

Effiziente Abtötung von Milzbrandsporen durch wässrige und alkoholische Peressigsäure-Lösungen

Der Begriff der Desinfektion wird in Lehrbüchern und in Abhängigkeit vom Anwendungsgebiet unterschiedlich definiert. Keimfreiheit wird damit gewöhnlich nicht erfasst. Wer im Labor mit Milzbrandsporen arbeitet, benötigt Desinfektionsmittel (DM), die den Schutz der dort Tätigen gewährleisten. Ziel der Desinfektion – so, wie sie hier verstanden werden soll – ist es, eine bestimmte zumeist näher bezeichnete Gruppe unerwünschter Krankheitserreger, in unserem Falle bakterielle Erreger der Risikogruppe 3, sicher unschädlich zu machen [1]. Beim Umgang mit unbekanntem Erregern aus Proben mit bioterroristischem Hintergrund wird von einem Desinfektionsmittel erwartet, dass es alle pathogenen Mikroorganismen, einschließlich bakterieller Sporen

auch in hohen Keimzahlen, verlässlich abtötet. Als notwendige Forderung ergibt sich daraus, alle vermehrungsfähigen Keime auf einem Objektträger mit einem geeigneten Mittel abzutöten.

Entscheidende Kriterien zur Auswahl geeigneter Desinfektionsmittel sind daher:

- starke Keimzahlreduktion bis zur vollständigen Abtötung,
- kurze Einwirkzeit,
- irreversible Wirkung,
- breites Wirkungsspektrum,
- Zuverlässigkeit der Wirkung.

Die Peressigsäure (PES), ein Desinfektionsmittel mit hoher Wirkungsgeschwindigkeit und ohne Wirkungslücken für

den hier betrachteten Bereich, soll in der vorliegenden Arbeit unter Laborbedingungen getestet werden. Eine anwendungsbezogene Wirkstoffprüfung soll zur Beantwortung der Frage der Eignung der PES für die Desinfektion von Arbeits- und Oberflächen nach einer möglichen Kontamination mit Milzbrandsporen beitragen. Da der mikrobizide Effekt, den ein Desinfektionsmittel bewirkt, von den Bedingungen, unter denen es verwendet wird, abhängig ist, müssen die Wirksamkeitsprüfungen von Flächendesinfektionsmitteln den Bedingungen entsprechen, die bei der Anwendung von Mitteln in der Desinfektionspraxis herrschen.

Grundsätzlich finden mehrere Methoden zur Desinfektionsmittelpfung Verwendung. Generell können In-vitro-Tests, zu denen Suspensionstests gehören, und Versuche unter praxisnahen Bedingungen (Tests unter Verwendung von Keimträgern) von Feldversuchen zur Prüfung der Wirkung im eigentlichen Anwendungsbereich unterschieden werden. Bei Suspensionstests wird eine Keimsuspension über unterschiedliche Zeiträume verschiedenen Verdünnungen des Desinfektionsmittels ausgesetzt. Beim quantitativen Suspensionstest wird dabei die Wirkung durch die zahlenmäßig ermittelte Reduktion der Keimzahl infolge der Einwirkung des Desinfektionsmittels nachgewiesen. Die Zahl der Mikroorganismen in der unbehandelten Prüfsuspension wird dabei zum Vergleich ermittelt.

Keimträgertests sind praxisnahe Prüfmodelle, bei denen die Wirkung von Desinfektionsmitteln auf kontaminierten

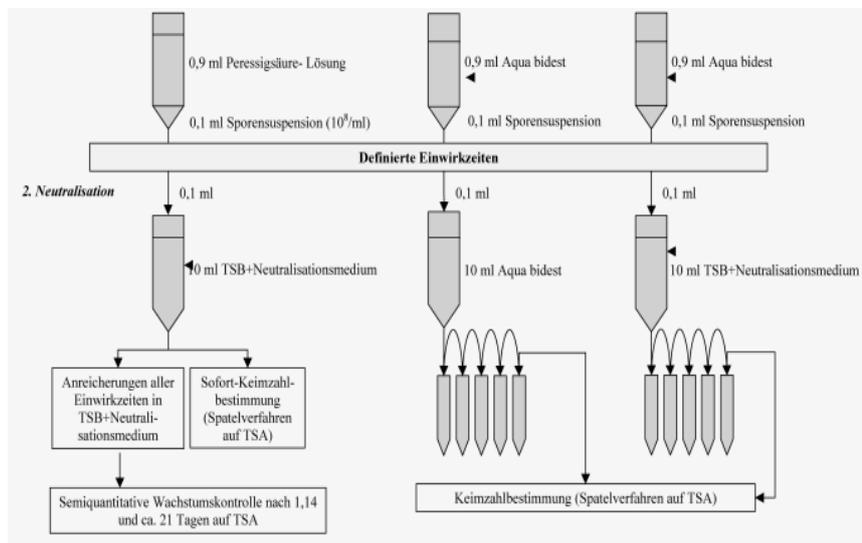


Abb. 1 ▲ Fließschema zum verwendeten Prüfverfahren zur Ermittlung der sporiziden Wirkung (modifiziert nach EN 14347:2004) verschiedener Peressigsäure-Konzentrationen in Abhängigkeit von der Einwirkzeit

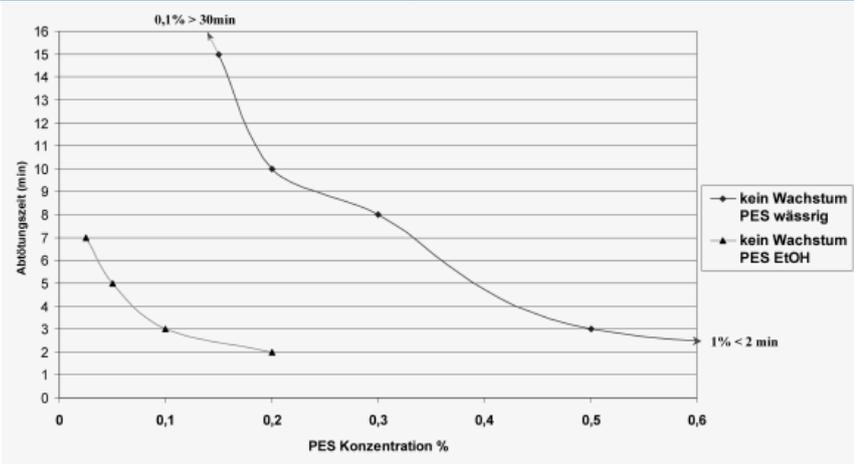


Abb. 2 ▲ Wirksamkeit von wässrigen und alkoholischen Peressigsäure-Lösungen auf Milzbrandsporen im Suspensionsversuch (Abtötungszeit von 10^7 – 10^8 Sporen in 0,9 ml Peressigsäure unterschiedlicher Konzentrationen)

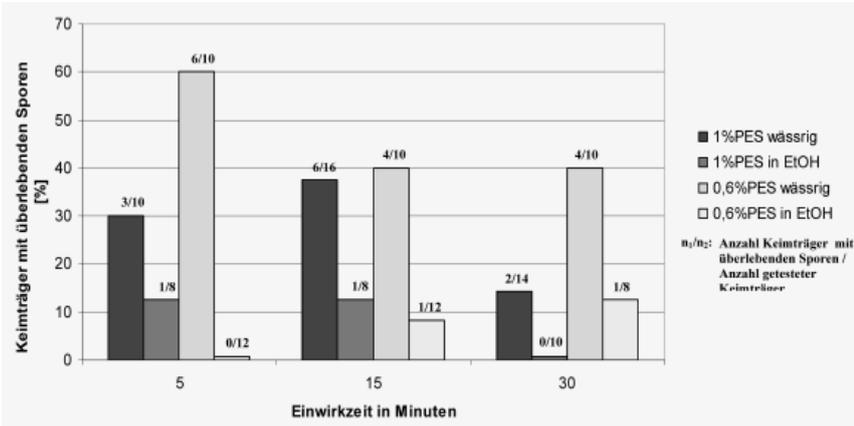


Abb. 3 ▲ Wirksamkeit von wässrigen und alkoholischen Peressigsäure-Lösungen auf *B.-anthracis*-Sporen im Keimträgerversuch (Keimträger mit überlebenden Sporen in % in Abhängigkeit von der Peressigsäure-Konzentration und Einwirkzeit)

