



# Desinfektion von Persönlicher Schutzausrüstung

**Methodenentwicklung zur standardisierten Untersuchung der Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln auf Oberflächen der Persönlichen Schutzausrüstung gegen Sporen, Viren und Toxine unter praxisnahen Bedingungen und Anwendung der Untersuchungsmethoden am Beispiel von Peressigsäure**

*Karin Lemmer, Anja Roder, Herbert Nattermann,  
Ingeborg Schwebke, Martin Mielke, Brigitte Dorner,  
Georg Pauli, Roland Grunow*



17





# Abschlussbericht

FORSCHUNG IM

BEVÖLKERUNGSSCHUTZ

BAND 17





# Desinfektion von Persönlicher Schutzausrüstung

**Methodenentwicklung zur standardisierten Untersuchung der Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln auf Oberflächen der Persönlichen Schutzausrüstung gegen Sporen, Viren und Toxine unter praxisnahen Bedingungen und Anwendung der Untersuchungsmethoden am Beispiel von Peressigsäure**

*Karin Lemmer, Anja Roder, Herbert Nattermann,  
Ingeborg Schwebke, Martin Mielke, Brigitte Dörner,  
Georg Pauli, Roland Grunow*

17



**Herausgeber:**

Bundesamt für Bevölkerungsschutz und Katastrophenhilfe

Postfach 18 67, 53008 Bonn

Fon: 0228 . 99 550-0, Fax: 0228 . 99550-1620, [www.bbk.bund.de](http://www.bbk.bund.de)

**Verantwortlich für den Inhalt:**

Name: Karin Lemmer, Anja Roder, Herbert Nattermann, Brigitte Dorner,  
Georg Pauli, Roland Grunow

Institut: Zentrum für Biologische Sicherheit im Robert Koch-Institut

Name: Ingeborg Schwebke, Martin Mielke

Institut: Angewandte Infektions- und Krankenhaushygiene im Robert  
Koch-Institut

Straße, Ort: Nordufer 20, D-13353 Berlin

E-Mail: [Lemmerk@rki.de](mailto:Lemmerk@rki.de)

© 2012 Bundesamt für Bevölkerungsschutz und Katastrophenhilfe

ISBN-13: 978-3-939347-42-2

Der vorliegende Band stellt die Meinung der Autoren dar und spiegelt nicht grundsätzlich die Meinung des Herausgebers wider.

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt. Eine Vervielfältigung dieses Werkes oder von Teilen dieses Werkes ist nur in den Grenzen des geltenden Urheberrechtsgesetzes erlaubt. Zitate sind bei vollständigem Quellenverweis jedoch ausdrücklich erwünscht.

Dieses Werk darf ausschließlich kostenlos abgegeben werden. Weitere Exemplare dieses Buches oder anderer Publikationen des Bundesamtes für Bevölkerungsschutz und Katastrophenhilfe können Sie gern beim Herausgeber kostenfrei anfordern.

**Gestaltung, Layout und Satz:**

Naumilkat – Agentur für Kommunikation und Design

40210 Düsseldorf, [www.naumilkat.com](http://www.naumilkat.com)

**Titelbild:** Übertragung der Modellbedingungen in die Praxis. Experimenteller Praxistest bei der Berliner Feuerwehr am Standort Berlin-Weißensee.

**Druck:** MedienHaus Plump GmbH

Rolandsecker Weg 33

53619 Rheinbreitbach, [www.plump.de](http://www.plump.de)

# Inhalt

Zusammenfassung	11	
Abstract	14	
<b>1</b>	<b>Übergeordnete Zielsetzung</b>	<b>17</b>
1.1	Zielsetzungen des Vorhabens	20
1.2	Nutzen des Vorhabens	22
<b>2</b>	<b>Versuchseinrichtungen</b>	<b>25</b>
<b>3</b>	<b>Durchgeführte Arbeiten</b>	<b>29</b>
Verwendete Materialien und Agenzien	31	
Produktion von <i>Bacillus</i> -Sporen	33	
3.1	Etablierung von Keimträger-Prüfmodellen mit Sporen von <i>Bacillus subtilis</i> als Testorganismus	34
3.1.1	<i>Untersuchungen der Prüfmodelle 1-3 mit unterschiedlichen PES-Konzentrationen ± SDS</i>	41
3.1.2	<i>Anwendung von Prüfmodell 3 (Überschichtung mit Mechanik) zur Bestimmung der sporiziden Wirksamkeit der PES unter unterschiedlichen Versuchsbedingungen</i>	41
3.1.3	<i>Bewertung des Keimträger-Prüfverfahrens mit Natriumhypochlorit als sporizide Substanz</i>	43

