



advanced cleaning solutions

# Entwicklung von Reinigungsmitteln zur Entfernung von Biofilmen

Dr. Urs Rosenberg

SGSV Biel, 18.06.2015

Kooperationsprojekt mit:



Materials Science & Technology

Gefördert durch:



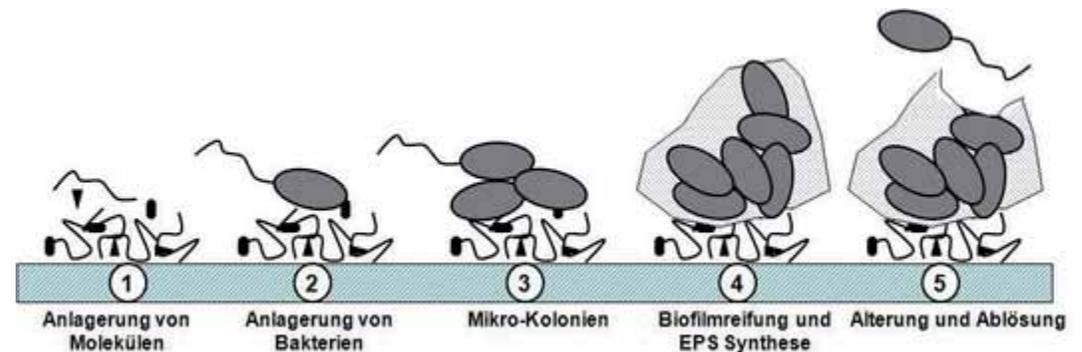
Schweizerische Eidgenossenschaft  
Confédération suisse  
Confederazione Svizzera  
Confederaziun svizra

Kommission für Technologie und  
Innovation KTI



# Biofilme

- Strukturierte Gemeinschaften von Mikroorganismen auf Oberflächen oder an Grenzflächen.
- Selbstproduzierte Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) bestehend aus Polysacchariden, Proteinen, Lipiden, Nukleinsäuren und anderen Verbindungen.
- Biofilm-assoziierte Mikroorganismen bis zu 1000-fach weniger empfindlich gegen antimikrobielle Wirkstoffe als deren planktonische Form.



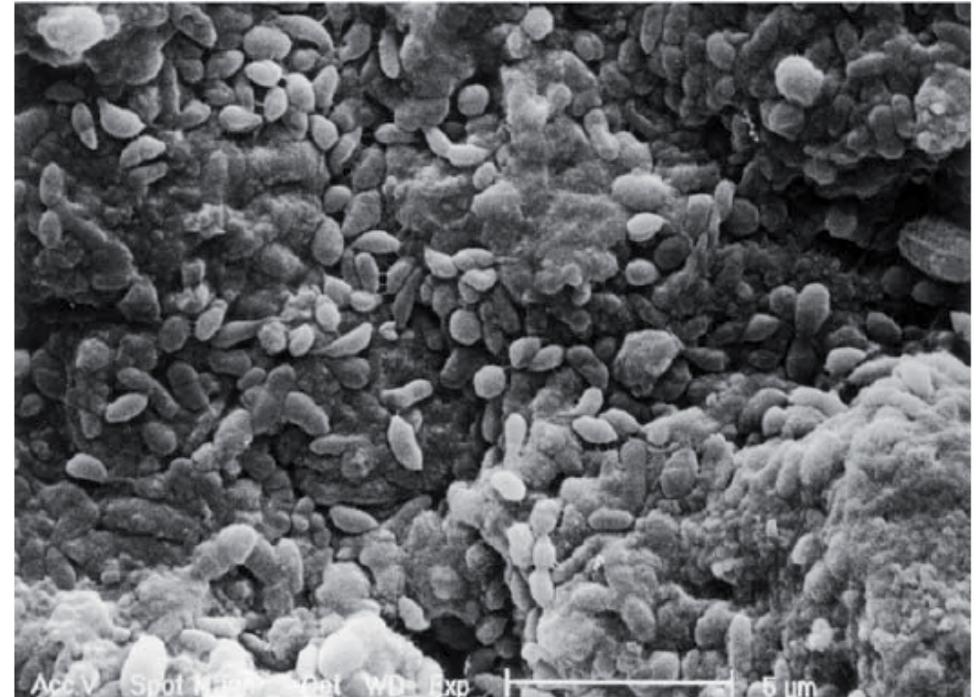
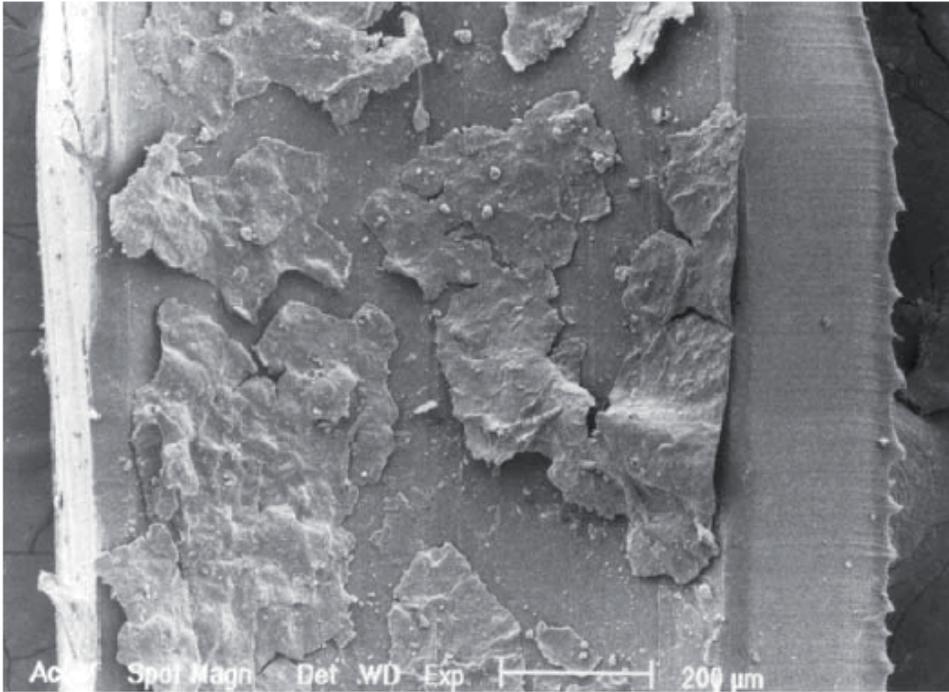
# Endoskope und Infektionen

TABLE 4 Infections associated with endoscopic retrograde cholangiopancreatography<sup>a</sup>

Reference	Microorganism(s)	No. of contaminated patients after endoscopy	No. of infected patients	Infection(s)	Detection of endoscope contamination	Cause(s) of contamination
95	<i>P. aeruginosa</i>	1	1	Cholangitis, sepsis	Yes	Inappropriate cleaning and disinfection (ethanol)
96	<i>P. aeruginosa</i>	14	0	No	Yes	Inappropriate cleaning and disinfection (povidone-iodine/ethanol)
97	<i>P. aeruginosa</i>	7	7	Cholangitis	Yes	Inappropriate cleaning and disinfection (ethanol)
100	<i>P. aeruginosa</i>	1	1	Sepsis	Yes	Contaminated water bottles
53	<i>P. aeruginosa</i>	4	3	Sepsis	Yes	Inappropriate disinfection; rinsing with nonsterile tap water
91	<i>P. aeruginosa</i>	5	5	Cholangitis, sepsis, urinary tract infection	Yes	Inadequate cleaning and disinfection between uses in patients (tap water)
22	<i>P. aeruginosa</i>	10	5	Cholecystitis, liver abscess	Yes	Contaminated AER; inappropriate cleaning and disinfection; drying with no ethanol flushing
328	<i>P. aeruginosa</i>	1	1	Liver abscess	No	Not found; endoscope reprocessing not described
98	<i>P. aeruginosa</i>	2	2	Sepsis	Yes	Inappropriate cleaning and disinfection (cetrimide)
90	<i>P. aeruginosa</i>	7	7	Bacteremia/sepsis, cholangitis, pancreatitis	Yes	Contaminated water bottle; inadequate manual cleaning and disinfection between patients (isopropanol)
99	<i>P. aeruginosa</i>	5	5	Sepsis	Yes	Contaminated water bottle (not disinfected)
23	<i>P. aeruginosa</i>	16	No data	Bacteremia/sepsis, cholangitis, pneumonia	Yes	Contaminated AER (a flaw in design, presence of biofilm); drying with no ethanol flushing
75	<i>P. aeruginosa</i>	25	25	Bacteremia/sepsis	Yes	Failure to disinfect elevator channel in AER; drying with no ethanol flushing
101	<i>P. aeruginosa</i>	5	3	Cholangitis, sepsis	No	Not found; endoscope reprocessing not described
29	<i>P. aeruginosa</i>	3	3	Sepsis	Yes	Contaminated water bottle; inadequate manual cleaning; insufficient disinfectant exposure
2	<i>P. aeruginosa</i>	3	3	Sepsis	Yes	Presence of biofilm in intact endoscope channels
83	<i>Salmonella</i> Oslo	3	2	Gastroenteritis, sepsis	Not tested	Inappropriate cleaning and disinfection (povidone-iodine/ethanol)
141	<i>Serratia marcescens</i>	1	0	No	Yes	Inappropriate cleaning and disinfection (povidone-iodine)
52	<i>M. chelonae</i>	14	0	No	No data	Contaminated AER; inappropriate disinfection; rinsing with tap water; lack of drying procedure
147	<i>Methylobacterium mesophilicum</i>	1	1	Bacteremia	Yes	Contaminated endoscope channels
144	ESBL-producing <i>K. pneumoniae</i>	16	12	Bacteremia/sepsis, cholangitis	Yes	Contaminated endoscope channels; insufficient drying procedure
145	KPC-producing <i>K. pneumoniae</i>	7	2	Bacteremia	Yes	Contaminated endoscope channels; insufficient drying procedure
184	HCV	1	1	HCV infection	Not tested	Inadequate disinfection (low concn, insufficient exposure); failure to perfuse

<sup>a</sup> AER, automated endoscope reprocessor; ESBL, extended-spectrum  $\beta$ -lactamase; KPC, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase.

# Biofilm in Endoskopkanälen



REM-Aufnahmen zweier unterschiedlicher Luft-/Wasserkanäle mit Biofilm:

(a) Konfluente Schmutz-Biofilm-Schicht (niedrige Auflösung).

(b) Mehrlagiger Biofilm bestehend aus gesund erscheinenden Zellen umgeben und überlagert von amorph erscheinender EPS (hohe Auflösung)

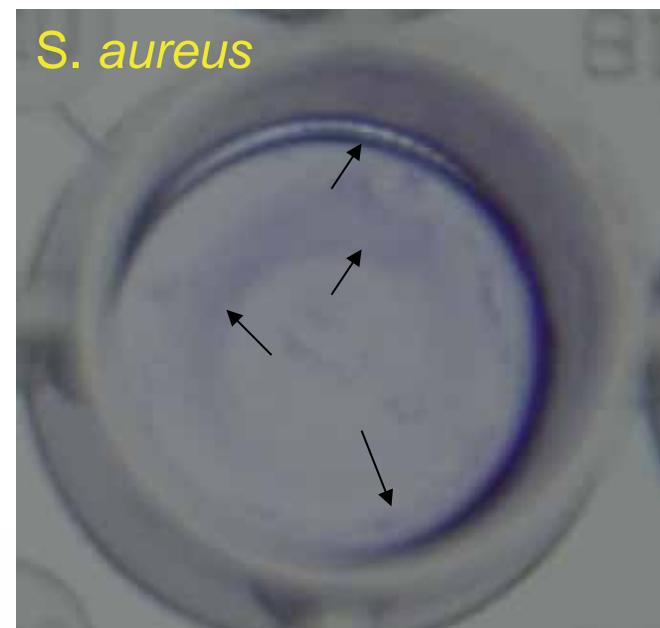
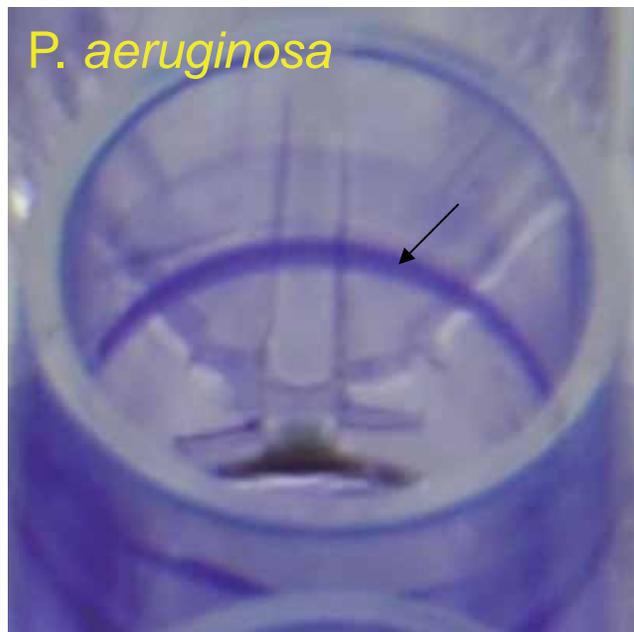
Pajkos et al. 2004