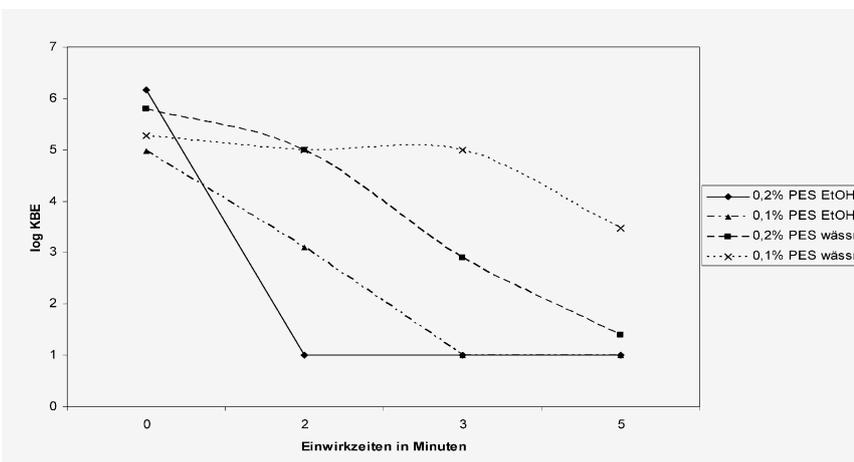


Abb. 4 ▲ Wirksamkeit von 0,1- und 0,2%igen wässrigen und alkoholischen Peressigsäure-Lösungen auf Milzbrandsporen im Suspensionsversuch (Keimzahlreduktion in Anhängigkeit von der Einwirkzeit)

Flächen oder Gegenständen des eigentlichen Anwendungsbereiches ermittelt wird. Auf vorgegebenen Materialien definierter Größe (Keimträgern) werden bestimmte Mengen einer Keimsuspension aufgebracht. Die Keimsuspension wird dann mit dem Desinfektionsmittel vermischt. Dabei kann die Wirkung verschiedener Konzentrations-Zeit-Relationen auf Testkeime geprüft werden.

Material und Methoden

Wirkstoff

Peressigsäure-Lösung ~ 39% in Essigsäure (RT),

Dichte: 1,15 g/ml, 20°C,

Essigsäure: ~ 45%,

H₂O₂: <6%.

Aus dieser PES-Lösung wurde durch Titration der exakte Gehalt an PES bestimmt, und durch Verdünnen mit destilliertem Wasser bzw. 80%igem Ethanol wurden die jeweiligen zu testenden PES-Konzentrationen unmittelbar vor der Anwendung hergestellt.

Testorganismen

Die Prüfung der Wirksamkeit verschiedener PES-Konzentrationen wurde an Sporensuspensionen von den avirulenten *Bacillus-anthraxis*-Stämmen CDC 10114 (W) und Stamatin, Sokol (S) vorgenommen. Für die Überlassung der Stämme möchten wir uns bei den Herren R. Böhm und W. Beyer, Universität Hohenheim, bedanken. Die Sporensuspension wurde nach Angaben eines Prüfverfahrens zur Testung der sporiziden Wirkung von chemischen Desinfektionsmitteln (EN 14347:2004) hergestellt. Dieses Herstellungsverfahren wurde nur geringfügig modifiziert. So wurden Zellkulturflaschen mit Filterkappen für ständige Belüftung sowie 50 ml Zentrifugenröhrchen verwendet. Die Zentrifugation erfolgte bei 3000 g und 4°C.

Suspensionsversuche

PES sollte zunächst im Suspensionsversuch auf ihre Wirkung gegen Milzbrandsporen getestet werden. Hierfür wurde

methodisch in Anlehnung an ein Prüfverfahren zur Testung der sporiziden Wirkung von chemischen Desinfektionsmitteln (EN 14347:2004) vorgegangen [2]. Diese europäische Norm beschreibt einen Suspensionstest zur Prüfung, ob ein chemisches Desinfektionsmittel oder Antiseptikum unter den in dieser Norm festgelegten Laboratoriumsbedingungen eine spezifische Wirkung aufweist.

Prinzip: Im Hauptversuch wird zu dem zu prüfenden DM eine Prüfsuspension von Bakteriosporen gegeben. Das Gemisch wird bei 20°C aufbewahrt. Nach definierten Einwirkzeiten wird die Reduktion der Ausgangskeimzahl bestimmt. Dazu wird mittels Verdünnung in Trypton-Soja-Bouillon (TSB) und Neutralisationsmedium (9,0% Tween 80+0,9% Lecithin+3,0% Histidin) die Anzahl der überlebenden Bakteriosporen in jeder Probe bestimmt. Die ursprüngliche Anzahl der Bakteriosporen wird parallel dazu in der Prüfung ermittelt. Zusätzlich muss die fehlende Toxizität der Neutralisationsmedien nachgewiesen werden (■ **Abb. 1**).

Keimträgerversuche

Allgemeines

Für Untersuchungen zur Ermittlung der Gebrauchskonzentration und Einwirkzeit unter praxisnahen Bedingungen modifizierten wir den in der Richtlinie des Bundesgesundheitsamtes zur Prüfung der Wirksamkeit von Flächendesinfektionsmitteln für die Desinfektion bei Tuberkulose beschriebenen Keimträgerversuch [3]. Die Prüfung verschiedener PES-Konzentrationen wurde an Milzbrandsporensuspensionen ohne Kontamination mit Blut und ohne Referenzverfahren bei ca. 20°C vorgenommen.

Prinzip des Keimträgerversuches zur Prüfung der Wirksamkeit von Flächendesinfektionsmitteln

Milzbrandsporen-Suspensionen wurden auf Keimträger aufgetragen, nach dem Antrocknen (max. 60 min) mit einer PES-Lösung überschichtet und mit Glasspatel verrieben. Nach definierten Einwirkzeiten wurden die Keimträger in 5 ml Trypton-Soja-Bouillon (TSB) mit Neutralisationsmitteln und Glasperlen überführt und 5 min geschüttelt. Danach wurden 100 µl

Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz 2005 · 48:939–950
DOI 10.1007/s00103-005-1108-4
© Springer Medizin Verlag 2005

H. Nattermann · S. Becker · D. Jacob · S. R. Klee · I. Schwebke · B. Appel

Effiziente Abtötung von Milzbrandsporen durch wässrige und alkoholische Peressigsäure-Lösungen

Zusammenfassung

Mit Suspensions- und Keimträgerversuchen wurde die sporizide Wirkung von unterschiedlichen Konzentrationen wässriger und alkoholischer Peressigsäure- (PES-)Lösungen auf Milzbrandsporen untersucht. Während in Suspensionsversuchen alle Sporen mit einer 1%igen PES-Lösung schon in weniger als 2 Minuten und mit einer 0,5%igen PES-Lösung in weniger als 3 Minuten abgetötet werden konnten, überlebten die Sporen im Keimträgerversuch – einer Prüfung unter praxisnahen Bedingungen – bei 38% der Keimträger eine Behandlung mit einer 1%igen wässrigen PES-Lösung für 15 Minuten. Die PES in 80%iger ethanolischer Lösung war sowohl im Suspensions- als auch im Keimträgerversuch der wässrigen Lösung hinsichtlich ihrer sporiziden Wirkung deutlich überlegen.

Eine 30-minütige Behandlung mit einer 1%igen wässrigen PES-Lösung überlebten Milzbrandsporen auf 14% der Keimträger. Im Gegensatz dazu konnten mit einer 30-minütigen Einwirkzeit einer 1%igen alkoholischen PES-Lösung Milzbrandsporen unter den Bedingungen dieses praxisnahen Prüfverfahrens sicher abgetötet werden. Die nachgewiesene Verbesserung der sporiziden Wirkung der PES in alkoholischer Lösung sollte in der Desinfektionspraxis Berücksichtigung finden. In weiteren Untersuchungen gilt es, die Anwendungsbedingungen zu optimieren.