3.2	Anwendung von Prüfmodell 3 (Überschichtung mit Mechanik) zur Untersuchung der Wirksamkeit von PES gegen Sporen von <i>Bacillus anthracis</i>	44
3.3	Testung der Tenazität der <i>Bacillus</i> -Sporen	46
3.4	Untersuchung der PES-Wirksamkeit gegen Sporen von <i>Bacillus thuringiensis</i> als Surrogat für <i>Bacillus anthracis</i>	48
3.5	Anwendung von Prüfmodell 3 (Überschichtung mit Mechanik) zur Untersuchung der Wirksamkeit von PES gegen Vaccinia-Virus und Adenovirus	51
3.6	Anwendung der Prüfmodelle 2 und 3 (Überschichtung ohne und mit Mechanik) zur Untersuchung der Wirksamkeit von PES gegen Rizin	55
3.7	Übertragung der sporiziden Modellbedingungen in die Praxis	58
	3.7.1 Praxisversuche am Puppenmodell	58
	3.7.2 Praxisversuche mit Probanden in PSA	61
<b>4</b>	<b>Ergebnisse/Bewertungen</b>	<b>65</b>
4.1	Etablierung eines Standardprüfverfahrens mit Sporen von <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 als Testorganismus	67
4.2	Anwendung des Standardprüfverfahrens (Überschichtung mit Mechanik) zur Ermittlung der Wirksamkeit von PES gegen Sporen von <i>Bacillus anthracis</i>	76
4.3	Untersuchungen zur Tenazität der <i>Bacillus</i> -Sporen	79
4.4	Prüfung von <i>Bacillus thuringiensis</i> als Surrogat für <i>Bacillus anthracis</i>	82
4.5	Anwendung des Standardprüfverfahrens (Überschichtung mit Mechanik) zur Ermittlung der Wirksamkeit von PES gegen Vaccinia-Virus und Adenovirus	87

4.6	Anwendung des Standardprüfverfahrens und Prüfverfahrens 2 (Überschichtung mit und ohne Mechanik) zur Ermittlung der Wirksamkeit von PES gegen Rizin	90
4.7	Übertragung der sporiziden Modellbedingungen in die Praxis	95
4.7.1	<i>Praxisversuche am Puppenmodell</i>	95
4.7.2	<i>Praxisversuche mit Probanden in PSA</i>	99
4.8	Bewertung der Modellsysteme im Hinblick auf die Wirksamkeit unter praxisnahen Bedingungen und praktischen Nutzen	104
4.9	Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse sowie Erfahrungen für den Bevölkerungsschutz	107
	Danksagung	108
	<b>Anhang</b>	<b>109</b>
	Literaturverzeichnis	111
	Abkürzungsverzeichnis	115
	Bisherige Publikationen	116



**Zusammenfassung**

**Abstract**



## Zusammenfassung

Die Dekontamination von Persönlicher Schutzausrüstung (PSA) in biologischer Gefahrenlage mit Verdacht auf Kontamination der PSA durch ein hochpathogenes biologisches Agens sollte effektiv, in kurzer Zeit durchführbar und anwenderkompatibel sein. Die Erfahrungen im Bezug auf die Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln auf PSA-Materialien sind limitiert und evidenzbasierte Empfehlungen über ihre Anwendung bei Verdacht auf Kontamination mit hochpathogenen Agenzien, insbesondere den resistenten *Bacillus*-Sporen nicht verfügbar. Unser Auftrag bestand in der Etablierung eines standardisierten Prüfverfahrens zur Bewertung von Desinfektionsmitteln hinsichtlich ihrer Wirksamkeit auf PSA-Oberflächen gegen unterschiedliche Klassen von biologischen Agenzien und Prüfung der im Laborversuch gewonnenen Erfahrungen in Praxisversuchen.

Im Hinblick auf die o.g. Kriterien, die hochwirksamen antimikrobiellen und zusätzlich sporiziden Eigenschaften, stand als Desinfektionsmittel Peressigsäure im Fokus unserer Studie. Zur Entwicklung von Prüfmodellen nach dem Prinzip der quantitativen Keimträgerestung wurden zunächst Sporen von *Bacillus subtilis* ATCC 6633 als Surrogat für *B. anthracis* eingesetzt. Die Sporen wurden auf Keimträger aus PSA-Materialien aufgetragen und durch Lufttrocknen auf der Oberfläche fixiert.

