

<b>gke - Technische Information</b>	<b>730-067-DE</b>	
<b>Populationsbestimmung von Bioindikatoren</b>	<b>Änderungsstand 09</b>	
	Erstellt	04.01.2006 JG
	Änderung	11.11.2019 UK
	Prüfung	11.11.2019 UK
	Freigabe	11.11.2019 UK
<b>Seite 1 von 2</b>		

1. Mindestens 4 unbehandelte **Sporenstreifen** (oder andere Träger) aseptisch aus dem Glassine-Umschlag entnehmen und mit 100 ml sterilem Wasser in einen sterilen Hochgeschwindigkeitsmischer geben und 3-5 min homogenisieren, bis keine größeren Partikel in der Suspension zu sehen sind. Bei der Nicht-Verwendung eines Mixers (z.B. Ersatz durch Glasperlen) ergeben sich erfahrungsgemäß geringere Populationen. Ein anschließender Einsatz eines Ultraschallbades kann sich positiv auf die Wiederfindung auswirken, da so potentiell aggregierte Sporen vereinzelt werden.

Bereits vorhandene **Sporensuspensionen** können nach Vortexen und einer Vorbehandlung im Ultraschallbad für ca. 5 Minuten direkt eingesetzt werden.

Wenn Sporenstreifen Formaldehyd ausgesetzt waren (z.B. zur Prüfung nach einem Formaldehyd-Sterilisationsverfahren), müssen die Streifen vor der Populationsbestimmung nachbehandelt werden, um sie von wachstumshemmenden („maskierenden“) Formaldehydresten zu befreien. Hierzu werden die sterilisierten Sporenstreifen aseptisch für 10 min in 2 %-Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>-Lösung überführt und dann für eine Stunde bei 90-93°C hitzeaktiviert. Anschließend werden die Streifen homogenisiert. Eine weitere Hitzeschock-Behandlung (siehe unten) ist nicht mehr notwendig. Für weitere Informationen dazu siehe DIN EN ISO 11138-5 oder [Gömann, Kaiser and Menzel (Gömann et al.: Reaktionskinetik des Nieder-Temperatur-Dampf-Formaldehyd (NTDF) -Sterilisationsverfahrens, Zentr. Steril. 2000, 8 (5): 290-293)].

2. Bioindikator-Suspensionen und Stearo-Ampullen mit Nährmedium können direkt zur Herstellung von Verdünnungen unter 3. verwendet werden. Jedoch sollte vor Verdünnung eine kurze Ultraschallbehandlung vorgenommen werden um sicherzustellen, dass Sporenagglomerate aufgelöst werden.
3. Mit sterilisiertem, destilliertem und gemäß USP (United States Pharmacopeia) gekühltem (2-8°C) Wasser ist eine Verdünnungsreihe derart zu erstellen, dass eine Konzentration von ca. 10<sup>2</sup> KBE/ml (Kolonie bildende Einheiten / ml) erreicht wird. Am besten wird dies je Verdünnungsschritt durch Verdünnung von 1 ml der Ausgangskonzentration mit 9 ml sterilem destilliertem Wasser erreicht (1:10 Verdünnung).

Es ist immer darauf zu achten, dass die Suspension beim Verarbeiten gut durchmischt und homogen ist. Aus Sicherheitsgründen wird empfohlen, von der Ausgangssuspension 2 verschiedene Verdünnungsreihen herzustellen und auszuwerten (Doppelansatz). Ist die Ausgangskonzentration der Proben nur ungefähr bekannt, müssen mehrere Verdünnungsstufen hergestellt und ausgewertet werden. Für die Auswertung wird dann die Verdünnungsstufe verwendet, die eine Keimkonzentration von etwa 30 – 300 KBE/ml enthält.

4. Nach USP sollen die Sporen mit einem Hitzeschock behandelt werden. Es empfiehlt sich, die Hälfte der Suspension mit nachfolgenden Temperaturen und Zeiten zu behandeln und den Rest unbehandelt zu lassen. Der Hitzeschock stellt ein Germinationssignal für die Sporen dar und soll eigentlich zu einer höheren Wiederfindung führen. Im Falle von *B.atrophaeus* kann aber auch eine geringere Population aus der Hitzeschockbehandlung resultieren, da die Sporen gegenüber feuchter Hitze wenig Resistenz besitzen – dies stellt keinen Mangel dar. Die Populationsangaben auf dem Zertifikat beziehen sich immer auf die Wiederfindung nach durchgeführtem Hitzeschock.

- *Bacillus atrophaeus* bei 80 - 85°C für 10 min Einwirkzeit

- *Geobacillus stearothermophilus* bei 95 – 100°C für 15 min Einwirkzeit

Hierbei ist die Aufwärmzeit der Proben zu berücksichtigen, so dass effektiv längere Zeiten als 10 Minuten bzw. 15 Minuten nötig sind (Die Einwirkzeit beginnt mit Erreichen der unteren Einwirktemperaturgrenze).