Schlüsselwörter

Milzbrandsporen · Peressigsäure · Flächendesinfektion · Bioterrorismus

Efficient killing of anthrax spores using aqueous and alcoholic peracetic acid solutions

Abstract

We analysed the sporicidal effect of different concentrations of aqueous and alcoholic peracetic acid (PAA) solutions on anthrax spores in suspension and germ carrier tests. Inactivation of anthrax spores in suspension assays was achieved in less than 2 min using 1% PAA solution and in less than 3 min using 0.5% PAA solution, respectively. In contrast, in germ carrier assays, a test under practical conditions, spores on 38% of the germ carriers survived treatment with 1% PAA solution for 15 min. The use of PAA in 80% ethyl alcohol outclassed the sporicidal effect of aqueous PAA solutions in both suspension and germ carrier assays. Anthrax

spores on 14% of germ carriers tested survived 30 min of treatment with a 1% aqueous PAA solution. In contrast anthrax spores were reliably inactivated under the same test procedure using a 1% alcoholic PAA solution for 30 min. The proven enhancement of the sporicidal effect of alcoholic PAA solutions should be kept in mind when using disinfectants in practice. In further surveys we will optimise the test conditions.

Keywords

Anthrax spores · Peracetic acid · Surface disinfection · Bioterrorism

Tabelle 1

Wirksamkeit von Peressigsäure auf Milzbrandsporen in Abhängigkeit von Konzentration und Einwirkzeit im Suspensionsversuch (EWZ: Einwirkzeit, RF: Reduktionsfaktor)

| PES-Konzentration | B.-anthracis-Stamm | EWZ (min) | Anzahl KBE (log) | | RF (log) | Nachweis überlebender Sporen über Anreicherung |
|----------------------|--------------------|-----------|------------------------|---------------------|----------|--|
| | | | Unbehandelte Kontrolle | Nach PES-Einwirkung | | |
| 1% wässrig | | | | | | |
| Versuch 1 | W | 2 | 5,20 | 1,0 | ≥4,20 | - |
| | W | 5 | 5,20 | 1,0 | ≥4,20 | - |
| | W | 10 | 5,20 | 1,0 | ≥4,20 | - |
| | W | 20 | 5,20 | 1,0 | ≥4,20 | - |
| 0,5% wässrig | | | | | | |
| Versuch 2 | W | 1 | 5,25 | 1,0 | ≥4,25 | + |
| | W | 5 | 5,25 | 1,0 | ≥4,25 | - |
| | W | 10 | 5,25 | 1,0 | ≥4,25 | - |
| | W | 15 | 5,25 | 1,0 | ≥4,25 | - |
| Versuch 3 | W | 1 | 5,79 | 1,84 | 3,95 | + |
| | W | 3 | 5,79 | 1,0 | ≥4,79 | - |
| | W | 5 | 5,79 | 1,0 | ≥4,79 | - |
| | W | 10 | 5,79 | 1,0 | ≥4,79 | - |
| Versuch 5 | W | 3 | 4,85 | 1,0 | ≥3,85 | - |
| 0,3% wässrig | | | | | | |
| Versuch 8 | S | 8 | 6,09 | 1,0 | ≥5,09 | - |
| 0,25% wässrig | | | | | | |
| Versuch 2 | W | 1 | 5,25 | 5,00 | 0,25 | + |
| | W | 5 | 5,25 | 3,38 | 1,87 | + |
| | W | 10 | 5,25 | 1,30 | 3,95 | + |
| | W | 15 | 5,25 | 1,0 | ≥4,25 | + |
| Versuch 4 | W | 10 | 5,40 | 1,0 | ≥4,40 | - |
| | W | 20 | 5,40 | 1,0 | ≥4,40 | - |
| 0,2% wässrig | | | | | | |
| Versuch 5 | W | 2 | 4,85 | 1,0 | ≥3,85 | + |
| | W | 10 | 4,85 | 1,0 | ≥3,85 | - |
| Versuch 3 | W | 2 | 5,79 | 5,0 | 0,79 | + |
| | W | 3 | 5,79 | 2,89 | 2,90 | + |
| | W | 5 | 5,79 | 1,40 | 4,39 | + |
| 0,15% wässrig | | | | | | |
| Versuch 8 | S | 15 | 6,09 | 1,0 | ≥5,09 | - |
| | S | 30 | 6,09 | 1,0 | ≥5,09 | - |
| 0,1% wässrig | | | | | | |
| Versuch 6 | W | 2 | 4,81 | 3,0 | 1,81 | + |
| | W | 10 | 4,81 | 1,0 | ≥3,81 | - |
| Versuch 4 | W | 10 | 5,40 | 2,65 | 2,75 | + |
| | W | 30 | 5,40 | 1,0 | ≥4,40 | + |
| Versuch 7 | W | 2 | 5,28 | 5,00 | 0,28 | + |
| | W | 3 | 5,28 | 5,00 | 0,28 | + |
| | W | 5 | 5,28 | 3,48 | 1,80 | + |
| | W | 8 | 5,28 | 3,09 | 2,19 | + |
| | W | 10 | 5,28 | 2,86 | 2,42 | + |
| 0,05% wässrig | | | | | | |
| Versuch 5 | W | 2 | 4,85 | 4,00 | 0,85 | + |
| | W | 10 | 4,85 | 1,0 | ≥3,85 | + |
| 0,02% wässrig | | | | | | |
| Versuch 6 | W | 2 | 4,81 | 4,00 | 0,81 | + |
| | W | 10 | 4,81 | 3,40 | 1,41 | + |
| 0,01% wässrig | | | | | | |
| Versuch 5 | W | 2 | 4,85 | 4,00 | 0,85 | + |
| | W | 10 | 4,85 | 4,00 | 0,85 | + |

auf Trypton-Soja-Agar-Platten (TSA) und 0,5 ml in 4,5 ml Luria-Bertani- (LB-)Medium gegeben. Die Wachstumskontrolle der Anreicherungen erfolgte nach Inkubation bei 37°C nach 1, 14 und ca. 21 Tagen durch Ausplattieren von 100 µl auf TSA-Platten.

Erläuternde Hinweise zu Material, Durchführung und Auswertung der Prüfung (s. oben genannte Richtlinie)

Testfläche. Als Testfläche diente Mattglas. Auf den gereinigten Mattglasstreifen von 16 mm Breite und 60 mm Länge wurde ein Testfeld von 10 mm Breite und 30 mm Länge in Quadrate von je 1 cm² unterteilt und markiert. Die Streifen wurden mit gespanntem gesättigtem Wasserdampf sterilisiert.

Kontamination der Testflächen. 10 µl der Sporensuspension (10⁶–10⁷ Sporen pro 10 µl) wurden auf jeweils der mittleren 1 cm² großen Fläche des Testfeldes gleichmäßig verteilt.

Behandlung der kontaminierten Testflächen mit den Desinfektionsmittel-Verdünnungen. Auf die kontaminierten trockenen Testflächen wurden je 20 µl der Desinfektionsmittel-Verdünnungen gegeben. Mit einem gebogenen Glasspatel wurde das Desinfektionsmittel ca. 20 s mit der Kontamination auf dem gesamten Feld von 1×3 cm intensiv verrieben. Die Streifen wurden während der vorgesehenen Einwirkungszeit bei Raumbedingungen waagrecht, in offenen Petrischalen liegend, aufbewahrt.

Prüfung der Testflächen auf überlebende Keime. Bei Ablauf der vorgesehenen Einwirkungszeit wurden die Glasstreifen in Schüttelgefäße gegeben, die 5 ml Suspensionsmittel (TSB und Neutralisationsmittel) und einige Glasperlen sowie 1% Antifoam A enthielten. Die keimdicht verschlossenen Gefäße wurden flach liegend 5 min (Frequenz ca. 400/min) geschüttelt. Von den Suspensionen wurden mit dem gleichen Mittel (bei den Kontrollen mit Aqua bidest.) Verdünnungsreihen (1:10) angelegt und jeweils 0,1 ml auf TSA-Platten ausgespatelt. Zusätzlich wurden 0,5 ml in 4,5 ml LB-Medium gegeben. Keimträger und Neutralisationsmit-

tel sowie die LB-Medien wurden bis zu 21 Tage bei 37°C inkubiert und 3-mal auf TSA ausgestrichen (0,1 ml nach 1, 14 und ca. 21 Tagen). Die auf dem Nährboden jeweils gewachsenen Kolonien (koloniebildende Einheiten) wurden gezählt.