Drei verschiedene Prüfmodelle wurden entwickelt, die sich in der Desinfektionsmittelmenge und der Auftragungstechnik voneinander unterschieden: Im Modell 1 wurde der Keimträger (1,0 x 0,8 cm) vollständig mit 1 ml PES überschichtet (Tauchmodell), im Modell 2 wurde lediglich die kontaminierte Oberfläche des Keimträgers (Größe: 2,5 x 2,2 cm) mit 100 µl oder 50 µl PES tropfenförmig ohne mechanische Einwirkung überschichtet (Überschichtung ohne Mechanik) und im Modell 3 erfolgte die Überschichtung der kontaminierten und umgebenden Fläche (2 cm<sup>2</sup>) mit 10 µl PES unter mechanischer Verteilung als dünner Flüssigkeitsfilm (Überschichtung mit Mechanik). Durch Zugabe von z. B. 0,2 % SDS als Detergenz konnte die Oberflächenspannung der PES-Lösung

deutlich reduziert und damit eine bessere Flächenbenetzung der hydrophoben PSA-Oberfläche erreicht werden.

Die Wirksamkeit der PES gegen Sporen von *B. subtilis* ATCC 6633 konnte mit jedem der Modelle bestätigt werden. Unter den Versuchsbedingungen reduzierten 1,0 % und 0,5 % PES innerhalb von 2-3 min die keimungsfähigen Sporen bis zu der methodisch bedingten Nachweisgrenze von ca. 6  $\log_{10}$ -Stufen. Modell 3 (Überschichtung mit Mechanik) wurde aufgrund der strengen und der Praxis am nächsten kommenden Prüfbedingungen (geringes Desinfektionsmittelvolumen und Auftragung durch mechanische Verteilung) als Standardprüfverfahren favorisiert und unter unterschiedlichen Bedingungen (niedrige Temperaturen, organische Belastung, unterschiedliche PSA-Materialien) erfolgreich getestet.

Die Untersuchungen von *B. anthracis*-Sporen zeigten, dass sich diese durch eine höhere PES-Toleranz auszeichneten als die verwendeten Surrogatsporen. Mit *B. anthracis*-Sporen wurde die maximal ermittelbare Sporenreduktion ( $\geq 5 \log_{10}$ ) innerhalb einer Einwirkzeit von 2-3 min mit 2,0 % PES erreicht. Auf der Suche nach einem ähnlich resistenten, jedoch apathogenen Sporensurrogat wurde schließlich der *B. thuringiensis*-Stamm DSM 350 ausgewählt. Die Behandlung der Sporen dieses Stammes mit 2,0 % PES  $\pm$  Tenside (0,2 % SDS oder ein SLES-haltiges Produkt) führte unter Anwendung der Prüfmodelle 2 und 3 (Überschichtung ohne und mit Mechanik) innerhalb von 3-5 min zu einer Reduktion von keimungsfähigen Sporen von  $> 5-6 \log_{10}$ -Stufen. Ähnlich wie mit den Sporen des *B. subtilis*-Stammes wurden auch mit den *B. thuringiensis*-Sporen gut reproduzierbare Ergebnisse erhalten. Diese Sporen erwiesen sich als ein geeignetes Surrogat zur Optimierung des Prüfmodells 3 (Überschichtung mit Mechanik) als Standardprüfverfahren zur Testung der sporiziden Wirkung von Desinfektionsmitteln auf PSA.

Auch mit Vaccinia- und Adenovirus sowie Rizin als Kontaminanten konnte die Wirksamkeit von PES in dem Standardprüfverfahren untersucht werden. Dabei zeigte sich, dass 0,1 % PES schon nach 1 min eine Reduktion der Viren bis zur maximal ermittelbaren Reduktion von 5 bzw. 6  $\log_{10}$ -Stufen bewirkte. Um eine deutliche Reduktion der Rizinaktivität zu erreichen, waren allerdings eine PES-Konzentration von 2,0 % und eine Einwirkzeit von 10 min erforderlich.

Die anhand der Prüfmodelle 2 und 3 ermittelten sporizid wirksamen Parameter wurden auf ihre Effektivität in der Praxis mit einer Schaufensterpuppe oder Probanden in PSA getestet. Die Kontamination der PSA erfolgte mit *B. thuringiensis*-Sporen. Durch Begießen oder Besprühen unter leichtem Druck mit 2,0 % PES in Kombination mit 0,2 % Tensid wurde innerhalb von 5 min eine hohe Sporenreduktion auf der PSA-Oberfläche erreicht. Dieser Effekt konnte noch durch zusätzliche mechanische Verteilung der PES/Tensid-Lösung auf der PSA-Oberfläche erhöht werden.

