

# 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 Stereotakter 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.

Die Transmissionsrate wurde durch Westernblotuntersuchungen bestätigt.

### Diskussion

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass Stahldrähte, die mit pathologischem Prionproteine kontaminiert wurden eine hohe Infektiosität 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 (PrPsc). 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. Die Transmissionsrate wurde durch Westernblotuntersuchungen bestätigt.

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 PrPsc hat.
- Dampfsterilisation bei 134°C, 18 min in Kombination mit enzymatischer Reinigung nicht die erwartete Wirkung auf PrPsc hat.
- Dampfsterilisation bei 134°C, 18 min in Kombination mit alkalischer Reinigung eine inaktivierende Wirkung auf PrPsc hat.
- Reinigung mit dem hier getesteten alkalischen Reinigern mit einem pH Wert von 11 gute Ergebnisse im gewählten Testmodell zeigen.

- Alkalischer Reinigung mit den getesteten alkalischen Reinigern gefolgt von Sterilisation im STERRAD ein wirksamer Prozess zur Inaktivierung von Prionenkontamination ist.

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

The screenshot shows a web browser window with the URL <http://www.sgsv.ch/index.htm>. The page header includes the logo for SGSV SSSH (Schweizerische Gesellschaft für Sterilgutversorgung / Société Suisse de Sterilisation Hospitalière). The main content area features a large text overlay: "Besuchen Sie unsere Homepage" followed by the website address "www.sgsv.ch" in a large, bold font. On the left side, there is a vertical navigation menu with links for "HOME", "ARTIKEL", "KONTAKT", "JAHRESBEREICH", "FACHBEREICHEN", "FORUM", "STREIFEN", "BIBLIOTHEK", "LINKS", "REDAKTION", and "IMPRESSUM".

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, Inrongside 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. Schulster LM; Editorial: Prion inactivation and medical instruments reprocessing: challenges facing healthcare facilities. *ICHE* 2004; 4: 276-279. ■

Wirkung des STERRAD Sterilisators und verschiedene Aufbereitungsverfahren untersucht mit dem an Hamster-adaptierten 263K scrapie strain.	Transm. Rate (%)	Incub. Periode (Tage)	Incub. Delay (Tage)	Calc. logRF
Negativ Kontrolle (Drähte mit 10% normalen Hirnhomogenat kontaminiert)	0%	606 ± 118	-	-
Positiv Kontrolle (Drähte mit 10% 263K infizierten Hirnhomogenat kontaminiert)	100%	81 ± 1	-	-
100% 263K- infiziertes Hirnhomogenat	100%	78 ± 2	-	-
134°C 18 min	0%	428 ± 103a	352	> 5-6
NaOH 1h bei Raumtemperatur; 134°C 18min	17%	554 ± 197	474	> 5-6
Standard STERRAD Sterilisationszyklus (2 Injektionen)	100%	96 ± 4	15	1.3
100% Enzym. Reiniger. 30 min bei 37°C	100%	94 ± 2	14	1.1
100% Enzym. Reiniger 30 min bei 37°C; STERRAD Sterilisationszyklus (4 Injektionen)	75%	229 ± 122	130	> 5-6
59% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ; 10 min getaucht bei RT (%H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in STERRAD Sterilization System - Liquid)	40%	443 ± 160	350	> 5-6
1% Alka. Reiniger A 10 min bei 55°C	25%	401 ± 158	320	> 5-6
1% Alk. Reiniger A 10 min bei 55°C; STERRAD Sterilisationszyklus (2 Injektionen)	0%	511 ± 71	431	> 5-6
1% Alk. Reiniger A 10 min bei 55°C; STERRAD Sterilisationszyklus (4 Injektionen)	0%	540 ± 30	459	> 5-6
1% Alk. Reiniger B 10 min bei 55°C; STERRAD Sterilisationszyklus (2 Injektionen)	25%	399 ± 97	318	> 5-6
1% Alk. Reiniger B 10 min bei 55°C; STERRAD Sterilisationszyklus (4 Injektionen)	0%	552 ± 0b	552	> 5-6

<sup>a</sup> 4 Hamsters wurden nach 507 eingeschlafert ohne Symptome.

<sup>b</sup> Alle Hamster wurden nach 552 eingeschlafert ohne Symptome.

### 3. Schweizerische Fachtagung über die Sterilisation



« im Mittelpunkt der Arbeit – der Mensch !? »

5. und 6. Juni 2007, im Mövenpick Hotel Regensdorf – Zürich