Bestimmung des Bezugswertes. Als Bezugswert diente die mittlere Anzahl koloniebildender Einheiten (KBE) der kontaminierten Testflächen. Zu diesem Zweck wurden 3 der kontaminierten Testflächen anstelle der zu prüfenden Desinfektionsmittel mit destilliertem Wasser verrieben und über die gleiche Zeit sowie unter den gleichen Raumbedingungen wie die mit PES-Lösung behandelten Flächen verwahrt. Anschließend wurde die Anzahl der koloniebildenden Einheiten, wie oben beschrieben, bestimmt.

Auswertung. Die Bestimmung der Wirksamkeit des Mittels erfolgte mindestens 3-mal in gesonderten Versuchen. Durch Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor wird die Anzahl KBE pro Testfläche errechnet. Die sich daraus ergebenden Zahlen werden logarithmiert (log KBE). Sind auf den mit Desinfektionsmittel behandelten Testflächen keine überlebenden Keime nachweisbar, so gehen diese mit dem Wert 1 in die Rechnung ein, und der mit diesem Mittelwert errechnete Reduktionsfaktor ist mit dem Zeichen \geq versehen. Die Wirksamkeit des Desinfektionsmittels wird durch den Reduktionsfaktor angegeben; dies ist die Differenz zwischen dem Logarithmus (log KBE) des Bezugswertes und den Logarithmen der Anzahl koloniebildender Einheiten auf den Testflächen nach Einwirkung des zu prüfenden Desinfektionsmittels.

Ergebnisse

In Suspensionsversuchen wurden *B.-anthracis*-Sporen von einer 0,5%igen wässrigen PES-Lösung (■ Tabelle 1) und einer 0,1%igen alkoholischen PES-Lösung (■ Tabelle 2) in 5 min bei allen Versuchsansätzen abgetötet. Nach kürzerer Einwirkungszeit bzw. bei Verwendung niedrigerer Konzentrationen konnten *B.-anthracis*-Sporen über die Anreicherung wieder rekultiviert werden. Bereits eine 2-minüti-

ge Einwirkung einer 0,05%igen alkoholischen PES-Lösung führte zu einer beachtlichen Keimzahlreduktion. Eine sichere Abtötung ist mit dieser Konzentration jedoch erst nach Erhöhung der Einwirkzeit möglich. Weitere orientierende Ergebnisse sind den Tabellen 1 und 2 zu entnehmen. In Keimträgerversuchen zur Prüfung der Wirksamkeit von Flächendesinfektionsmitteln überlebten Milzbrandsporen erwartungsgemäß höhere PES-Konzentrationen bei gleicher Einwirkzeit als in den Suspensionsversuchen (■ Tabelle 3, 4, 5, 6). So konnten bei 30% der Keimträger die Sporen nach einer 5-minütigen Einwirkzeit einer 1%igen wässrigen PES-Lösung rekultiviert werden. Dagegen widerstanden Sporen bei gleicher Einwirkzeit und Konzentration einer alkoholischen PES-Lösung nur auf 12,5% der Keimträger. Nach Erhöhung der Einwirkzeit einer 1%igen wässrigen PES-Lösung auf 15 min überlebten *B.-anthracis*-Sporen sogar auf 37,5% und nach 30 min noch auf 14,2% der Keimträger (■ Tabelle 3). Von den mit einer 1%igen alkoholischen PES-Lösung behandelten Keimträgern konnten nach einer 30-minütigen Einwirkzeit keine Erreger rekultiviert werden (■ Tabelle 4). Sogar eine 0,6%ige alkoholische PES-Lösung tötete *B.-anthracis*-Sporen schon nach 5 min auf allen getesteten Keimträgern ab (■ Tabelle 6). Allerdings konnte nach 15- und 30-minütiger Einwirkung von je einem Keimträger *B. anthracis* angezüchtet werden (■ Tabelle 6).

Diskussion

Diskussion der Methoden

Die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse zur Wirksamkeitsprüfung der PES zeigen, dass mit PES innerhalb vertretbarer Zeiten mit praxisgerechten Konzentrationen eine Sporizidie zu erreichen ist. Ein genauer Vergleich setzt identische Methoden voraus; hierüber sind die Angaben in der Literatur aber häufig unzureichend. Hinzu kommt die unterschiedliche Zielstellung der verschiedenen Autoren. Bei der Abtötung von *Bacillus*-Sporen wurde eine Inhomogenität beobachtet [4]. Der Anteil der schneller absterbenden Sporen an der Gesamtpopulation ist

Tabelle 2

Wirksamkeit von Peressigsäure (in 80%igem EtOH) auf Milzbrandsporen in Abhängigkeit von Konzentration und Einwirkzeit im Suspensionsversuch

| PES-Konzentration | <i>B.-anthracis</i> -Stamm | EWZ (min) | Anzahl KBE (log) | | RF (log) | Nachweis überlebender Sporen über Anreicherung |
|----------------------|----------------------------|-----------|------------------------|---------------------|----------|--|
| | | | Unbehandelte Kontrolle | Nach PES-Einwirkung | | |
| 1% alkoh. | | | | | | |
| Versuch 1 | W | 2 | 5,20 | 1,0 | ≥4,20 | – |
| | W | 5 | 5,20 | 1,0 | ≥4,20 | – |
| | W | 10 | 5,20 | 1,0 | ≥4,20 | – |
| | W | 20 | 5,20 | 1,0 | ≥4,20 | – |
| 0,2% alkoh. | | | | | | |
| Versuch 5 | W | 0,5 | 5,79 | 3,00 | 2,79 | + |
| | W | 1 | 5,79 | 1,0 | ≥4,79 | – |
| | W | 2 | 5,79 | 1,0 | ≥4,79 | – |
| Versuch 6 | S | 0,5 | 6,17 | 4,00 | 2,17 | + |
| | S | 1 | 6,17 | 2,35 | 3,82 | + |
| | S | 2 | 6,17 | 1,0 | ≥5,17 | – |
| | S | 3 | 6,17 | 1,0 | ≥5,17 | – |
| | S | 5 | 6,17 | 1,0 | ≥5,17 | – |
| Versuch 7 | S | 1 | 4,97 | 1,93 | 3,04 | + |
| | S | 2 | 4,97 | 1,0 | ≥3,97 | – |
| | S | 3 | 4,97 | 1,0 | ≥3,97 | – |
| | S | 5 | 4,97 | 1,0 | ≥3,97 | – |
| Versuch 3 | W | 2 | 6,04 | 1,0 | ≥5,04 | – |
| | W | 5 | 6,04 | 1,0 | ≥5,04 | – |
| | W | 10 | 6,04 | 1,0 | ≥5,04 | – |
| Versuch 8 | S | 1 | 6,09 | 1,0 | ≥5,09 | + |
| | S | 2 | 6,09 | 1,0 | ≥5,09 | – |
| 0,1% alkoh. | | | | | | |
| Versuch 4 | W | 0,5 | 5,02 | 2,59 | 2,43 | + |
| | W | 2 | 5,02 | 1,00 | ≥4,02 | – |
| | W | 3 | 5,02 | 1,00 | ≥4,02 | – |
| Versuch 6 | S | 0,5 | 6,17 | 4,00 | 2,17 | + |
| | S | 1 | 6,17 | 3,00 | 3,17 | + |
| | S | 2 | 6,17 | 1,00 | ≥5,17 | – |
| | S | 3 | 6,17 | 1,00 | ≥5,17 | – |
| | S | 5 | 6,17 | 1,00 | ≥5,17 | – |
| | S | 10 | 6,17 | 1,00 | ≥5,17 | – |
| Versuch 7 | S | 1 | 4,97 | 3,00 | 1,97 | + |
| | S | 2 | 4,97 | 3,10 | 1,87 | + |
| | S | 3 | 4,97 | 1,00 | ≥3,97 | – |
| | S | 5 | 4,97 | 1,00 | ≥3,97 | – |
| Versuch 3 | W | 2 | 6,04 | 1,00 | ≥5,04 | – |
| | W | 5 | 6,04 | 1,00 | ≥5,04 | – |
| | W | 10 | 6,04 | 1,00 | ≥5,04 | – |
| 0,05% alkoh. | | | | | | |
| Versuch 3 | W | 2 | 6,04 | 3,78 | 2,26 | + |
| | W | 10 | 6,04 | 1,00 | ≥5,04 | – |
| Versuch 4 | W | 2 | 5,02 | 1,60 | 3,42 | + |
| | W | 5 | 5,02 | 1,00 | ≥4,02 | – |
| | W | 10 | 5,02 | 1,00 | ≥4,02 | – |
| 0,025% alkoh. | | | | | | |
| Versuch 8 | S | 7 | 6,09 | 1,0 | ≥5,09 | – |
| 0,01% alkoh. | | | | | | |
| Versuch 2 | W | 10 | 4,81 | 3,00 | 1,81 | + |