Aufgrund der guten Korrelation zwischen den Modellergebnissen und den Ergebnissen der Praxisversuche schlagen wir vor, das Standardprüfverfahren (Überschichtung mit Mechanik) alleine oder in Kombination mit Prüfmodell 2 (Überschichtung ohne Mechanik) zur Vorprüfung von Desinfektionsmitteln bezüglich ihrer sporiziden Wirkung auf PSA-Oberflächen zu verwenden. Die Praxistauglichkeit sollte anschließend im Rahmen einer Validierung unter Praxisbedingungen verifiziert werden. Voraussetzung ist, dass die verwendeten Testorganismen bzw. -sporen hinsichtlich ihrer Resistenz gegenüber dem zu prüfenden Desinfektionsmittel den tatsächlichen Zielagenzien entsprechen.

Die Prüfverfahren bieten eine Reihe von Variationsmöglichkeiten, z. B. können unterschiedliche PSA-Materialien und unterschiedliche Agenzien als Kontaminanten getestet werden. Darüber hinaus ermöglichen die Modelle, Untersuchungen zur Optimierung der Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln durchzuführen.

## Abstract

The decontamination of personal protective equipment (PPE) used under worst-case conditions and suspected to be contaminated with biologically hazardous agents should be highly effective within a short time and compatible with the environmental conditions. So far the experience with the effectiveness of disinfectants on PPE is limited, and there are no evidence-based recommendations for their application in decontaminating highly pathogenic biological agents, especially the highly stable *Bacillus* spores. The subject of our study was to establish a standardized method for evaluation of disinfectants regarding their effectiveness against different classes of biological agents contaminating PPE surfaces. The laboratory results were to be validated under practical conditions.

Based on its antimicrobial effectiveness including sporicidal activity *in vitro*, peracetic acid (PAA) was selected as the model substance for our study. Model test systems derived from carrier assays were developed, first using spores of *Bacillus subtilis* ATCC 6633 as a surrogate for *B. anthracis*. The spores were spotted onto suitable carriers prepared from PPE materials and were fixed on the surface by air-drying.

Three different models were used which differed regarding the volume and mode of application of the disinfectant: In model 1 the carrier (1.0 x 0.8 cm) was completely submerged in 1 ml PAA (submersion), in model 2 the contaminated area of the carrier (carrier size 2.5 x 2.2 cm) was covered with a drop of 100  $\mu$ l or 50  $\mu$ l of PAA without any mechanical action (covering without mechanical action), and in model 3 a volume of 10  $\mu$ l of the disinfectant was mechanically dispersed over the contaminated and the surrounding area (2 cm<sup>2</sup>) as a thin layer (covering with mechanical action). Detergents like 0.2 % SDS were added to reduce the surface tension of the PAA solution and thus to enhance moistening of the hydrophobic PPE surface.

The effectiveness of PAA against spores of *B. subtilis* ATCC 6633 could be confirmed in all three models. Under the above-mentioned conditions, 1.0 % and 0.5 % PAA reduced the viability of the spores by a factor of about  $6 \log_{10}$  within 2 to 3 min of exposure which was the maximal reduction that could be measured above the detection limit. Especially model 3, the most challenging and obviously most realistic test system, was favoured as a standardized test system and was successfully investigated under various conditions (low temperature, organic load and different PPE materials).

When *B. anthracis* was used in the experiments it was shown that the spores of this agent had a higher tolerance to PAA than those of *B. subtilis*. With *B. anthracis* spores, 2.0 % PAA completely prevented the recovery of viable bacteria from spores within 3 min of exposure. In order to optimize the test system by using non-pathogenic surrogate spores of at least a similar PAA tolerance than those of *B. anthracis*, spores of *B. thuringiensis* DSM 350 were selected. Using 2.0 % PAA in combination with and without different detergents (0.2 % SDS or an SLES-containing product), a high reduction of viable spores (between 5 to  $6 \log_{10}$  steps) could be observed within 3 to 5 min of PAA exposure in the model systems 2 and 3 (covering without and with mechanical action). Highly reproducible test results, similar to those for spores of *B. subtilis*, could be obtained with *B. thuringiensis* spores. The latter spores proved to be an adequate surrogate applicable in the standardized test system (model 3).