# Reinigungsmodelle

1. Screening-Methoden zum Austesten einer grösseren Anzahl von Formulierungen und Parameter sowie unterschiedlicher Nachweismethoden  
→ Mikrotiterplatten
2. Aufwändigere Methoden näher bei der realen Anwendung  
→ Fließzelle  
→ Endoskopkanäle (EN ISO TS 15883-5)

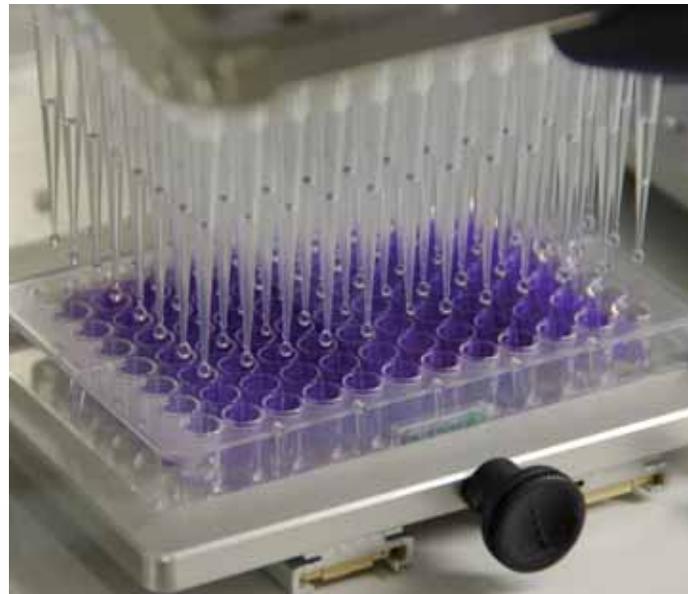
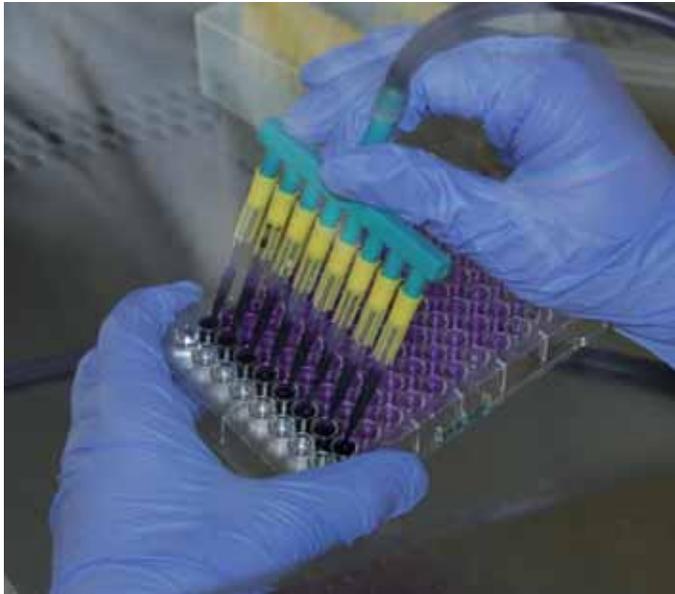
# Biofilme in Mikrotiterplatten

- 96-well Polystyrol-Mikrotiterplatten mit flachem Boden
- Aufzucht Biofilm: Vorkultur verdünnen auf 0.2 OD in 30% TSB + 0.25% Glucose. 200  $\mu$ L / well inkubieren bei 33 °C unter Schütteln bei 40 rpm während 24 Stunden.
- Erscheinungsbild Biofilm (Crystal Violet Färbung):



# Vorgehen Reinigungsexp. MT-P

- Absaugen des Mediums
- 1 x waschen mit 300  L 0.9% NaCl
- Zugabe von 300  L Reinigerlösung (1% in WSH)
- 40 min Inkubation bei 25 °C ohne Schütteln
- Reinigerlösung absaugen
- 3 x waschen mit 300  L 0.9% NaCl
- Anwendung einer Nachweismethode



# Potentielle Nachweismethoden

- Gesamte Biomasse (Bakterien und EPS)
  - Crystal Violet (CV)
  - Safranin Red
  - Congo Red
- Gesamte Bakterien (lebende und tote)
  - SYTO 9
  - Acridine Orange
- Lebende Bakterien
  - SYTO 9 / Propidium Iodide
  - BacTiter-Glo™ assay (ATP)
  - Turbidity Threshold (vermehrungsfähige)
- Protein
  - CBQCA
  - NanoOrange
  - SYPRO Ruby
  - FITC
- Polysaccharide
  - Calcofluor White
  - ConA-FITC
  - Dubois

# Methoden - Vor- und Nachteile

In der Mikrotiterplatte

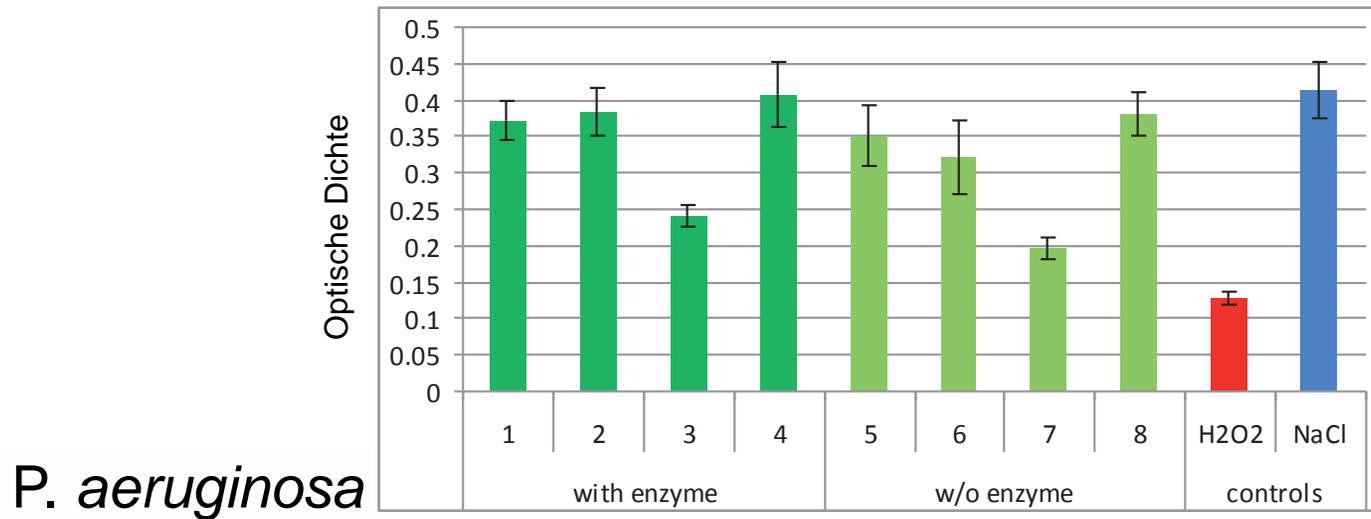
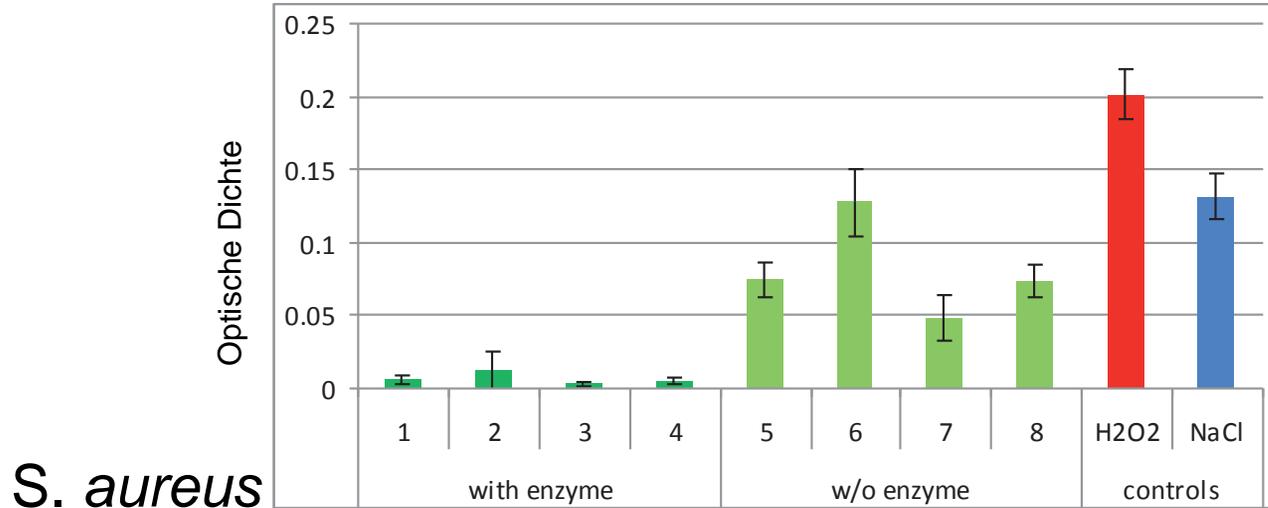
Methoden	Vorteile	Nachteile
Crystal Violet	Hohes Signal bei rel. niedriger STABW.	Rel. hohe Detektionsgrenze.
Safranin Red	Ähnlich Cristal Violet,	jedoch schwaches Signal.
Congo Red		Sehr schwaches Signal
Syto 9	OK bei <i>S. aureus</i> ,	jedoch rel. hohe STABW. Färbt tote <i>P. aeruginosa</i> überproportional.
Acridin Orange	Rel. niedrige Detektionsgrenze und STABW.	Färbt behandelte Zellen stärker.
Syto 9 / PI	OK bei <i>S. aureus</i> ,	jedoch rel. hohe STABW. Färbt tote <i>P. aeruginosa</i> überproportional.
BacTiter-Glo™	Sehr sensitiv. Hoher dynamischer Range.	Sehr teuer.
Turbidity Threshold	Hoher dynamischer Range. Nicht teuer.	Nicht für kleine Unterschiede. 1 MT-Platte / 12 h.
SYPRO Ruby		Zuviel Signal bei den Kontrollen. Färbt MT-Platten.
FITC	Funktioniert,	jedoch hohe Detektionsgrenze und STABW.
Nano Orange		Einfluss Reinigungsmittel.
CBQCA		Einfluss Reinigungsmittel.
Calcofluor White		Zuviel Signal bei den Kontrollen. Färbt MT-Platten.
ConA-FITC		Zuviel Signal bei den Kontrollen. Färbt MT-Platten.
Dubois		Nicht sensitiv genug im MT-Assay

# Nachweismethoden / Aussagen

- Crystal Violet  
Färbung gesamte Biomasse (Bakterien und EPS)  
→ Biofilmbereicherung ohne Differenzierung EPS/Bakterien.
- BacTiter-Glo™  
Differenzielle Färbung lebender Bakterien  
→ Bakterienreduktion und –abtötung ohne Differenzierung.
- Turbidity Threshold  
Bakterienwachstum ( $OD_{595}$ )  
→ Bakterienreduktion und –abtötung ohne Differenzierung.