beträchtlich und liegt zwischen 90% bei *Bacillus megaterium* und 99,9% bei *Bacillus licheniformis* [4]. Sporen mit defekter Wand werden nach Shapiro et al. [5] schneller abgetötet. Für die Beurteilung eines Desinfektionsmittels kommt den resistenteren Keimen grundsätzlich eine größere Bedeutung zu als den weniger widerstandsfähigen Keimen der gleichen Art. Insbesondere bei *Bacillus anthracis* ist zu fragen, ob sich an dem geradlinigen Anteil der Absterbekurve nicht noch ein flacher verlaufender Teil anschließt, der durch die versuchsbedingten Verdünnungen nicht erfasst wird. Von Botzenhart und Jaax [4] wurden Abtötungszeiten für *Bacillus*-Sporen (10^6 – 10^7 /ml) in Abhängigkeit von der PES-Konzentration bestimmt. Sie waren bei den getesteten *Bacillus* spp. unterschiedlich. Für *Bacillus cereus* und *Bacillus subtilis* betrug die Abtötungszeit der Sporen bei einer 0,04%igen PES-Lösung 15 bzw. 20 Minuten. Abweichend davon war für *Bacillus licheniformis* bei einer PES-Konzentration von 0,1% eine Abtötungszeit von mehr als 120 min erforderlich.

In den eigenen Untersuchungen wurde die Leistungsfähigkeit der PES anhand der nach Einwirkung verbleibenden vermehrungsfähigen Sporen beurteilt. Die Methodik der Reaktivierung spielt daher eine entscheidende Rolle, denn nur so kann geklärt werden, ob ein Teil der Sporen nicht dauerhaft, sondern nur reversibel geschädigt ist. Dieses Phänomen, das besonders nach Formaldehyd-Anwendung zu beobachten ist [6], könnte möglicherweise auch für die PES-Lösung zutreffen. Deshalb wurde in den eigenen Versuchen eine verbesserte Reaktivierung durch Neutralisation des Desinfektionsmittels und durch eine Verlängerung der Nachkultur auf bis zu 3 Wochen angewandt. Eine Reaktivierung der Sporen, wie sie von Spicher und Peters 1976 beschrieben wurde [7], konnte nach der PES-Behandlung in den getesteten Konzentrationen nicht beobachtet werden. Für einen sicheren Nachweis überlebender Keime ist es erforderlich, der Neutralisation der Rückstände des Desinfektionsmittels im Untersuchungsgut besondere Aufmerksamkeit zu schenken. Die Neutralisation der sporiziden Wirkung wurde für jeden Prüfkeim und für jede gewählte Untersuchungsbedingung kontrolliert und validiert.

Bei der Wirksamkeitsprüfung ist es umgänglich, dass die Prüfbedingungen den Bedingungen bei der Anwendung der Mittel in der Desinfektionsmittelpraxis entsprechen. Die in Suspensionstesten mit PES ermittelten wirksamen Konzentrationen sind weitaus geringer als die in praxisnahen Versuchen gefundenen [8]. Resultate aus Suspensionsversuchen müssen dementsprechend nicht zwingend mit der eigentlichen Wirkung im Anwendungsbe reich korrelieren [9].

Das verwendete Verfahren zur Prüfung der Wirksamkeit von Flächendesinfektionsmitteln berücksichtigt bei der Kontamination der Testflächen, dass anders als bei Suspensionstests, die mit einem großem Überschuss von Desinfektionsmitteln arbeiten, bei der Flächendesinfektion nur eine begrenzte Desinfektionsmittelmenge pro Flächeneinheit ausgebracht wird. Das Desinfektionsmittel soll grundsätzlich bei der Wirksamkeitsprüfung in annähernd der gleichen Weise appliziert werden wie in der späteren Anwendung in der Praxis. Für die Desinfektion von Oberflächen soll im Regelfall die so genannte Scheuerdesinfektion angewendet werden. Um einerseits bei der Wirksamkeitsprüfung den Anwendungen in der Praxis nahe zu kommen und andererseits von Laboratorium zu Laboratorium möglichst gleiche Prüfbedingungen zu gewährleisten, wurde eine abgemessene Menge des Desinfektionsmittels mit einer Pipette auf das kontaminierte Feld aufgebracht und mithilfe eines Spatels mit der Kontamination (Sporensuspension) ca. 20 s intensiv verrieben. Die Desinfektionsmittelmenge wurde auf 20 µl festgesetzt und auf einem Feld von 3 cm² verteilt. Auf den ersten Blick scheint dies eine sehr geringe Menge zu sein, berechnet auf 1 m² ergeben sich jedoch 67 ml. In der Literatur finden sich nur spärliche Angaben zu der Menge an Desinfektionsmitteln, die in der Praxis bei der Scheuerdesinfektion pro m² zur Anwendung gelangt. Sie liegen zwischen 20 und 80 ml pro m² [10].

Für die Wirkung eines Desinfektionsmittels ist jedoch die ausgebrachte Menge je Flächeneinheit ebenfalls wichtig. Da die Keimtötungsgeschwindigkeit der mikrobiziden Wirkstoffe in Gegenwart von Wasser erheblich größer ist als nach seinem Verdunsten, ist der mikrobizide Gesamteffekt umso größer, je länger die be-

handelte Fläche feucht ist, d. h. je mehr Flüssigkeit auf die zu desinfizierende Fläche aufgebracht wurde. So sind z. B. 10 µl Wasser auf einer Fläche von 3 cm² bei einer Raumtemperatur von 20°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von ca. 45% in etwa 10 min verdunstet, 20 µl Wasser in ca. 20 min und 40 µl in ca. 30 min [11]. Bansemir [10] schließt aus seinen Untersuchungen zur Abhängigkeit des Desinfektionsergebnisses von der Desinfektionsmittelmenge, dass 80 ml pro m² die optimale Menge darstellen. In der Praxis wird jedoch mit geringeren Mengen gearbeitet [12]. Die für die Prüfung von Flächendesinfektionsverfahren vorgeschriebene Menge von 60–80 ml Desinfektionsmittel pro m² dürfte nicht zu gering sein. Sie orientiert sich somit eher an den praktischen Gegebenheiten für die Desinfektion von Arbeitsflächen und Werkbänken. Andere Prüfmethode, z. B. die der DGHM, verwenden erheblich größere Mengen an Desinfektionsmitteln je Flächeneinheit (222 ml pro m²) und sind damit für die hier durchgeführten Prüfungen wenig geeignet.

Wie die Befunde von Spicher und Peters [11] zeigen, dürfen bei der Wirksamkeitsprüfung die Mengen an Desinfektionsmitteln keinesfalls größer gewählt werden als bei der Anwendung der Mittel in der Desinfektionspraxis. Daher ist es wichtig, bei den Desinfektionsmaßnahmen gegen Milzbrandsporen die getesteten Mengen auch tatsächlich auszubringen.

Diskussion der Ergebnisse

In der Literatur beeindruckt die ausgezeichnete sporizide Wirkung der PES. Spössig [13] schrieb 1970: „Eine 1%ige PES-Lösung reicht bei maximal 10-minütiger Einwirkzeit aus, um selbst die resistenteren Mikroben abzutöten. Trotz des gewissen Eiweißfehlers der PES, der sich allerdings bei Sporen geringer auswirkt als bei Bakterien, ist eine Verlängerung der Einwirkzeit in diesem Konzentrationsbereich nicht notwendig.“

Hussaini und Ruby [14] untersuchten die Wirkung der PES auf *B.-anthracis*-Sporen bei verschiedenen Temperaturen. Bei 4°C war eine Konzentration von mindestens 1% PES erforderlich, um die Sporen nach 20 min abzutöten, während bei 20°C schon eine Einwirkzeit von 10 min genügte.