Nach der Behandlung die Suspensionen rasch im Eiswasserbad (0-4°C) abkühlen.

<b>gke - Technische Information</b>	<b>730-067-DE</b>	
<b>Populationsbestimmung von Bioindikatoren</b>	<b>Änderungsstand 09</b>	
	Erstellt	04.01.2006 JG
	Änderung	11.11.2019 UK
	Prüfung	11.11.2019 UK
	Freigabe	11.11.2019 UK
<b>Seite 2 von 2</b>		

5. Jeweils 1 ml der hitzebehandelten und unbehandelten Suspension in verschiedene Petrischalen geben und diese mit 15-20 ml auf ca. 45°C temperiertem, flüssigem TSA (Tryptic-Soja-Agar) übergießen. Die Lösungen so schnell wie möglich durch gleichmäßige Rotation der Agarplatte vermischen. Jeder Ansatz sollte dreifach bestimmt werden.
6. Als Negativkontrolle eine weitere Petrischale mit verwendetem, sterilem Wasser und als Positivkontrolle eine weitere Petrischale mit einer Suspension bekannter Population herstellen.
7. Alle Platten 48 Stunden bei optimalen Wachstumstemperaturen inkubieren:
  - *Bacillus pumilus* und *Bacillus atrophaeus* bei 33 - 37°C
  - *Geobacillus stearothermophilus* bei 55 - 60°C

(Bei falscher Temperaturwahl ist kein Wachstum möglich.)
8. Nach erfolgter Inkubation die Bakterienkolonien auf den Platten auszählen, die zwischen 30 und 300 KBE liegen sollten, und die durchschnittliche Population der drei behandelten Platten ermitteln. Platten unter 10 Kolonien sollten wegen möglicher Absorptionserscheinungen an Oberflächen und der damit verbundenen Fehler nicht mit in die Berechnung einbezogen werden. Es ist darauf zu achten, dass bei der Ermittlung der durchschnittlichen Population die hitzeschockbehandelten Platten getrennt von den unbehandelten Platten ausgewertet werden.
9. Abschließend kann mittels der gezählten KBE pro Agarplatte unter Einbeziehung des Verdünnungsfaktors die Population des Bioindikators errechnet werden.
10. Die erhaltenen Daten der unbehandelten und der hitzeschockbehandelten Inkubationsergebnisse vergleichen. Es ist möglich, dass es durch die Hitzeschockbehandlung zu höheren Wiederfindungsraten kommt als bei den Ergebnissen ohne Wärmebehandlung, da die Hitzeeinwirkung ein Auskeimsignal darstellt. Die Population der **gke**-Zertifikate sind gemäß USP nach Hitzeschock inkubiert und ausgezählt. Nach DIN EN ISO 11138-1 muss die Wiederfindungsrate von Sporenstreifen im Fenster bei -50 + 300% liegen, bezogen auf die im Zertifikat der Charge angegebenen Werte.
11. **Problemlösungen** bei nicht erfolgreicher Wiederfindung:
  - Sicherstellung eines guten Aufschlusses der Proben und ggf. Durchführung einer Ultraschallbehandlung der ersten 1:10 oder 1:100 Verdünnung noch vor Durchführung des Hitzeschocks (Ultraschall der Intensität eines Reinigungsbadetes schadet den Sporen nicht).
  - Die Zeit des Hitzeschocks beginnt erst ab Erreichen der unteren angegebenen Temperaturwerte (80°C bei *B. atrophaeus* bzw. 95°C bei *G.stearothermophilus*). Um die angegebenen Temperaturbänder überhaupt innerhalb der Testgefäße erreichen zu können, empfiehlt sich ein eher höherer Einstellwert des Bades, vor allem bei *G.stearothermophilus* (z.B. 99°C Einstellwert).
  - Erfahrungsgemäß ergeben sich höhere Populationswerte bei Verwendung von gekühltem (4°-8°C) Wasser bei allen Verdünnungsschritten.
  - Verwendung von Glas- anstelle von Plastikgefäßen. Nach Durchführung der Verdünnungsreihen erhält man geringere Wiederfindungen bei Verwendung von Plastikmaterialien. Durch die hohe Hydrophobizität des Plastiks können sich Sporen vermehrt an den Wandungen ablagern.
  - Für die Inkubation sollte man immer frischen Agar verwenden, der nur insgesamt einmal aufgekocht wurde. Durch vermehrtes Aufkochen verschlechtert sich die Qualität des Agars, was sich mit hoher Wahrscheinlichkeit in einer geringen Wiederfindung äußern kann.
  - Ausreichende Einhaltung der Inkubationszeit von 48 h.