The effectiveness of PAA against Vaccinia virus and Adenovirus as well as against ricin as contaminants was also successfully investigated using model system 3. It was shown that 0.1 % PAA was effective against both viruses within one minute of exposure, resulting in a virus reduction by 5 and  $6 \log_{10}$ , respectively. Regarding ricin, a considerably higher PAA concentration of 2.0 % and a prolonged contact time of 10 min were necessary for a clear reduction of ricin activity.

The results obtained in the sporicidal models (especially model 3) were transferred to more realistic decontamination scenarios with a manikin or test persons in PPE that were contaminated with spores of *B. thuringiensis*. It could be shown that showering or spraying with 2.0 % PAA in combination with 0.2 % of a tenside was highly effective in reducing spores on the PPE surface within 5 min of treatment. This effect could be reinforced by additionally spreading the PAA/SDS solution mechanically on the PEE surface.

On the basis of the good correlation between the results of the carrier models and those of the practical trials, we propose to select the favourable standardized carrier model (covering with mechanical action) alone or in combination with model 2 (covering without mechanical action) for screening and validating of disinfectants for their sporicidal efficacy on PPE surfaces. Finally the practicability could be verified in practical trials, e.g. with a manikin in PPE. The precondition is that the selected surrogates need to be similar resistant against the disinfectant which has to be tested as the microbial or biological targets.

Furthermore the models offer the possibility to test different materials of PPE, different disinfectants and different microbial or biological targets. In addition, the improvement of effectiveness after optimization of the formulation can be tested.

# 1

## Übergeordnete Zielsetzung



Terroristische Anschläge stellen weltweit ein relevantes Gefahrenpotenzial dar. Die kriminellen Anschläge mit *Bacillus anthracis*-Sporen 2001 in den USA zeigten, wie wichtig es ist, ausreichende Vorkehrungen zu treffen, um für die Gefahren einer bioterroristischen Attacke gerüstet zu sein (Dewan et al., 2002; Canter et al., 2005; Inglesby et al., 2002). Ernste Bedrohungen können biologische Agenzien in Form von pathogenen Bakterien, Viren oder Toxinen sein. Am Beispiel der Vogelgrippe, an SARS oder den Maul- und Klauenseuche-Ausbrüchen wird aber auch ersichtlich, wie schnell und unvermittelt andere Quellen eine biologische Gefährdung darstellen können (Webby & Webster, 2003; Enserink, 2003). Auch bei Verdacht auf Ausbringung bzw. Freisetzung von biologischen Agenzien müssen Gegenmaßnahmen schnellstmöglich zur Anwendung kommen und beinhalten das aktive Eingreifen von Personen am Ort des Geschehens. Die Einsatzkräfte, z. B. Polizei, Feuerwehr, Katastrophenschutz und medizinisches Personal, müssen ausreichend vor möglichen Kontaminationen geschützt werden, zum einen durch das Tragen geeigneter Persönlicher Schutzausrüstung (PSA) und zum anderen durch effiziente, jedoch anwenderkompatible Dekontaminationsmaßnahmen ihrer Schutzausrüstung nach dem Einsatz.

## 1.1 Zielsetzungen des Vorhabens

Im Rahmen des Gesamtprojektes wurden zwei Zielsetzungen definiert:

Die erste Zielsetzung bestand in der Etablierung eines Standardprüfverfahrens, mit dem die Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln gegen biologische Agenzien auf PSA-Oberflächen untersucht werden kann. Das standardisierte Prüfverfahren sollte mit dem Desinfektionsmittel Peressigsäure validiert werden. Der Einfluss von Konzentration, Einwirkzeit und Umweltfaktoren, wie z. B. niedrige Temperaturen und organische Belastung sowie verschiedene Materialien der PSA sollten untersucht werden. Die Evaluierung dieser Fragestellungen sollte in Form von Keimträgermodell mit Keimträgern aus PSA-Materialien erfolgen. Diese sollten mit Bakteriensporen, Viren oder Toxin kontaminiert und unter praxisrelevanten Bedingungen (kurze Einwirkzeiten, niedrige Desinfektionsmittelmengen, mit und ohne mechanische Aufbringung) dekontaminiert werden. Die Bewertung der Dekontaminationseffektivität sollte anschließend quantitativ durch Ermittlung der Reduktionsfaktoren erfolgen. Eine wesentliche Zielsetzung bestand darin, eine Reduktion der außergewöhnlich resistenten *Bacillus*-Sporen bis an die Grenze ihrer Nachweisbarkeit bzw. die maximal ermittelbare Reduktion von keimungsfähigen Sporen zu erreichen, da die Ausbringung von *Bacillus anthracis*-Sporen in pulverförmiger Form eine der größten bisher beschriebenen bioterroristischen Gefahren darstellt. Die Inaktivierung dieser äußerst resistenten Sporen ist eine Herausforderung an die Desinfektion bzw. das Desinfektionsmittel. Die Wirksamkeit bzw. die sporiziden Wirkbedingungen der PES sollten auch gegen Viren und Rizin getestet werden.