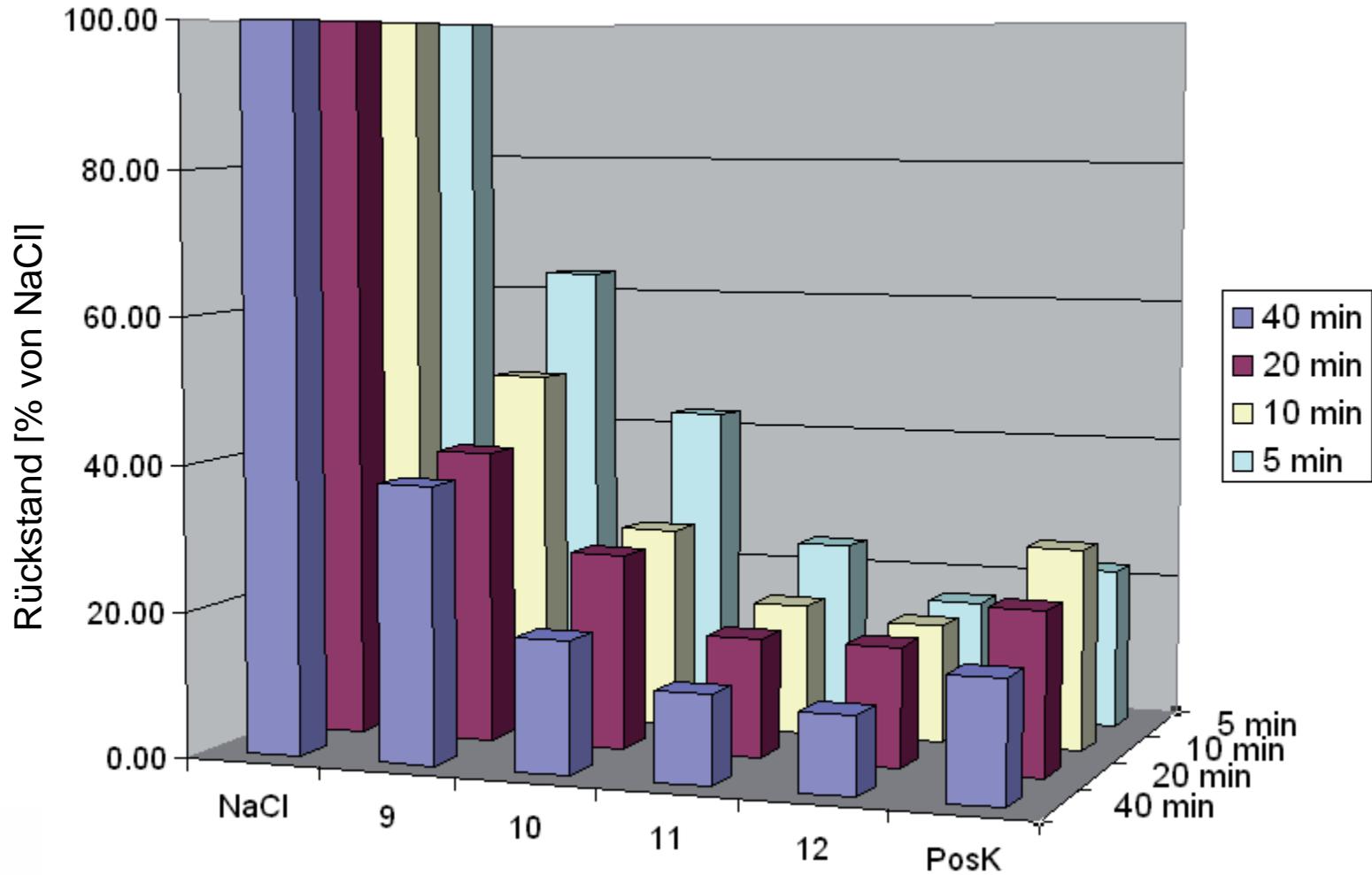
# *P. aeruginosa* / *S. aureus*

Crystal Violet (CV) Färbung



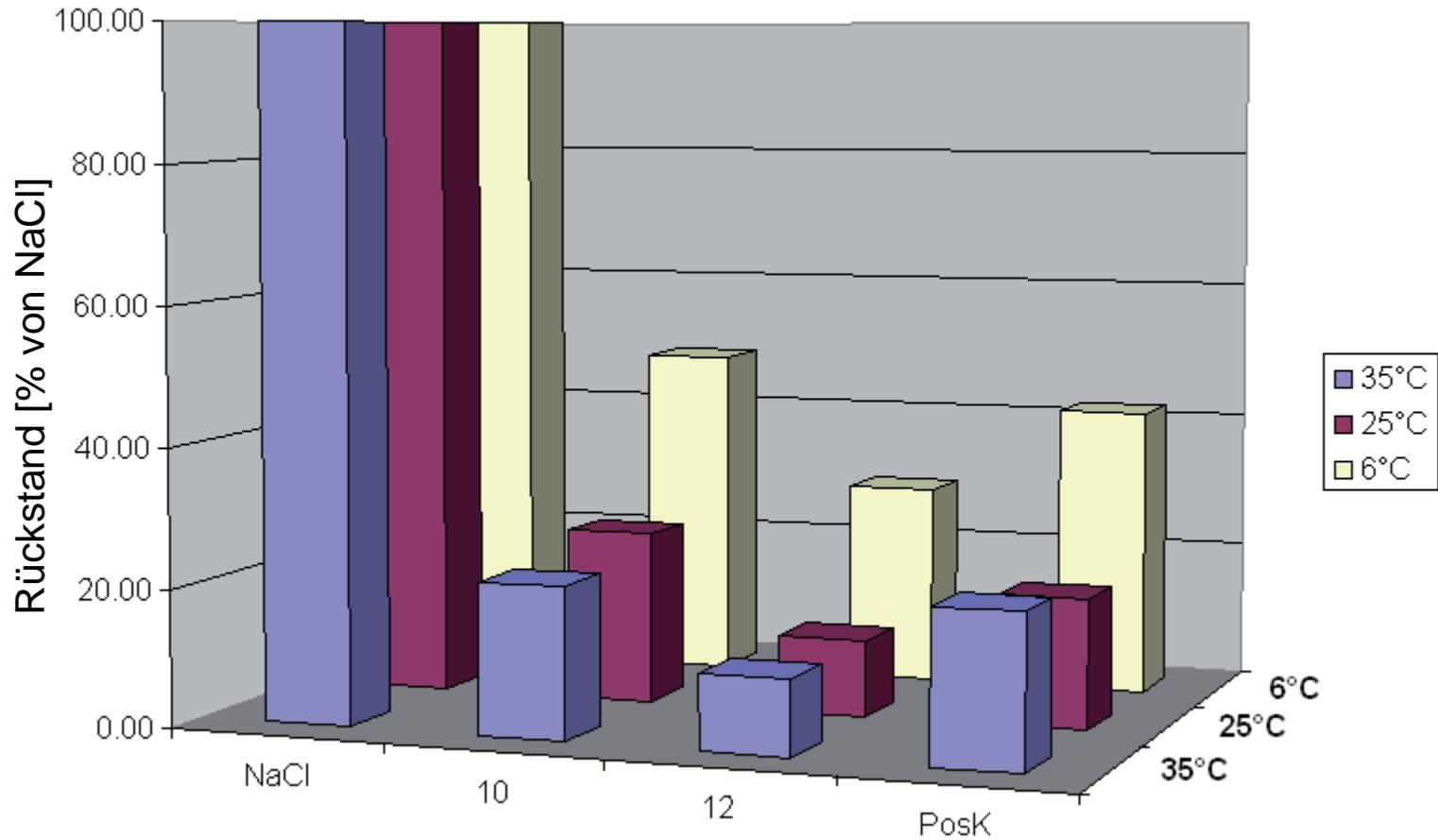
# Inkubationszeit

*P. aeruginosa* (CV-Färbung)

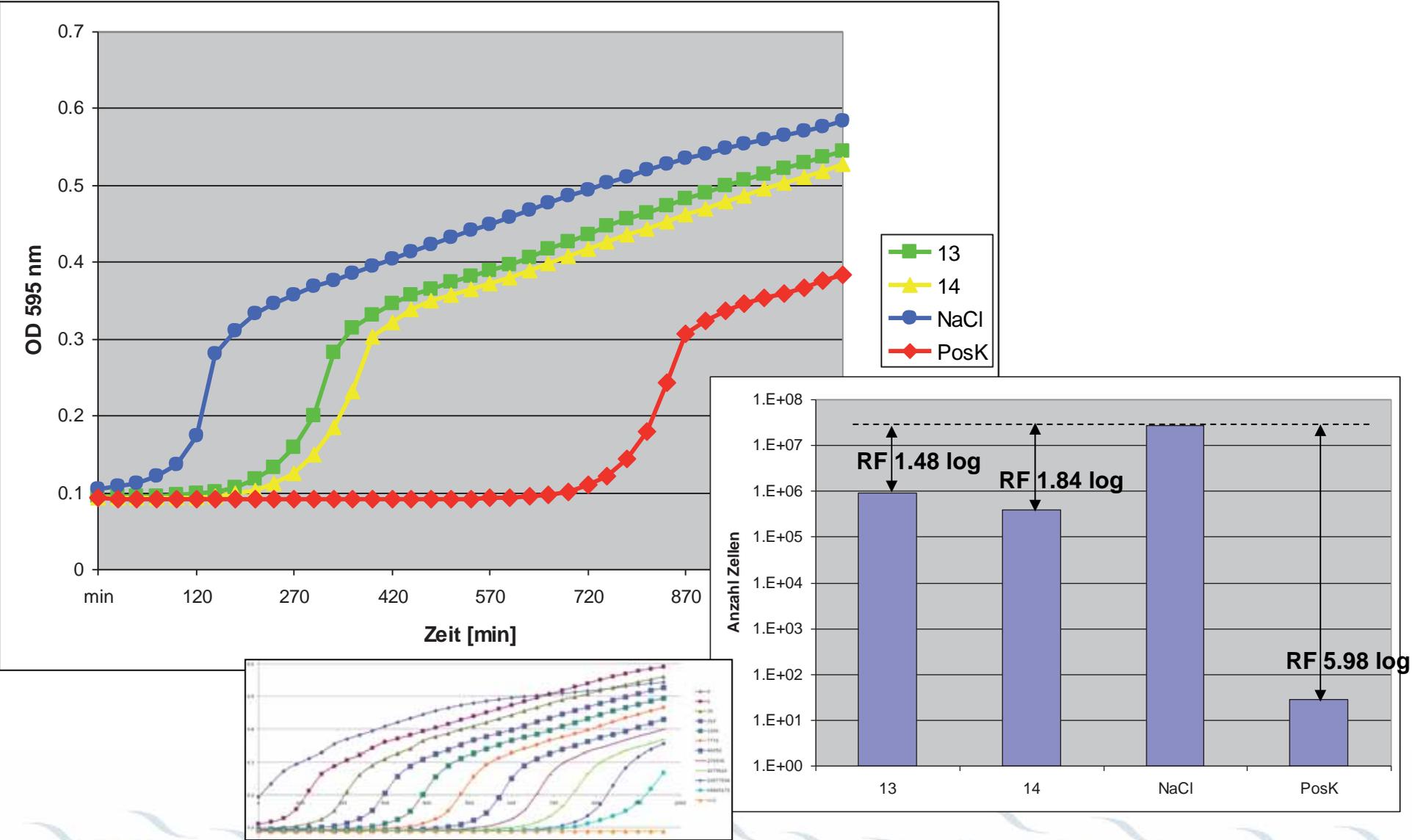


# Inkubationstemperatur

*P. aeruginosa* (CV-Färbung)



# Wachstum (Turbidity Threshold)

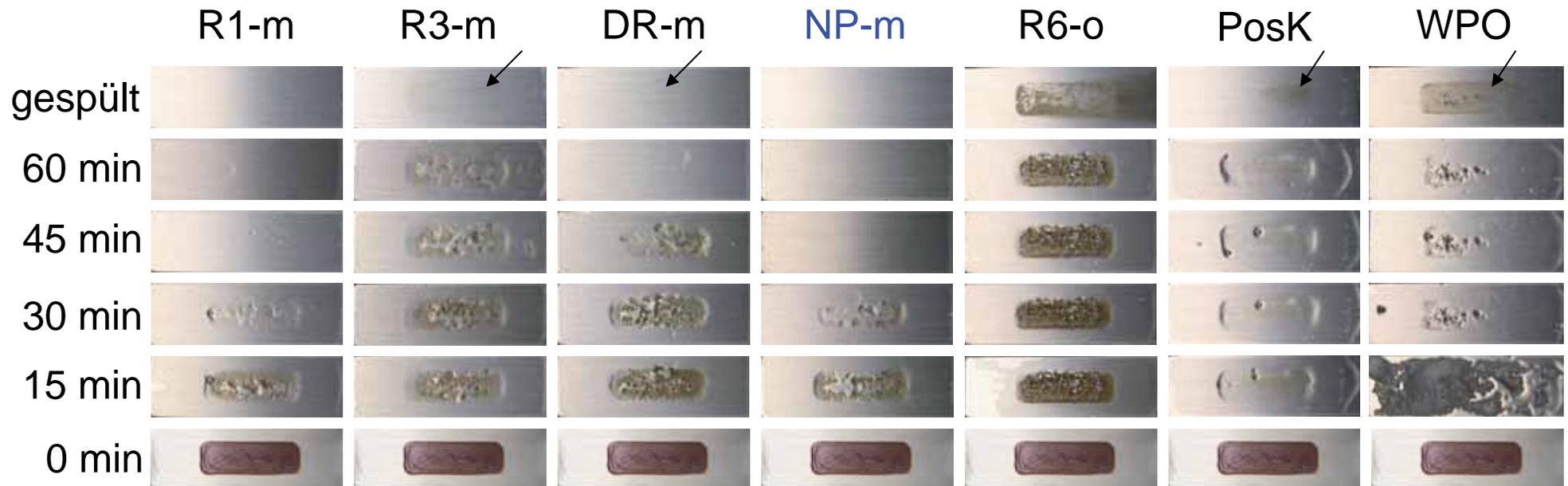


# Produkte im Test

Code	Enzyme	Auslobung
R1-m	mit	Entfernt zuverlässig Rückstände wie <b>angetrocknetes und denaturiertes Blut</b> , Fette und Sekrete. Bewirkt eine starke Abreicherung organischen Materials und verhindert die Redeposition von Proteinrückständen. Entfernt <b>Biofilme</b> .
R2-m	mit	Ein besonderer Pluspunkt ist das <b>hervorragende Ablöseverhalten von Sekret/Schleim</b> . Hinzu kommt die zuverlässige und gleichzeitig schonende Ablösung hartnäckiger, auch angetrockneter Reste von Blut, Eiweiss, Sekreten, Fett und <b>Biofilm</b> .
R3-m	mit	Geprüfter Effekt gegen <b>Biofilm</b> . Entfernt alle Typen von Verschmutzungen sowohl in weichem als auch in hartem Wasser. <b>Herausragende bakteriostatische and fungistatische Wirkung</b> .
R4-m	mit	<b>Biofilm</b> -entfernendes enzymatisches Reinigungsmittel.
DR-m	mit	Enzymbasierter Hochleistungsreiniger mit <b>desinfizierender Basiswirkung</b> zur Reinigung von Endoskopen und chirurgischen Instrumenten.
NP-m	mit	(Neuer enzymatischer Reiniger)
R5-o	ohne	Reinigungssystem zur <b>selbsttätigen</b> , schonenden Ablösung hartnäckiger Kontaminationen inklusive <b>Biofilm</b> .
R6-o	ohne	<b>Biofilm</b> -Entferner. Bricht die Oberflächen-Adhäsion – bewirkt dass der <b>Biofilm</b> zurückgeschält wird und in sich zusammenfällt. Löst die komplexen Kohlehydrate – EPS auf. Hat in Tests durch Institute Reinigungswirksamkeit gezeigt. Simulierte Verschmutzungstests haben gezeigt, dass das Produkt <b>der weltweit wirksamste Medizinproduktereiniger</b> ist.
NaCl		Negativkontrolle (0.9% NaCl)
PosK		Positivkontrolle (je 1% (w/w) NaOH, NaOCl (13% Aktivchlor → Endkonz. = 0.13%), SDS, EDTA)
WPO		Wasserstoffperoxid (ca. 6% Aktivsauerstoff)
1,2...		Experimentalformulierungen