Tabelle 3

Wirksamkeit von 1%iger Peressigsäure auf Milzbrandsporen im Keimträgerversuch

| Versuchs-Nr. | B.-anthracis-Stamm | EWZ (min) | Anzahl KBE (log)/Testfläche | | RF (log) | Nachweis überlebender Sporen über Anreicherung | Keimträger mit überlebenden Sporen [%] |
|--------------|--------------------|-----------|-----------------------------|---------------------|----------|--|--|
| | | | Unbehandelte Kontrolle | Nach PES-Einwirkung | | | |
| Versuch 6 | S | 5 | 5,93 | 1,0 | ≥4,93 | – | 30 |
| | S | 5 | 5,93 | 1,0 | ≥4,93 | – | |
| Versuch 5 | W | 5 | 5,54 | 1,0 | ≥4,54 | + | |
| | W | 5 | 5,54 | 1,6 | 3,94 | + | |
| Versuch 1 | W | 5 | 6,04 | 1,0 | ≥5,04 | – | |
| | W | 5 | 6,04 | 1,0 | ≥5,04 | – | |
| Versuch 2 | W | 5 | 5,76 | 1,0 | ≥4,76 | – | |
| | W | 5 | 5,76 | 1,0 | ≥4,76 | – | |
| Versuch 3 | S | 5 | 5,50 | 1,0 | ≥4,50 | + | |
| | S | 5 | 5,50 | 1,0 | ≥4,50 | – | |
| Versuch 6 | S | 15 | 5,63 | 1,0 | ≥4,63 | – | 37,5 |
| | S | 15 | 5,63 | 1,0 | ≥4,63 | – | |
| Versuch 5 | W | 15 | 5,48 | 1,4 | 4,08 | + | |
| | W | 15 | 5,48 | 1,0 | ≥4,48 | + | |
| Versuch 1 | W | 15 | 5,20 | 1,0 | ≥4,20 | – | |
| | W | 15 | 5,20 | 1,0 | ≥4,20 | + | |
| Versuch 2 | W | 15 | 5,49 | 1,0 | ≥4,49 | – | |
| | W | 15 | 5,49 | 1,0 | ≥4,49 | + | |
| Versuch 3 | S | 15 | 5,30 | 1,45 | 3,85 | + | |
| | S | 15 | 5,30 | 1,0 | ≥4,30 | – | |
| Versuch 4 | S | 15 | 5,20 | 1,0 | ≥4,20 | – | |
| | S | 15 | 5,20 | 1,0 | ≥4,20 | – | |
| Versuch 7 | S | 15 | 6,64 | 1,0 | ≥5,64 | – | |
| | S | 15 | 6,64 | 1,0 | ≥5,64 | – | |
| Versuch 8 | S | 15 | 6,43 | 1,0 | ≥5,43 | + | |
| | S | 15 | 6,43 | 1,0 | ≥5,43 | – | |
| Versuch 6 | S | 30 | 5,33 | 1,0 | ≥4,33 | – | 14,3 |
| | S | 30 | 5,33 | 1,0 | ≥4,33 | – | |
| Versuch 5 | W | 30 | 5,25 | 1,0 | ≥4,25 | + | |
| | W | 30 | 5,25 | 1,0 | ≥4,25 | + | |
| Versuch 1 | W | 30 | 5,08 | 1,0 | ≥4,08 | – | |
| | W | 30 | 5,08 | 1,0 | ≥4,08 | – | |
| Versuch 2 | W | 30 | 5,57 | 1,0 | ≥4,57 | – | |
| | W | 30 | 5,57 | 1,0 | ≥4,57 | – | |
| Versuch 4 | S | 30 | 5,08 | 1,0 | ≥4,08 | – | |
| | S | 30 | 5,08 | 1,0 | ≥4,08 | – | |
| Versuch 7 | S | 30 | 6,36 | 1,0 | ≥5,36 | – | |
| | S | 30 | 6,36 | 1,0 | ≥5,36 | – | |
| Versuch 8 | S | 30 | 6,40 | 1,0 | ≥5,40 | – | |
| | S | 30 | 6,40 | 1,0 | ≥5,40 | – | |

Tabelle 4

| Wirksamkeit von 1%iger Peressigsäure (in 80%igem EtOH) auf Milzbrandsporen im Keimträgerversuch | | | | | | | |
|---|--------------------|-----------|-----------------------------|---------------------|----------|--|--|
| Versuchs-Nr. | B.-anthracis-Stamm | EWZ (min) | Anzahl KBE (log)/Testfläche | | RF (log) | Nachweis überlebender Sporen über Anreicherung | Keimträger mit überlebenden Sporen [%] |
| | | | Unbehandelte Kontrolle | Nach PES-Einwirkung | | | |
| Versuch 3 | W | 5 | 5,44 | 1,0 | 4,44 | + | 12,5 |
| | W | 5 | 5,44 | 1,0 | ≥4,44 | - | |
| Versuch 1 | S | 5 | 5,50 | 1,0 | ≥4,50 | - | |
| | S | 5 | 5,50 | 1,0 | ≥4,50 | - | |
| Versuch 2 | S | 5 | 5,70 | 1,0 | ≥4,70 | - | |
| | S | 5 | 5,70 | 1,0 | ≥4,70 | - | |
| Versuch 5 | S | 5 | 6,54 | 1,0 | ≥5,54 | - | |
| | S | 5 | 6,54 | 1,0 | ≥5,54 | - | |
| Versuch 3 | W | 15 | 5,11 | 1,0 | ≥4,11 | - | 12,5 |
| | W | 15 | 5,11 | 1,0 | ≥4,11 | - | |
| Versuch 2 | S | 15 | 5,49 | 1,0 | ≥4,49 | - | |
| | S | 15 | 5,49 | 1,0 | ≥4,49 | - | |
| Versuch 1 | S | 15 | 5,30 | 1,0 | ≥4,30 | - | |
| | S | 15 | 5,30 | 2,0 | 3,30 | + | |
| Versuch 4 | S | 15 | 5,02 | 1,0 | ≥4,02 | - | |
| | S | 15 | 5,02 | 1,0 | ≥4,02 | - | |
| Versuch 3 | W | 30 | 4,64 | 1,0 | ≥3,64 | - | 0 |
| | W | 30 | 4,64 | 1,0 | ≥3,64 | - | |
| Versuch 2 | S | 30 | 5,45 | 1,0 | ≥4,45 | - | |
| | S | 30 | 5,45 | 1,0 | ≥4,45 | - | |
| Versuch 4 | S | 30 | 5,08 | 1,0 | ≥4,08 | - | |
| | S | 30 | 5,08 | 1,0 | ≥4,08 | - | |
| Versuch 5 | S | 30 | 6,68 | 1,0 | ≥5,68 | - | |
| | S | 30 | 6,68 | 1,0 | ≥5,68 | - | |
| Versuch 5 | S | 30 | 6,68 | 1,0 | ≥5,68 | - | |
| | S | 30 | 6,68 | 1,0 | ≥5,68 | - | |

Auch in den Experimenten von Dietz und Böhm [15] wirkte PES am besten gegen Milzbrandsporen. Alle verwendeten Keimträger ließen sich mit einer 0,6%igen Lösung innerhalb von 60 min desinfizieren.

Die vorliegenden Ergebnisse vor allem der Suspensionsversuche bestätigen die ausgezeichnete sporizide Wirkung der PES. Bei den Keimträgerversuchen, die die praktischen Bedingungen simulieren, überlebten Milzbrandsporen jedoch eine Behandlung mit höheren PES-Konzentrationen. Während in Suspensionsversuchen die Sporen von einer 0,5%igen PES-Lösung nach 3 min abgetötet wurden (Abb. 2), widerstanden auf 30% der getesteten Keimträger die Sporen einer 5-minütigen und 38% sogar einer 15-minütigen Behandlung mit einer 1%igen PES. Selbst eine 30-minütige Einwirkzeit überlebten

einzelne Sporen noch auf 14% der Keimträger (Abb. 3).

