagnostik, Tests, Gruppentraining*
- **Kindertherapie**  
*Aufmerksamkeitsstörg./Hyperaktivität, Soz. Kompetenz, Hör- und Sprachentwicklung, Kinderhypnose, Kinder-AT*
- **Ausbildung zum Supervisor / Praxisberater**
- **Ärztl. Weiterbildung Psychotherapie (Blockform)**

**Universität Tübingen**



**WIT**  
 Wissenschaftszentrum  
 für  
 Gesundheits- und  
 Krankenhauswesen

Wilhelmstraße 5, D-72074 Tübingen  
 07071 / 29-76439, -76872, -75010 FAX: 29-5101  
 wit@uni-tuebingen.de, <http://www.uni-tuebingen.de/wit>