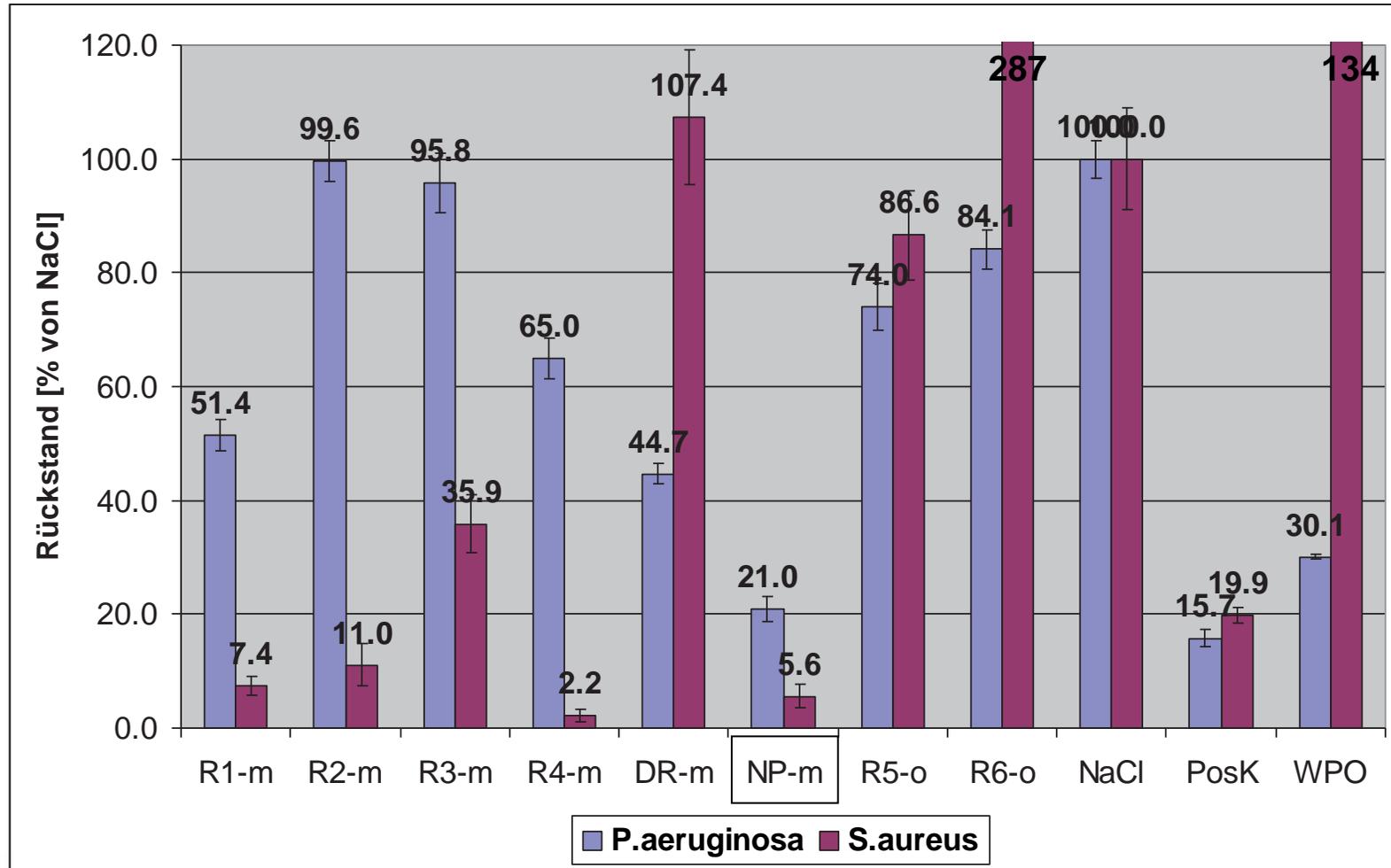
# TOSI-Reinigung

1% in Stadtwasser von ca. 16°d bei RT (ca. 22°C)