Die vorliegenden Untersuchungen haben gezeigt, dass die bisherige Empfehlung zur Desinfektion von *B. anthracis* mittels PES kein sicheres Verfahren darstellt. Die Desinfektion muss auch gegen Milzbrandsporen, z. B. durch die Erhöhung der Konzentration oder der Desinfektionsmittelmenge, sicher wirksam sein. Mit ersten eigenen orientierenden Untersuchungen konnte die Wirksamkeit allein durch die Erhöhung der Desinfektionsmittelmenge pro Keimträger verbessert werden. Eine weitere Möglichkeit zur Erhöhung der Wirksamkeit der PES ist die Verwendung einer alkoholischen statt wässrigen PES-Lösung. Schon Werner und Wevalke beschrieben, dass die sporizide Wirkung der PES durch Alkohol potenziert

wird [16]. Auch in den vorliegenden Untersuchungen war PES in 80%iger ethanolischer Lösung sowohl im Suspensions- als auch im Keimträgerversuch der wässrigen Lösung hinsichtlich ihrer sporiziden Wirkung überlegen (Abb. 2, 3, 4). Während im Suspensionsversuch eine 0,5%ige wässrige PES-Lösung *B. anthracis*-Sporen nach einer 3-minütigen Einwirkzeit abtötete, gelang dies mit einer 0,2%igen alkoholischen PES-Lösung bereits nach 2 min und mit einer 0,05%igen alkoholischen PES-Lösung nach 5 min (Tabelle 1, 2). Besonders deutlich wird die verstärkte Wirksamkeit der alkoholischen PES-Lösung in der Reduktion der Keimzahlen (Abb. 4) und in den kürzeren Abtötungszeiten (Abb. 2).

Im Keimträgerversuch widerstanden *B. anthracis*-Sporen auf 30% der getesteten Keimträger einer 5-minütigen Be-

Tabelle 5

Wirksamkeit von 0,6%iger Peressigsäure auf Milzbrandsporen im Keimträgerversuch

| Versuchs-Nr. | B.-anthracis-Stamm | EWZ (min) | Anzahl KBE (log)/Testfläche | | RF (log) | Nachweis überlebender Sporen über Anreicherung | Keimträger mit überlebenden Sporen [%] |
|--------------|--------------------|-----------|-----------------------------|---------------------|----------|--|--|
| | | | Unbehandelte Kontrolle | Nach PES-Einwirkung | | | |
| Versuch 1 | W | 5 | 5,72 | 1,0 | ≥4,72 | – | 60 |
| | W | 5 | 5,72 | 1,0 | ≥4,72 | + | |
| Versuch 2 | W | 5 | 5,28 | 1,0 | ≥4,28 | – | |
| | W | 5 | 5,28 | 1,0 | ≥4,28 | + | |
| Versuch 3 | S | 5 | 5,09 | 1,0 | ≥4,09 | – | |
| | S | 5 | 5,09 | 1,0 | ≥4,09 | – | |
| Versuch 4 | S | 5 | 5,45 | 1,54 | 3,91 | + | |
| | S | 5 | 5,45 | 1,78 | 3,67 | + | |
| Versuch 5 | S | 5 | 5,24 | 1,0 | ≥4,24 | + | |
| | S | 5 | 5,24 | 1,0 | ≥4,24 | + | |
| Versuch 1 | W | 15 | 5,72 | 1,0 | ≥4,72 | – | 40 |
| | W | 15 | 5,72 | 1,6 | 4,12 | + | |
| Versuch 2 | W | 15 | 4,95 | 1,0 | ≥3,95 | – | |
| | W | 15 | 4,95 | 1,0 | ≥3,95 | – | |
| Versuch 3 | S | 15 | 4,86 | 1,0 | ≥3,86 | – | |
| | S | 15 | 4,86 | 1,0 | ≥3,86 | – | |
| Versuch 4 | S | 15 | 4,95 | 1,54 | 3,41 | + | |
| | S | 15 | 4,95 | 1,60 | 3,35 | + | |
| Versuch 5 | S | 15 | 5,37 | 1,0 | ≥4,37 | – | |
| | S | 15 | 5,37 | 1,18 | 4,19 | + | |
| Versuch 1 | W | 30 | 5,80 | 1,0 | ≥4,80 | – | 40 |
| | W | 30 | 5,80 | 1,0 | ≥4,80 | – | |
| Versuch 2 | W | 30 | 5,34 | 1,0 | ≥4,34 | – | |
| | W | 30 | 5,34 | 1,0 | ≥4,34 | + | |
| Versuch 3 | S | 30 | 4,70 | 1,0 | ≥3,70 | – | |
| | S | 30 | 4,70 | 1,0 | ≥3,70 | – | |
| Versuch 4 | S | 30 | 5,06 | 1,49 | 3,57 | + | |
| | S | 30 | 5,06 | 1,20 | 3,86 | + | |
| Versuch 5 | S | 30 | 5,41 | 1,0 | ≥4,41 | + | |
| | S | 30 | 5,41 | 1,0 | ≥4,41 | – | |

handlung mit einer 1%igen wässrigen PES-Lösung. Eine Behandlung mit gleicher PES-Konzentration in alkoholischer Lösung überlebte nur eine Spore auf einem Keimträger (12,5%). Sogar einer 30-minütigen Einwirkzeit einer 1%igen wässrigen PES-Lösung widerstanden Sporen noch auf 2 (14%) Keimträgern. Nach einer 30-minütigen Behandlung mit einer 1%igen alkoholischen PES-Lösung konnte von keinem Keimträger *B. anthracis* rekultiviert werden. Bereits eine 0,6%ige alkoholische PES-Lösung tötete nach 5 min Milzbrandsporen auf allen getesteten Keimträgern ab (Abb. 6). Allerdings ließ sich von je einem

der Keimträger, die mit 0,6%iger alkoholischer PES-Lösung 15 und sogar 30 min behandelt waren, *B. anthracis* anzüchten (Abb. 3). Die Zahl der überlebenden Sporen war nach 15- und 30-minütiger Einwirkung der 0,6%igen wässrigen PES-Lösung gering (10^1 – 10^2 /ml). Nachweise gelangen bei dieser Konzentration sowohl im Direktausstrich als auch über die Anreicherungen. Anders nach der 30-minütigen Einwirkung einer 1%igen PES-Lösung, bei der überlebende Sporen nur über eine Anreicherung zu rekultivieren waren. Auch bei der 0,6%igen alkoholischen PES-Lösung lag die Zahl der überlebenden Sporen im Bereich der Nach-

weisgrenze. Die 8,3 bzw. 12,5% der Keimträger mit überlebenden Sporen repräsentieren jeweils nur einen einzelnen Keimträger (Abb. 3). Dabei gelang von den 3 Möglichkeiten zum Nachweis nicht abgetöteter Sporen (Direktausstrich, TSB- und LB-Anreicherungen) die Kultivierung nur jeweils bei einem Nachweisverfahren. In 2 Fällen konnte sogar *B. anthracis* nur jeweils als eine Kolonie bei einer der Doppelbestimmungen im Direktausstrich nachgewiesen werden. Die Anreicherungen blieben unbewachsen. Daraus kann geschlossen werden, dass nur eine Spore überlebt hatte. Die nach Behandlung mit der 0,6%igen alkoholi-

Tabelle 6

Wirksamkeit von 0,6%iger Peressigsäure (in EtOH) auf Milzbrandsporen im Keimträgerversuch