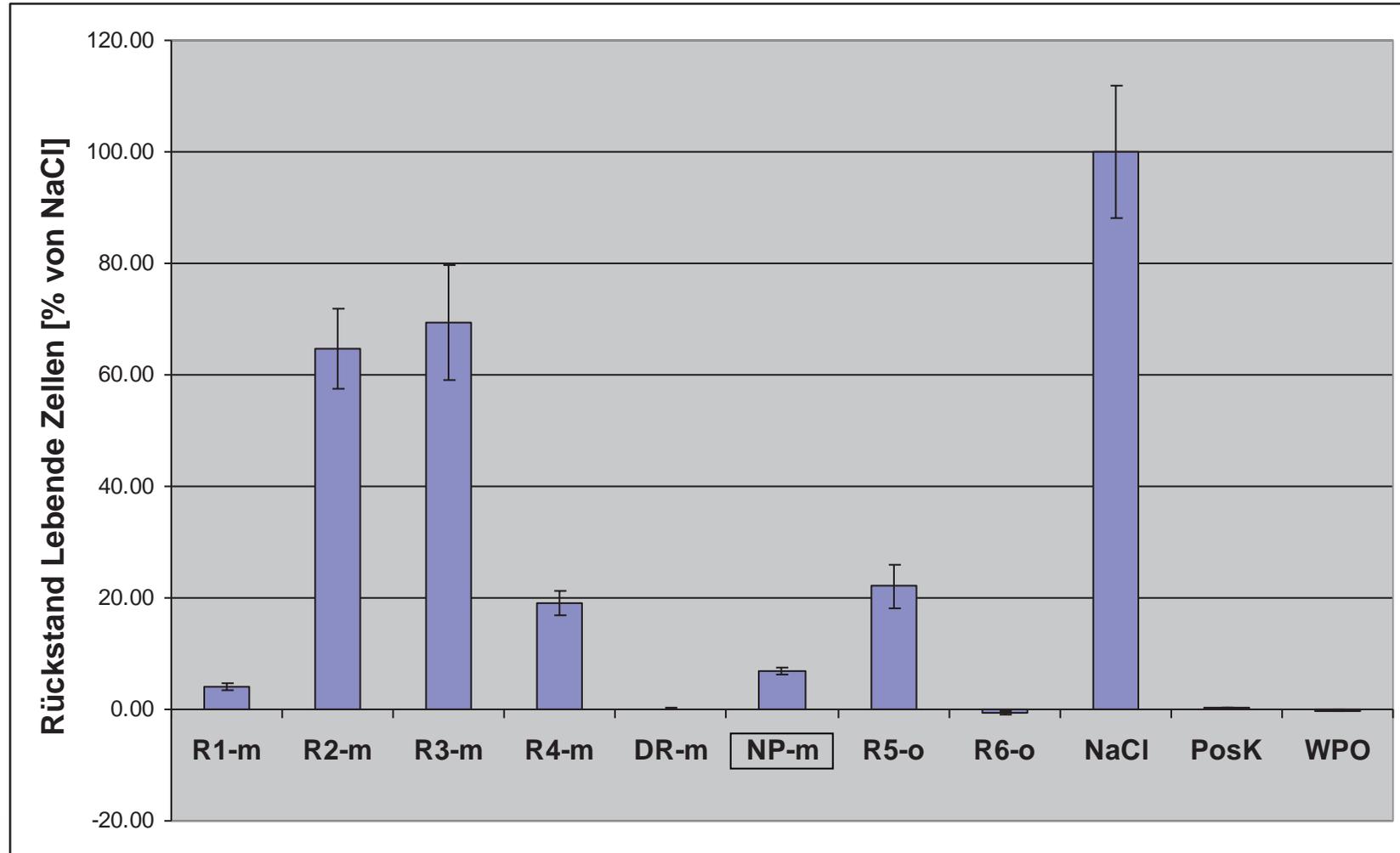
# *P. aeruginosa* vs. *S. aureus*

Mikrotiterplatte, Biofilmreduktion 40 min statisch, CV-Färbung

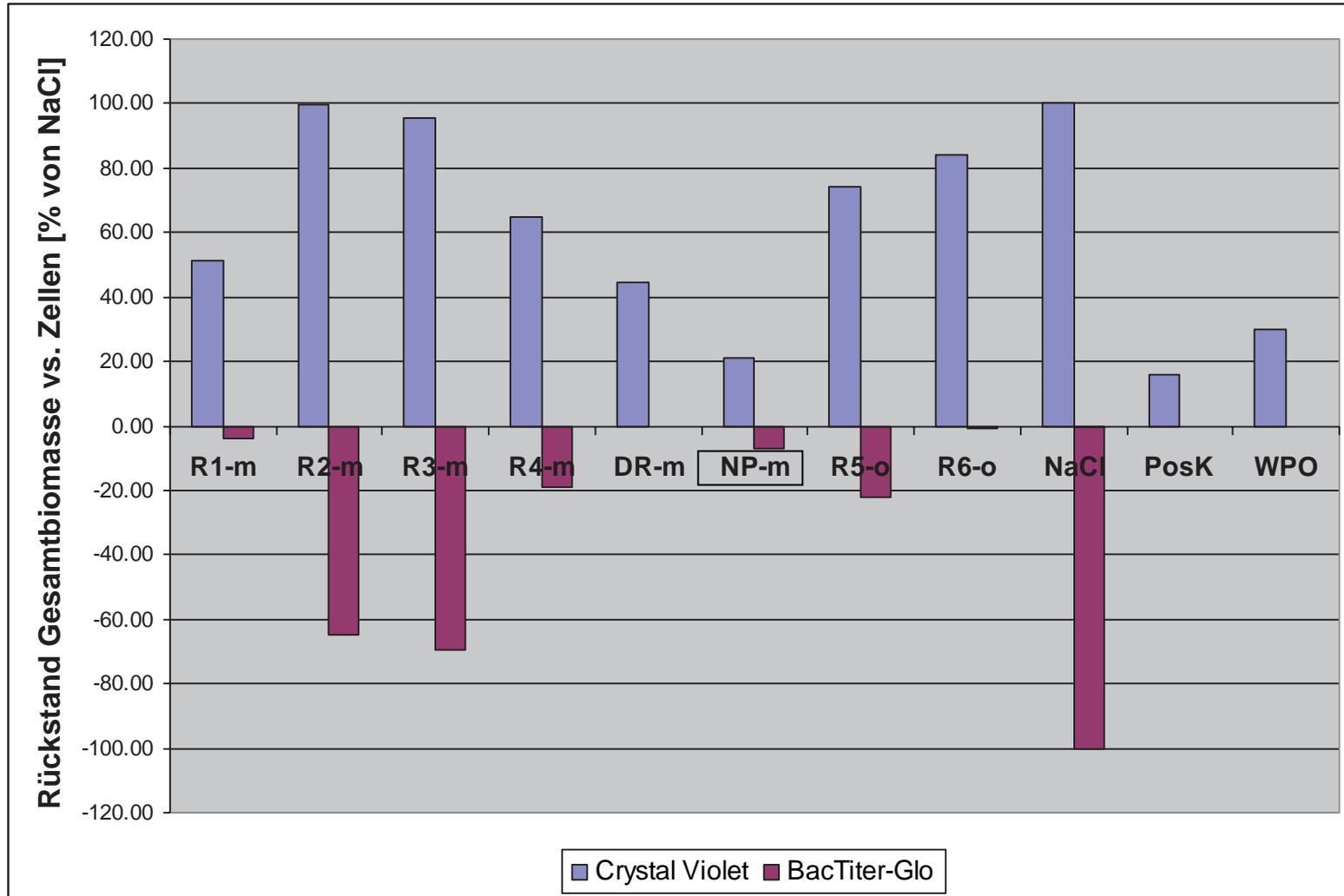


# Lebende Zellen (*P. aeruginosa*)

Mikrotiterplatte, 40 min statisch, BacTiter-Glo™



# Reduktion Biofilm / lebende Zellen

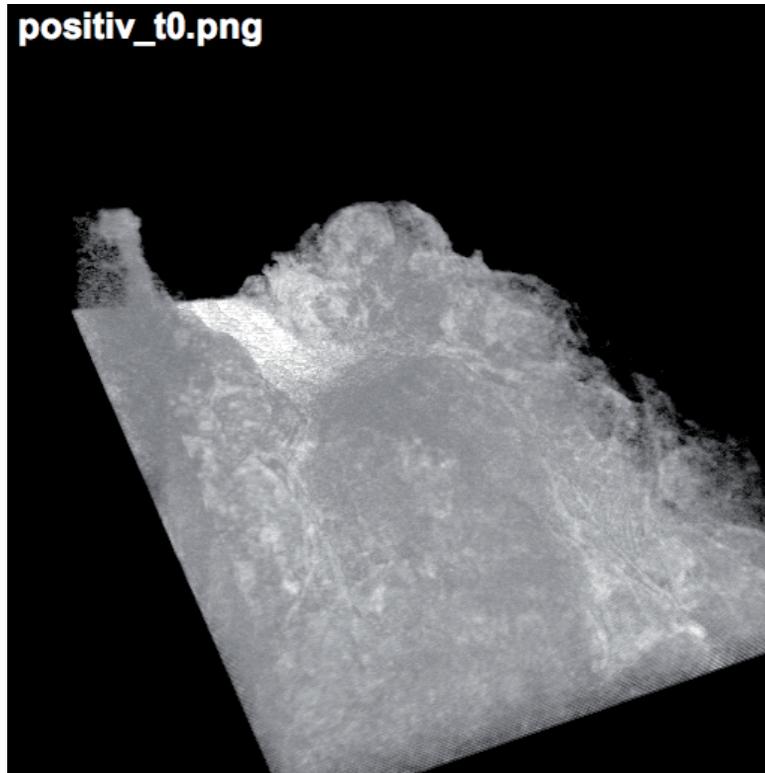


# Fließzelle mit OCT-Visualisierung

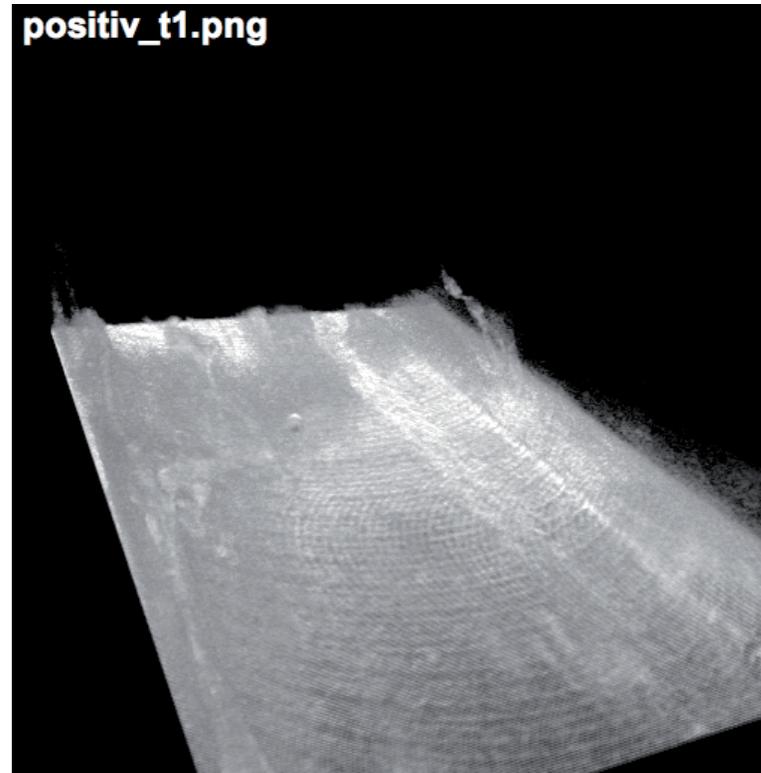
OCT = Optische Kohärenztomographie, ein Untersuchungsverfahren, bei dem Licht geringer Kohärenzlänge mit Hilfe eines Interferometers zur Entfernungsmessung streuender Materialien eingesetzt wird. Das Untersuchungsobjekt wird punktwise abgetastet. Haupteinsatzgebiet ist die Medizin (Wikipedia).

- Miniaturisierte Fließzelle 120x2x1 mm (LxBxH)
- Heterothropher Abwasserbiofilm (Quelle: Belebtschlammüberstand) 24h im Fed-Batch Betrieb gezüchtet.
- Gespült mit 0.9% NaCl
- Reinigungsversuche im Durchflussbetrieb (16 ml/min)
- NP-m und PosK getestet

# OCT-Visualisierung



Vor



Nach 10 min Behandlung mit PosK  
(NaOH, NaOCl, EDTA, SDS je 1%)

3D-Aufnahmen  
(3x2x1 mm) nach  
NaCl-Spülung

Zeitaufgelöste Aufnahme von 2D-Schnitten (xz-Ebenen)  
entlang der Fließrichtung (x-Richtung)



# Endoskop-Dummy Test

EN ISO/TS 15883-5:2005 Anhang F

- 2 m Endoskopkanal  4 mm füllen mit 10 ml *P. aeruginosa*-Übernacht-Kultur.
- Biofilmanzucht während 72 h / 30°C. Rezirkulation  (40 mL/min) mit definierter Zugabe von Wachstumsmedium.
- Schlauch mit 0.9% NaCl während 1 min bei 20 ml/min spülen
- Verwendung von 30 cm langen Stücken für die Reinigungsversuche statisch oder mit Durchfluss 200 ml/min bzw. 4 ml/min (Desinfektion)
- Analyse OD<sub>595nm</sub>, KBE, Zucker-Nachweis nach Dubois, Proteinnachweis nach Lowry

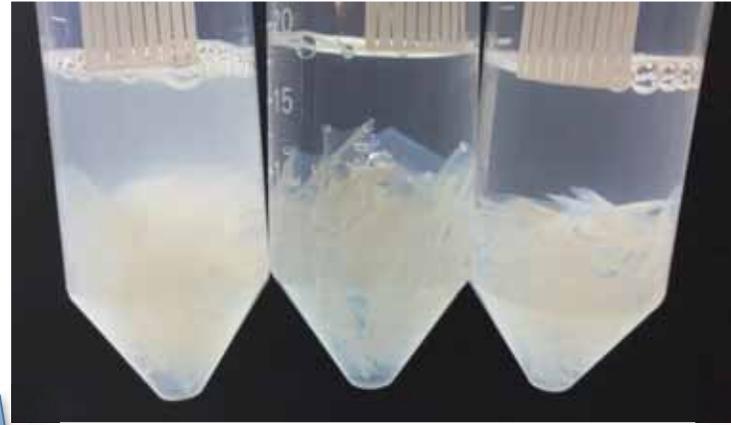
# Reinigung - Experimentelles Setup



- |               |   |                 |   |               |   |                     |   |               |   |                  |   |                 |
|---------------|---|-----------------|---|---------------|---|---------------------|---|---------------|---|------------------|---|-----------------|
| <b>Spülen</b> | ➔ | <b>Reinigen</b> | ➔ | <b>Spülen</b> | ➔ | <b>Desinfektion</b> | ➔ | <b>Spülen</b> | ➔ | <b>Schneiden</b> | ➔ | <b>Vortexen</b> |
| - 0.9% NaCl   |   | - 1% Reiniger   |   | - 0.9% NaCl   |   | - deconex®          |   | - 0.9% NaCl   |   | - Längs          |   | - 5min          |
| - 20ml/min    |   | - Kontr.: WSH   |   | - 20ml/min    |   | HLD PA / PA20       |   | - 20ml/min    |   | halbieren        |   |                 |
| - 1min        |   | - 200ml/min     |   | - 1min        |   | - 4ml/min           |   | - 1min        |   | - 5mm Stücke     |   |                 |
|               |   | - 5 / 15 min    |   |               |   | - 15min             |   |               |   |                  |   |                 |

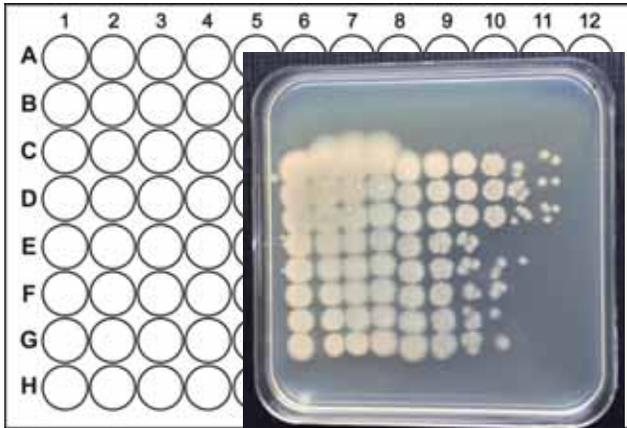
Ohne Desinfektion

# Analysen

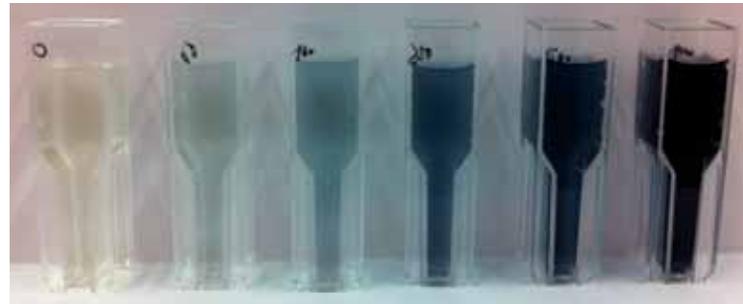


Verdünnungsreihen  
(Bakterien)

Sample 150µl  
30µl 120µl  
30µl 120µl  
30µl 120µl ...



Lowry Methode (Proteine)

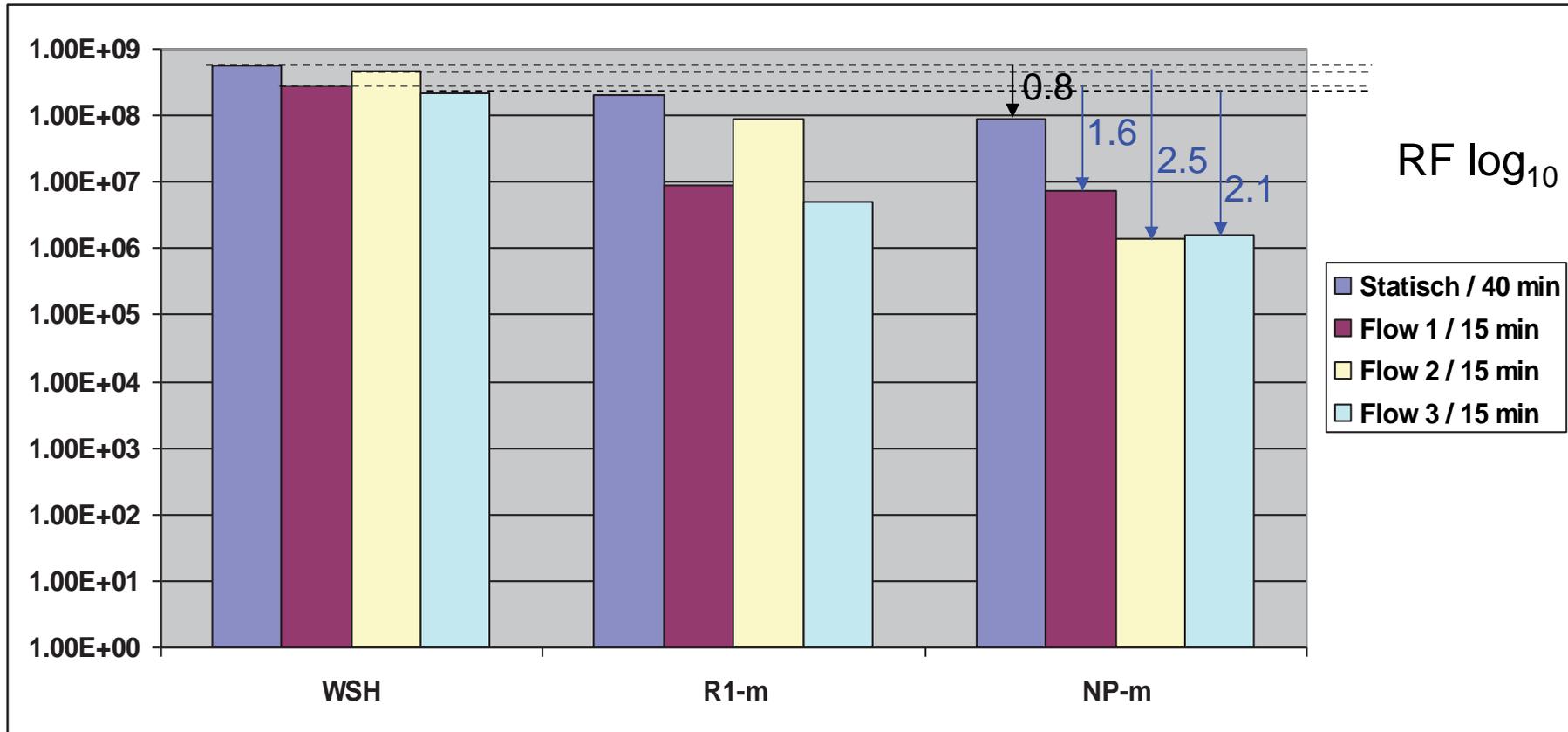


Dubois Methode  
(Zucker)



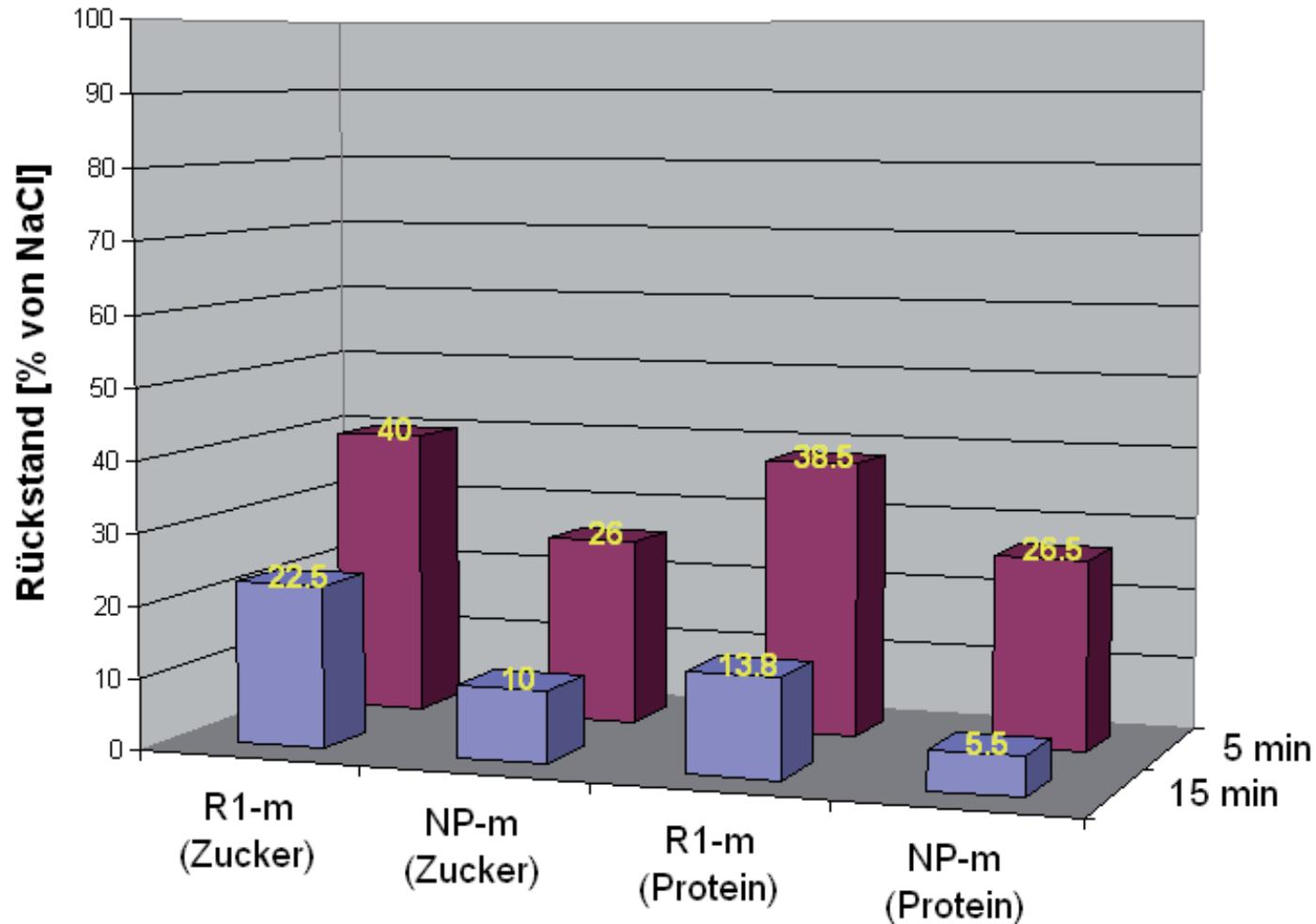
# Reinigung statisch vs. Durchfluss

Bakterienreduktion: statisch = ohne Pumpe; Flow 1, 2, 3 = Pumpe mit 200 mL/min



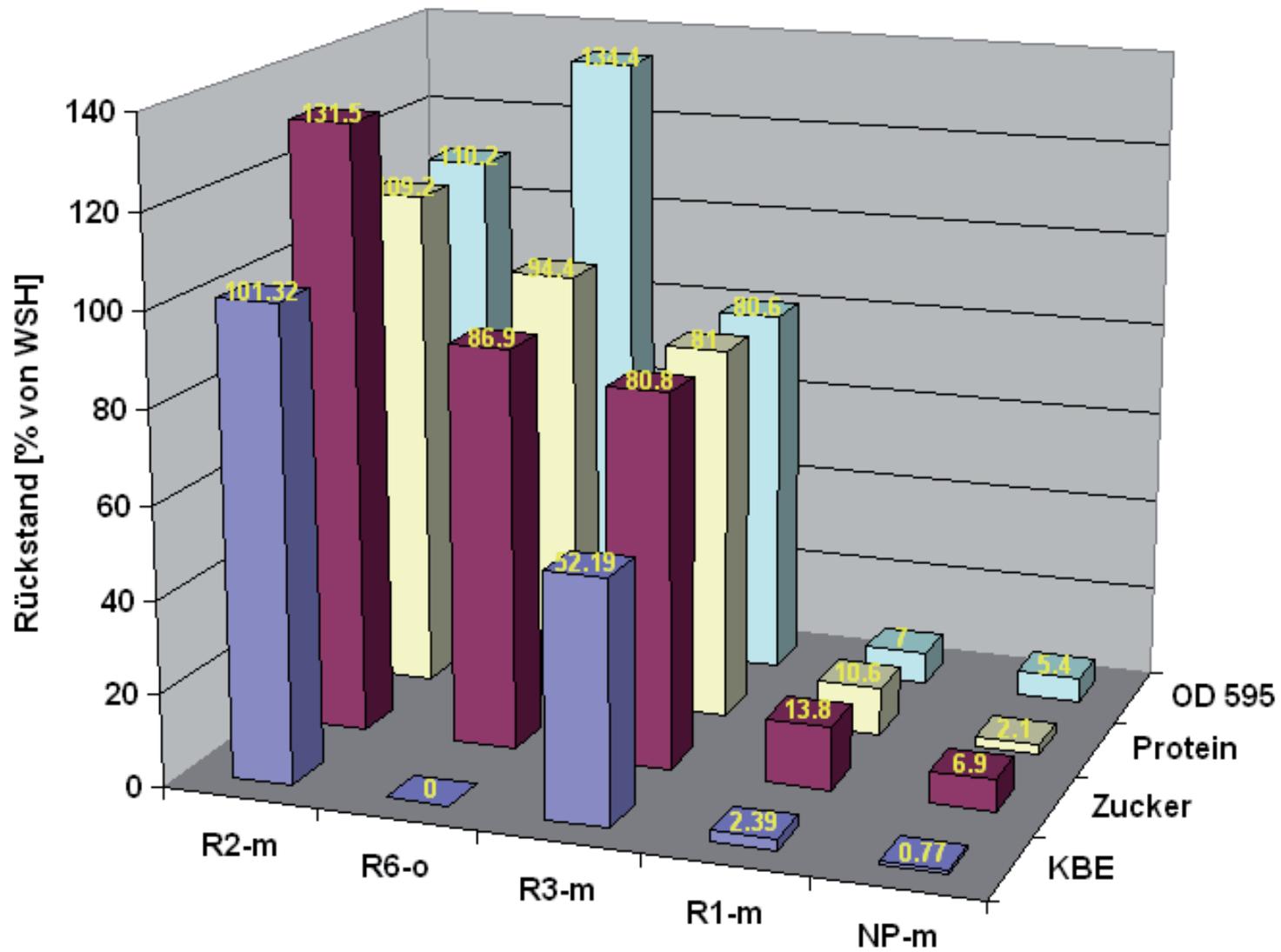
# Reinigung im Durchfluss: Dauer

Reduktion Protein, Zucker: 5, 15 min, 200 mL/min



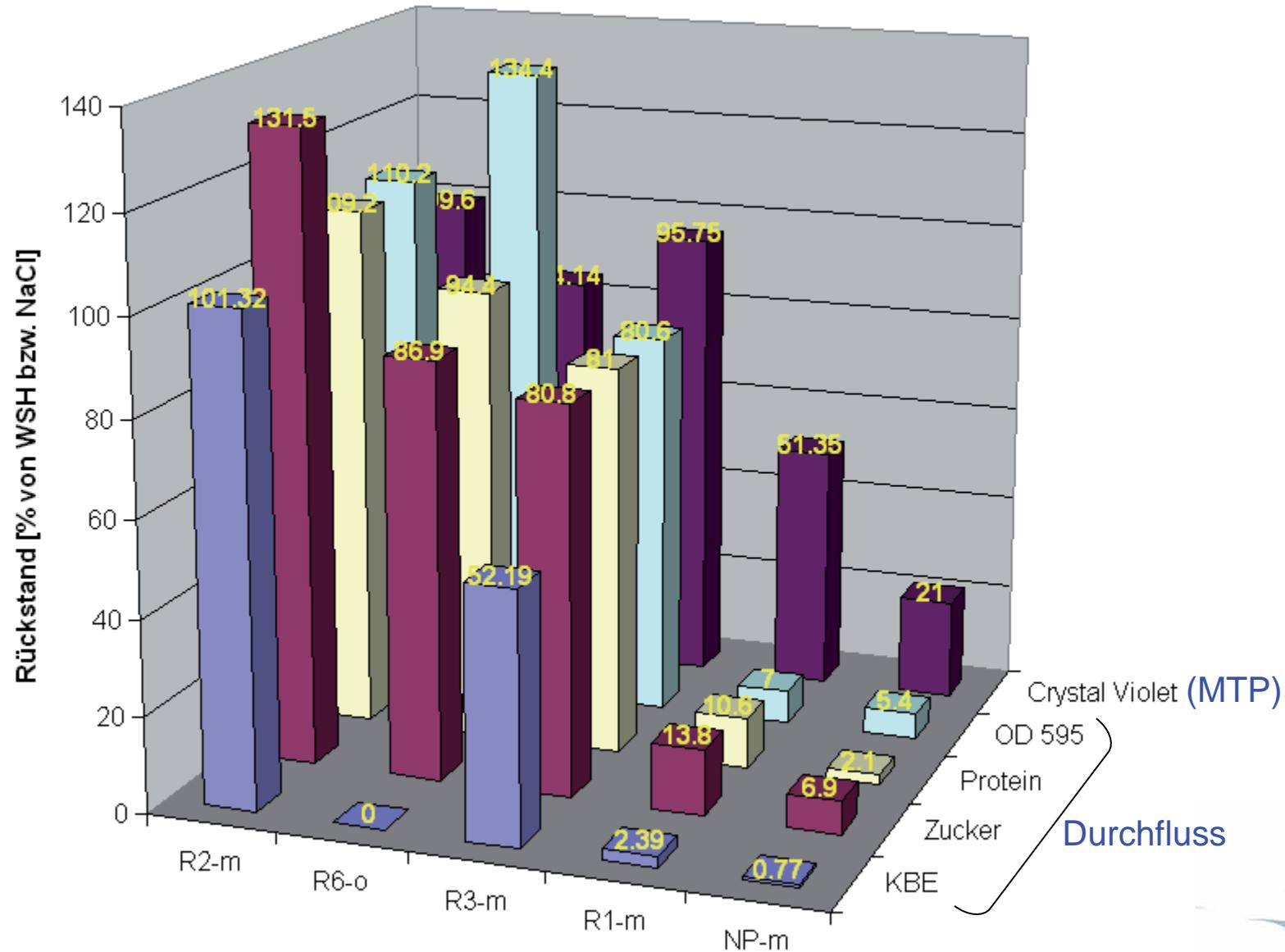
NP-m erfüllt  
Anforderung von EN  
ISO/TS 15883-5:2005  
Anhang F