| Versuchs-Nr. | B.-anthracis-Stamm | EWZ (min) | Anzahl KBE (log)/Testfläche | | RF (log) | Nachweis überlebender Sporen über Anreicherung | Keimträger mit überlebenden Sporen [%] |
|--------------|--------------------|-----------|-----------------------------|---------------------|----------|--|--|
| | | | Unbehandelte Kontrolle | Nach PES-Einwirkung | | | |
| Versuch 5 | W | 5 | 5,36 | 1,0 | ≥4,36 | – | 0 |
| | W | 5 | 5,36 | 1,0 | ≥4,36 | – | |
| Versuch 1 | S | 5 | 5,45 | 1,0 | ≥4,45 | – | |
| | S | 5 | 5,45 | 1,0 | ≥4,45 | – | |
| Versuch 2 | S | 5 | 5,24 | 1,0 | ≥4,24 | – | |
| | S | 5 | 5,24 | 1,0 | ≥4,24 | – | |
| Versuch 3 | S | 5 | 5,23 | 1,0 | ≥4,23 | – | |
| | S | 5 | 5,23 | 1,0 | ≥4,23 | – | |
| Versuch 4 | S | 5 | 5,50 | 1,0 | ≥4,50 | – | |
| | S | 5 | 5,50 | 1,0 | ≥4,50 | – | |
| Versuch 6 | S | 5 | 6,50 | 1,0 | ≥5,50 | – | |
| | S | 5 | 6,50 | 1,0 | ≥5,50 | – | |
| Versuch 1 | S | 15 | 4,95 | 1,0 | ≥3,95 | – | 8,3 |
| | S | 15 | 4,95 | 1,0 | ≥3,95 | – | |
| Versuch 2 | S | 15 | 5,37 | 1,0 | ≥4,37 | – | |
| | S | 15 | 5,37 | 1,0 | ≥4,37 | – | |
| Versuch 3 | S | 15 | 5,18 | 1,0 | ≥4,18 | – | |
| | S | 15 | 5,18 | 1,0 | ≥4,18 | + | |
| Versuch 4 | S | 15 | 5,30 | 1,0 | ≥4,30 | – | |
| | S | 15 | 5,30 | 1,0 | ≥4,30 | – | |
| Versuch 7 | S | 15 | 5,02 | 1,0 | ≥4,02 | – | |
| | S | 15 | 5,02 | 1,0 | ≥4,02 | – | |
| Versuch 6 | S | 15 | 5,90 | 1,0 | ≥4,90 | – | |
| | S | 15 | 5,90 | 1,0 | ≥4,90 | – | |
| Versuch 1 | S | 30 | 5,06 | 1,0 | 4,06 | – | 12,5 |
| | S | 30 | 5,06 | 1,0 | ≥4,06 | – | |
| Versuch 2 | S | 30 | 5,41 | 1,0 | ≥4,41 | – | |
| | S | 30 | 5,41 | 1,0 | ≥4,41 | – | |
| Versuch 3 | S | 30 | 5,41 | 1,0 | ≥4,41 | – | |
| | S | 30 | 5,41 | 1,0 | ≥4,41 | – | |
| Versuch 4 | S | 30 | 5,08 | 1,0 | ≥4,08 | – | |
| | S | 30 | 5,08 | 1,0 | ≥4,08 | – | |

schen PES-Lösung ermittelten wenigen Keimträger mit nur einzelnen überlebenden Sporen bei einer Nachweisgrenze von $>1/100 \mu\text{l}$ Suspensionsmittel erklären die unerwarteten Ergebnisse, dass bei längerer Einwirkung des Desinfektionsmittels scheinbar häufiger Sporen überlebten.

Die nachgewiesene deutliche Verbesserung der sporiziden Wirkung der PES in alkoholischer Lösung sollte grundsätzliche Berücksichtigung finden. Die Anwendung einer 1%igen alkoholischen PES-Lösung (60–80 ml/m²) dürfte für die Flä-

chendesinfektion (Scheuerdesinfektion bei Raumtemperatur und einer Einwirkzeit von 30 min) als sicheres Verfahren zur Abtötung von Milzbrandsporen angesehen werden. Beachtet werden muss jedoch, dass die Zersetzung der PES im Alkohol beschleunigt ist (Aufbewahrung bei 2–8°C 20 Tage und bei >8°C bis 3 Tage).

Durch Alkohol verbessert sich auch die Benetzungsfähigkeit der PES wesentlich. Sie kann jedoch durch Zugabe weiterer Substanzen noch gesteigert werden. Dies muss aber in weiteren praxisnahen Versuchen noch exakt geprüft werden.

Bei den noch notwendigen Prüfverfahren gilt es, weitere mögliche Einflussfaktoren wie Eiweißfehler oder Schutzsubstanzen für die Sporen (z. B. Silicagel) zu beachten. Auch kann die Ausgangskeimzahl das Ergebnis der Desinfektion beeinträchtigen. So konnten in orientierenden Untersuchungen nach Erhöhung der Ausgangssporenkonzentration um nur eine log-Stufe nach Behandlung mit einer 0,6% alkoholischen PES-Lösung häufiger *B. anthracis* rekultiviert werden. Aus diesen Gründen sollte bei der Desinfektion von hochpathogenen Erregern ein Sicher-

heitsfaktor (u. a. längere Einwirkzeit, höhere Konzentration) eingeführt werden.

Zur Erhöhung der Sicherheit beim Umgang mit Bakterien der Risikogruppe 3 sind weitere Desinfektionsverfahren auf ihre Anwendbarkeit bei dieser Erregergruppe zu testen. So muss die Wirksamkeit von Aerosol-desinfektionsverfahren mit PES auf Milzbrandsporen geprüft werden. In eigenen orientierenden Untersuchungen mit Keimträgern und PES-Aerosolen im Wofasteril®-Kombi-Verfahren konnten *B. licheniformis*-Sporen schon nach 15 min um über 4 log-Stufen reduziert werden. Die ersten diesbezüglichen Untersuchungen mit Milzbrandsporen sind viel versprechend und werden fortgeführt.

Korrespondierender Autor

Dr. H. Nattermann

Zentrum für Biologische Sicherheit (ZBS 2),
Robert Koch-Institut, Nordufer 20, 13353 Berlin
E-Mail: nattermannH@rki.de

Literatur

- Spicher G (1970) Desinfektionsmittel und Desinfektionsverfahren, unter besonderer Berücksichtigung der Faktoren, die ihre Wirksamkeit und Brauchbarkeit beeinflussen. *Path Microbiol* 36:259–276
- Chemisches Desinfektionsmittel und Antiseptika – Sporizide Wirkung (Basistest) – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 1, Stufe 1); Deutsche Fassung EN 14347:2004
- Bekanntmachung des Bundesgesundheitsamtes (1994) Richtlinie des Bundesgesundheitsamtes zur Prüfung der Wirksamkeit von Flächendesinfektionsmitteln für die Desinfektion bei Tuberkulose. *Bundesgesundheitsblatt* 37:274–275
- Botzenhart K, Jaax R (1985) Bestimmung der Abtötungskinetik von *Bacillus*-Sporen durch Peressigsäure. *Zbl Bakt Hyg, I. Abt Orig B* 181:139–150
- Shapiro MP, Setlow B, Setlow P (2004) Killing of *Bacillus subtilis* spores by a modified fenton reagent containing CuCl₂ and ascorbic acid. *Appl Env Microbiol* 70:2535–2539
- Spicher G, Peters J (1981) Hitzeaktivierung von bakteriellen Sporen nach Inaktivierung durch Formaldehyd. Abhängigkeit der Hitzeaktivierung von der Temperatur und ihrer Einwirkungsdauer. *Zbl Bakt Hyg, I. Abt Orig B* 173, 188–196
- Spicher G, Peters J (1976) Wirksamkeitsprüfung von Desinfektionsmitteln an Oberflächen in Modellversuchen. I. Mitteilung: Abhängigkeit der Versuchsergebnisse von der Methodik des Nachweises überlebender Keime (Tupferabstrich bzw. Abschwemmung). *Zbl Bakt Hyg, I. Abt, Orig B* 161:462–473
- Peters J, Bräuniger S (1997) Untersuchungen zur Prüfung der viruziden Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln für die chemische Instrumentendesinfektion. *Hyg Med* 22(10):497–503
- Peng JS, Tsai WC, Chou CC (2002) Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizer and detergent. *Int J Food Microbiol* 77:11–18
- Bansemir K (1985) Desinfektionsmittelmenge und -wirksamkeit bei der Flächendesinfektion. *Swiss Med* 7:36–39
- Spicher G, Peters J (1997) Abhängigkeit der mikrobiologischen Befunde der Wirksamkeitsprüfung von Flächendesinfektionsmitteln von den Prüfungsbedingungen. *Hyg Med* 22(3):123–140
- Steuer W (1979) Neue Methoden der Krankenhausreinigung und Flächendesinfektion. *Hyg Med* 4:337–339
- Sprössig M (1970) Über die Eignung der Peressigsäure zur Kaltsterilisation. *Dtsch Gesundh Wes* 22:1045–1048
- Hussaini SN, Ruby KR (1976) Sporicidal activity of peracetic acid against anthracis spores. *Vet Rec* 98:257–258
- Dietz P, Böhm R (1980) Ergebnisse der experimentellen Desinfektionsmittelprüfung an Milzbrandsporen. *Hyg Med* 5:103–107
- Werner HP, Wewalka G (1973) Abtötung von Sporen in Alkohol durch Peressigsäure. *Zbl Bakt Hyg, I. Abt Orig B* 157:387–391