# Reinigung im Durchfluss 15 min



# Vergleich mit CV-Färbung

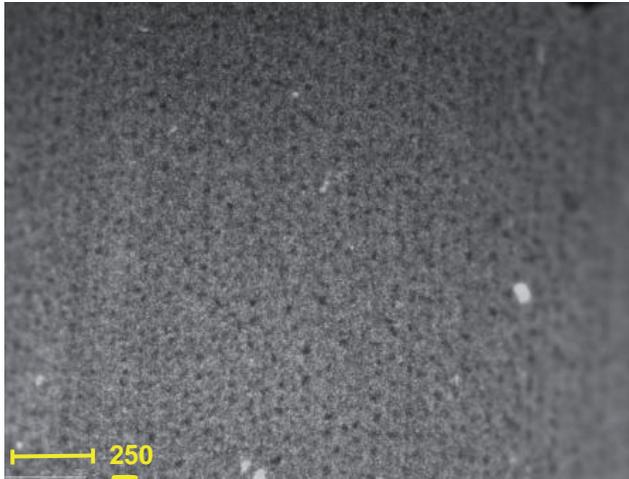
CV-Färbung in Mikrotiterplatten (statisch)



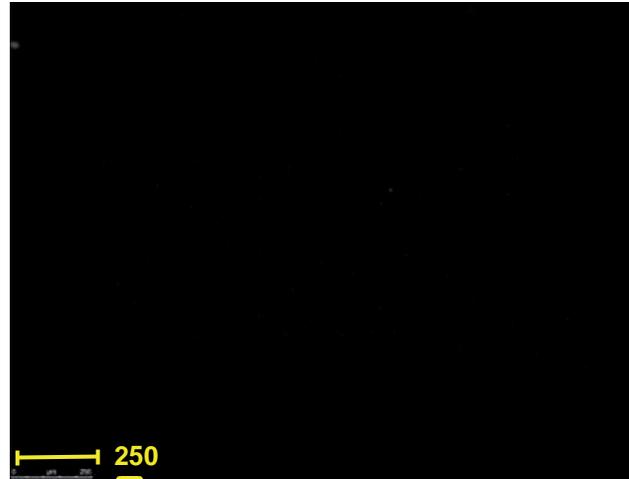
# Rest-Biofilm im Mikroskop 4x

CYTO 9-Färbung (Nukleinsäuren)

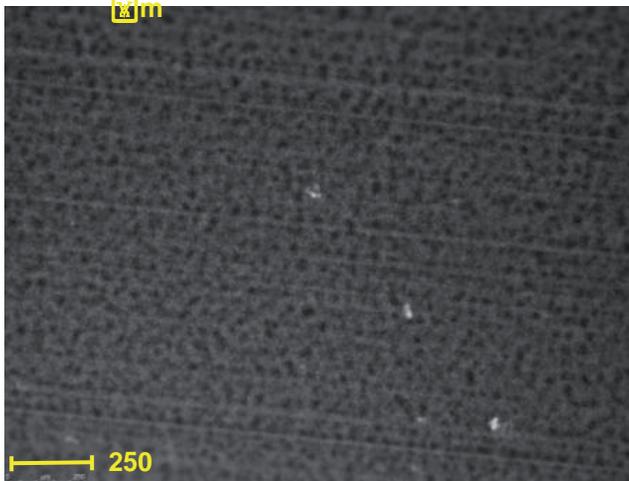
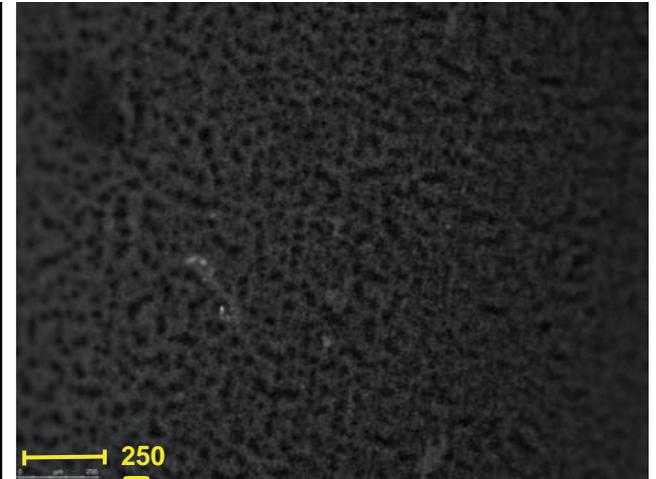
WSH



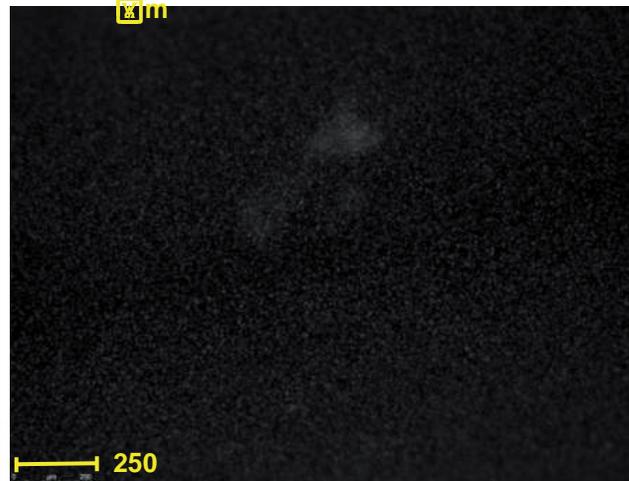
NP-m



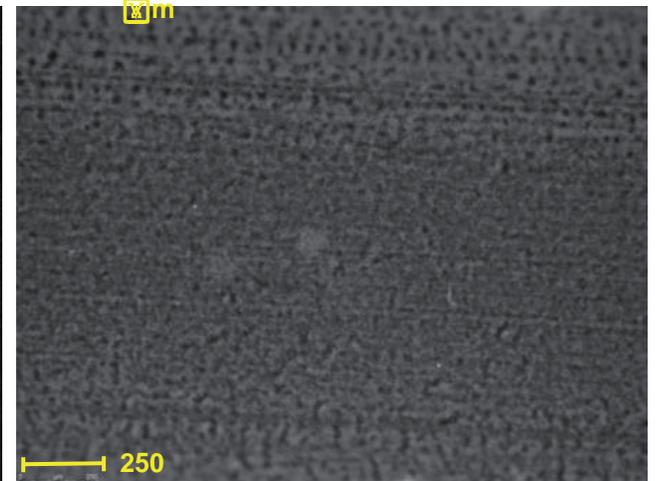
R2-m



R3-m



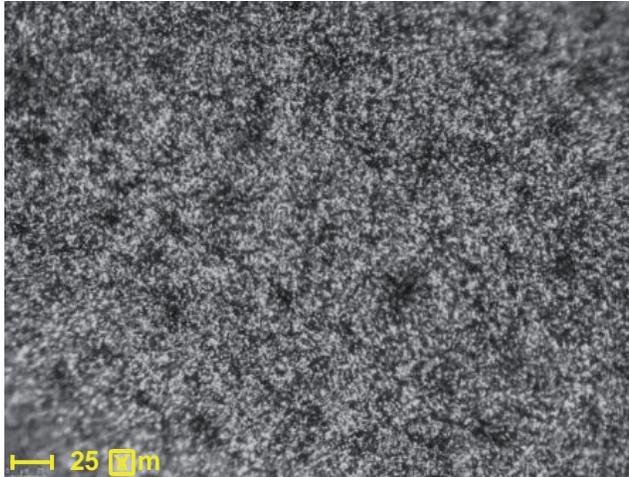
R1-m



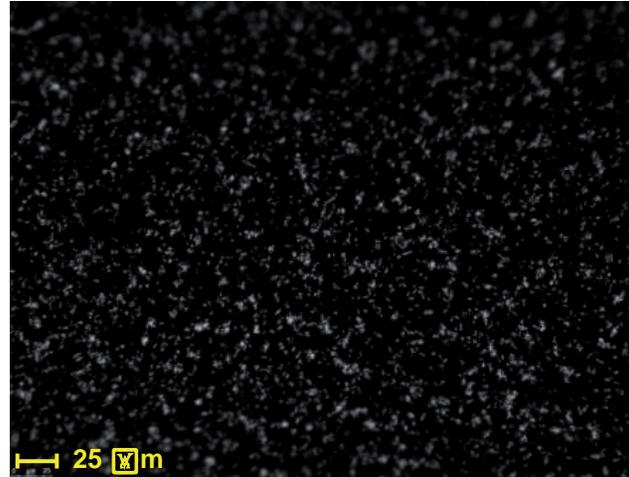
R6-o

# Rest-Biofilm im Mikroskop 20x

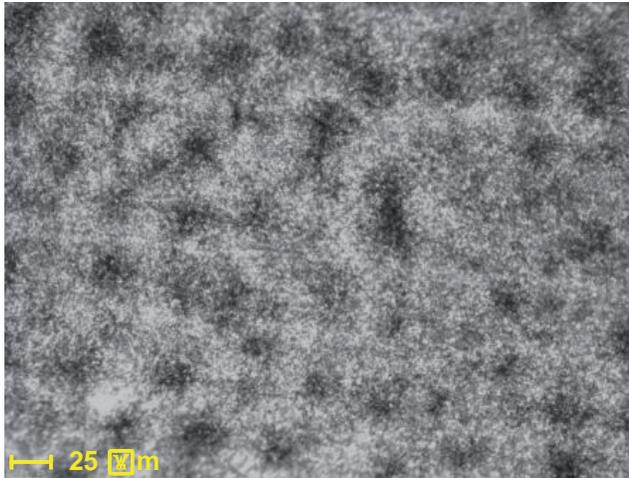
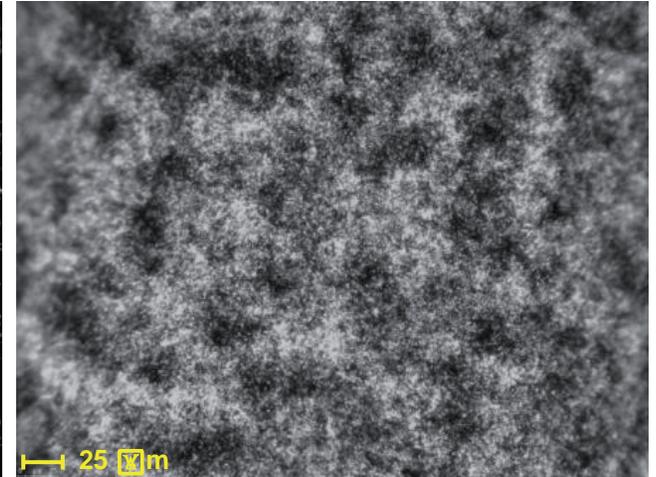
WSH



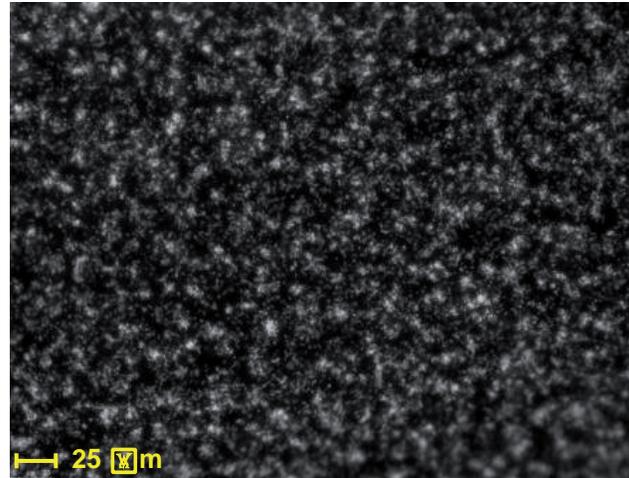
NP-m



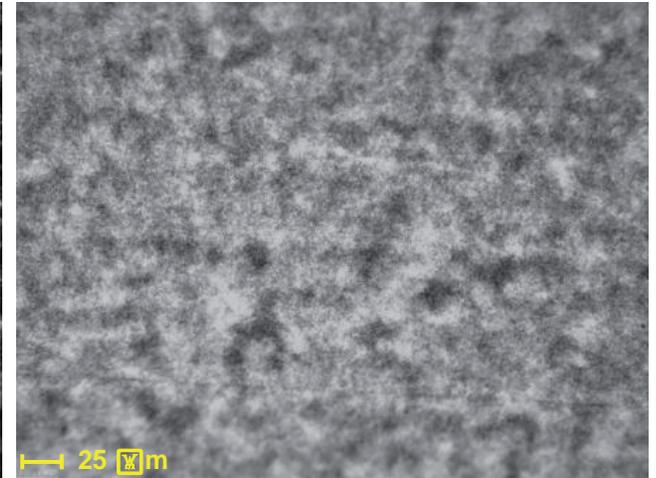
R2-m



R3-m



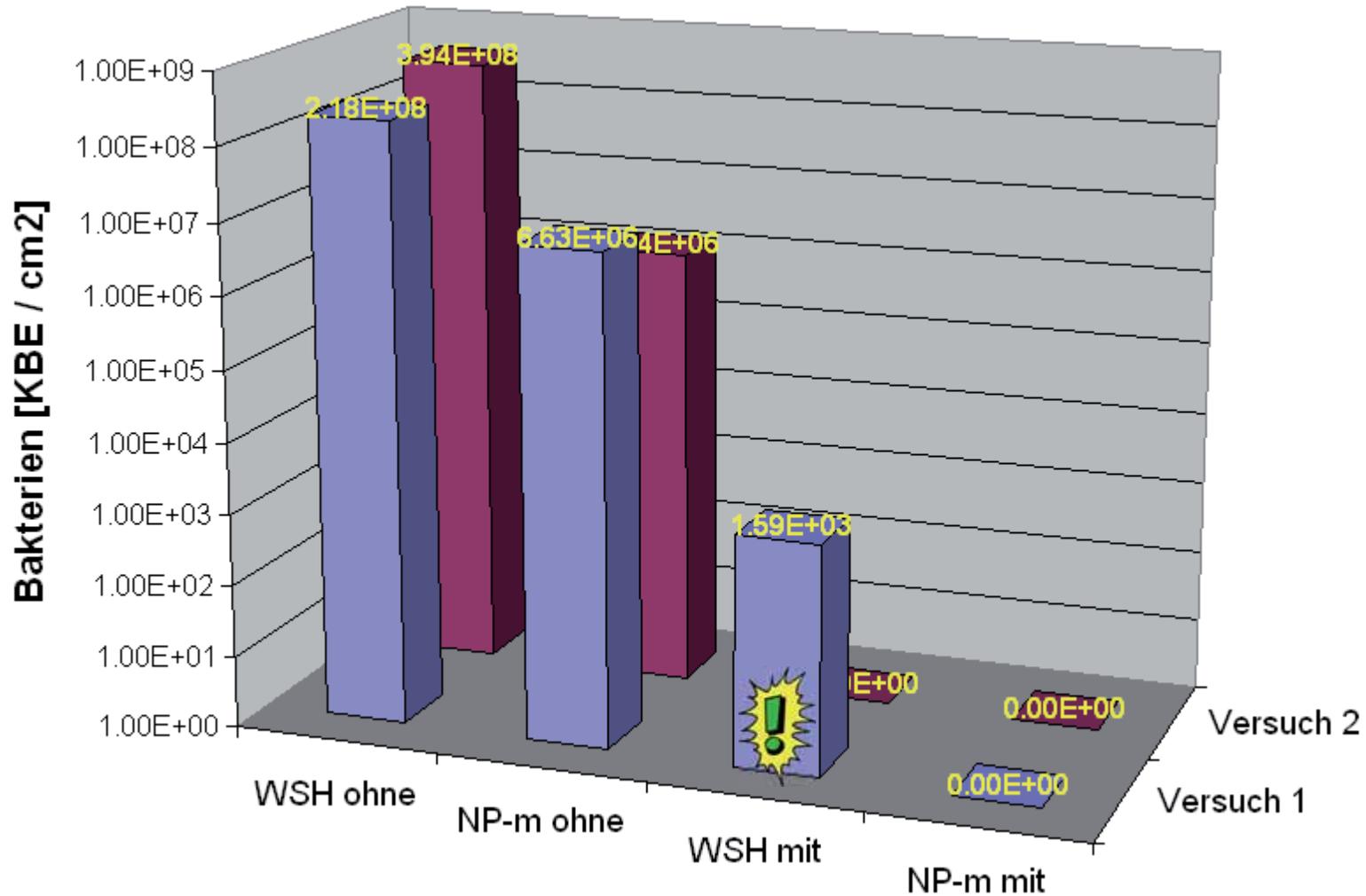
R1-m



R6-o

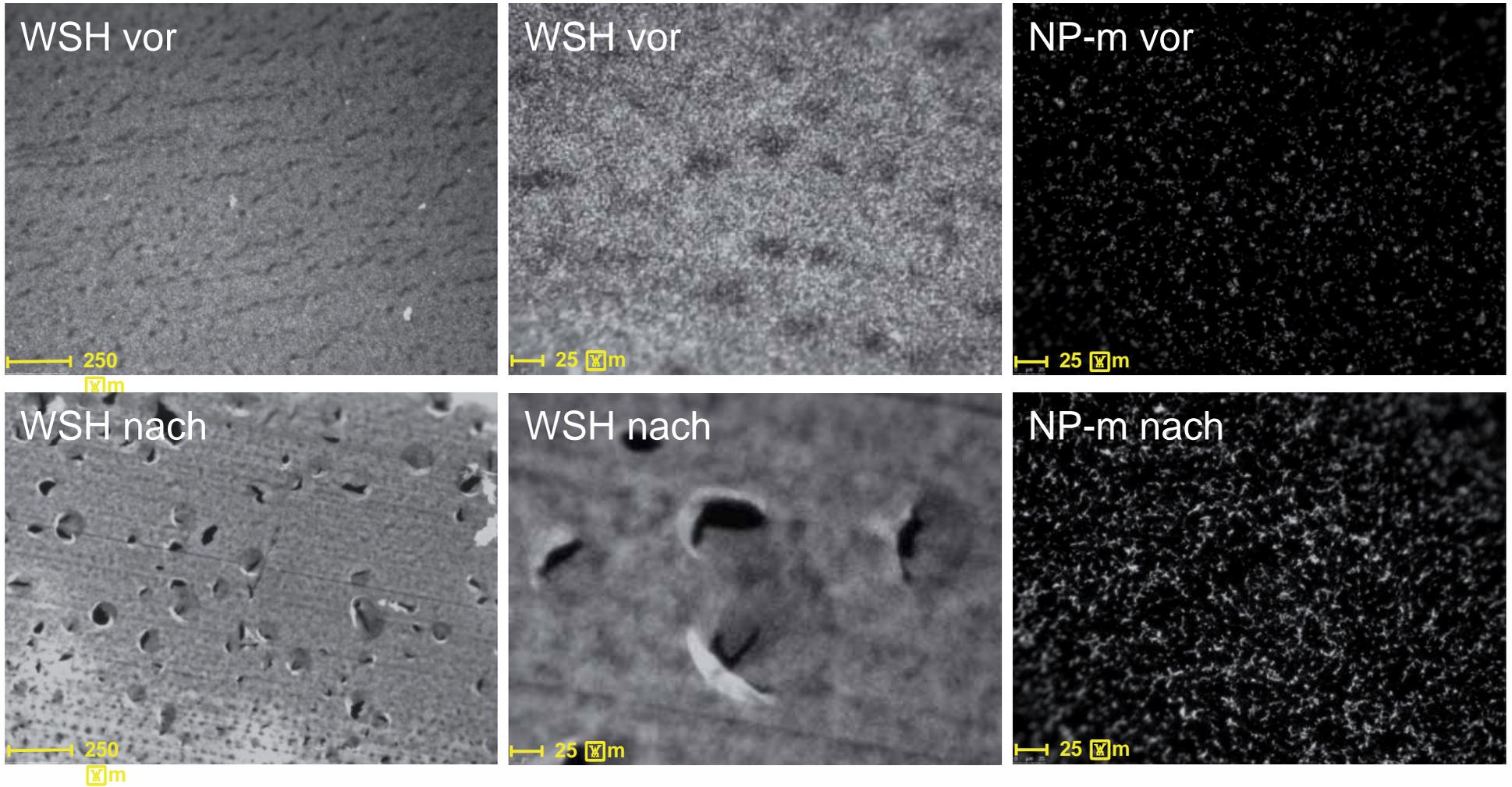
# Mit vs. ohne Desinfektion

Reinigung 15 min, 200 mL/min → Desinfektion 15 min, 4 mL/min



# Mit / ohne Desinfektion

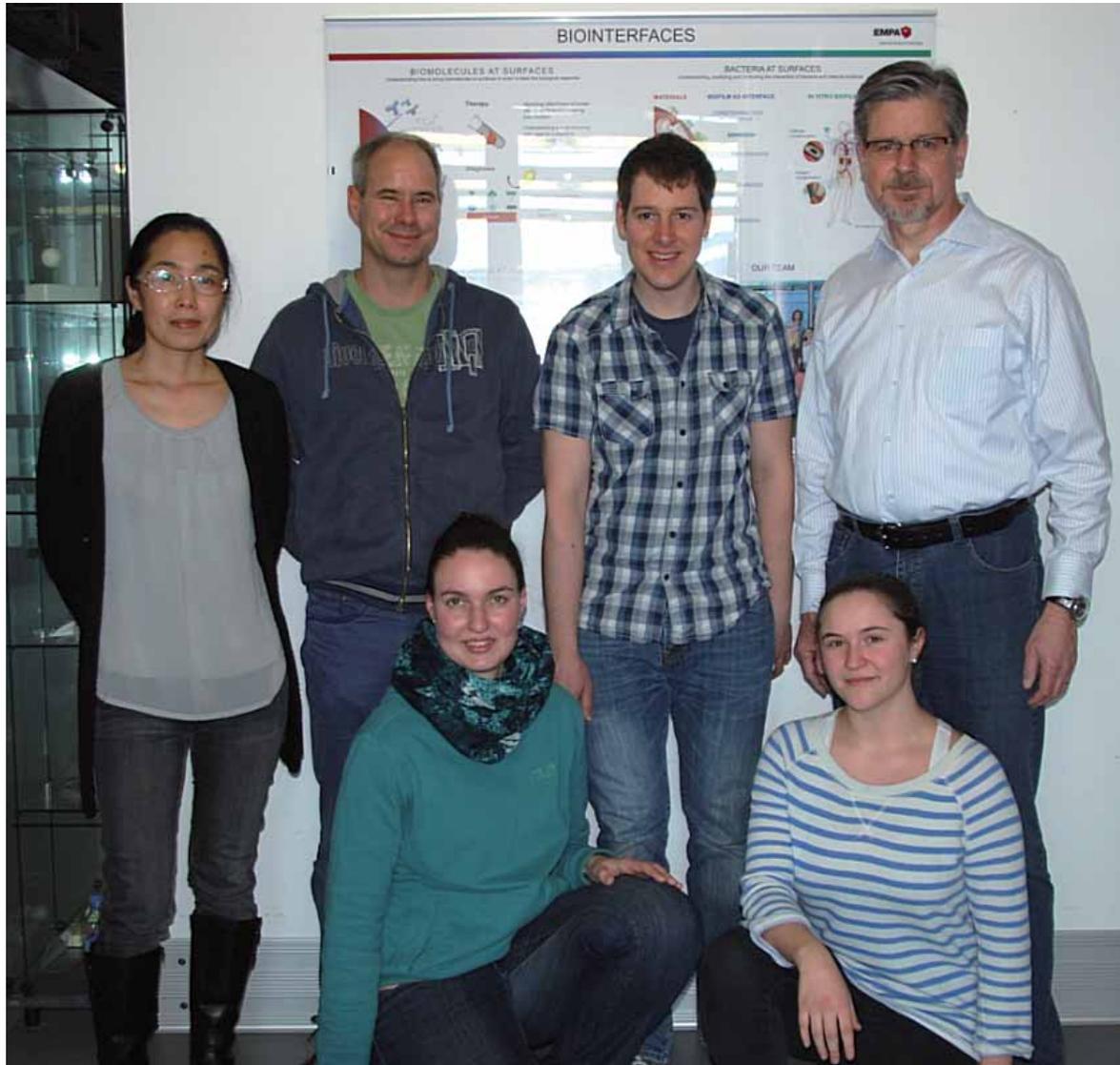
Desinfektionsmittel: deconex<sup>®</sup> HLD PA (Peressigsäure)



# Zusammenfassung

- Unterschiedliche Nachweismethoden für verschiedene Phasen einer Produktentwicklung notwendig.
- Resultate von MT-Screening-Methoden im Wesentlichen kongruent mit aufwändigeren Dummy-Tests.
- *S. aureus* Biofilm weniger widerstandsfähig als *P. aeruginosa* Biofilm, insbesondere gegenüber enzymatischen Reinigern.
- Dezinifizierende Reiniger bzw. Reiniger mit Desinfektionswirkstoffen zeigen allgemein keine gute Reinigungsleistung, weder gegen Biofilm noch gegen Blut. Bes. schlechte Ergebnisse beim *S. aureus* Biofilm.
- Nur eine gute Reinigung garantiert den Erfolg der anschliessenden Desinfektion. Gilt ganz besonders im Fall von Biofilm.
- Ein Produkt zur manuellen (Vor-)Reinigung mit guten Reinigungseigenschaften gegen Biofilm und gegen Blut wurde im Rahmen des Projekts entwickelt.

# Vielen Dank für Ihr Interesse !



Das Team

Dr. Qun Ren, Empa

Stefan Mauerhofer, Borer

Dr. Philipp Stiefel, Empa

Dr. Urs Rosenberg, Borer

Stefanie Altenried, Empa

Jana Schneider, Empa