Die zweite Zielsetzung beinhaltete die Prüfung der Übertragbarkeit der in den Keimträgerversuchen gewonnenen Erkenntnisse bzw. Ergebnisse zur sporiziden Wirksamkeit der PES auf die Bedingungen in der Praxis. Die aus dem Modell resultierenden optimalen Parameter von PES-Konzentration, Expositionszeit, Desinfektionsmittelvolumen und gegebenenfalls der Temperatur sollten unter praxisnahen Bedingungen bzw. in Praxisversuchen überprüft

werden. Dazu sollten in der Praxis verwendete PSA-Kombinationen, insbesondere verschiedene Anzugtypen bzw. -materialien, am Puppenmodell (mit Schaufensterpuppe in PSA) und mit Probanden in PSA getestet werden. Die PSA sollte dazu mit apathogenen *Bacillus*-Sporen als Surrogat kontaminiert, unter praxisnahen Bedingungen dekontaminiert und anschließend beprobt werden, um Rückschlüsse auf den Dekontaminationserfolg ziehen zu können.

## 1.2 Nutzen des Vorhabens

Bisher stand keine standardisierte Prüfmethode zur Untersuchung der Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln und -verfahren zur Desinfektion bzw. Dekontamination von Oberflächen der PSA zur Verfügung. In nationalen und internationalen Testverfahren und Publikationen wurden Mattglas, lackiertes Holz, Metall, Silikongummi und Porzellan als Trägermaterial zur Wirksamkeitsprüfung von Desinfektionsmitteln zur Flächendesinfektion eingesetzt (Bundesgesundheitsblatt, 1994; Gebel et al., 2001; Nattermann et al., 2005; Sagripanti & Bonifacino, 1996, 1999; AOAC Method 966.04). Da die Oberflächenbeschaffenheit neben anderen Faktoren eine zentrale Bedeutung für die Dekontamination und Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln besitzt (Spicher & Peters, 1997), war die Entwicklung eines Prüfverfahrens, das die Besonderheiten der PSA berücksichtigt, essentiell. Wünschenswert in Bezug auf die PSA-Dekontamination ist, dass in kurzer Zeit (<10 min) mit geringen Desinfektionsmittelvolumina pro Flächeneinheit eine möglichst hohe Reduktion von hochpathogenen Krankheitserregern bzw. Toxinen erreicht wird, so dass schließlich deren gesundheitsschädliche Dosis deutlich unterschritten wird. So liegt die LD<sub>50</sub> bei Lungenmilzbrand bei 2.500 bis 55.000 *B. anthracis*-Sporen (Inglesby et al., 2002), die tödliche Dosis von Rizin bei 350 bis 750 µg/70 kg Körpergewicht (Bradberry et al., 2003). In Abhängigkeit von dem biologischen Agens sollte eine Risikobewertung vorgenommen und der notwendige Reduktionsfaktor festgelegt werden.

Obwohl für den Anwendungsbereich im Bevölkerungsschutz grundsätzlich verschiedene Desinfektionsmittel zur Verfügung stehen, z. B. auf der Basis von Aktivsauerstoff, Aldehyden, Halogen- oder Peroxidverbindungen, gibt es bisher, aufgrund fehlender Untersuchungsergebnisse, keine verbindlichen Vorgaben zur Dekontamination der PSA für den Einsatz im Katastrophenschutz bei Verdacht auf Kontamination mit hochpathogenen biologischen Agenzien. Während eine Vielzahl von Desinfektionsmitteln zur Inaktivierung von Viren und vegetativen Bakterien gelistet sind (Liste des RKI, DGHM/VAH sowie DVG; Rabenau & Schwebke, 2008), ist die Anzahl der Mittel mit sporizider Wir-

kung limitiert. Zur Flächendesinfektion bei Verdacht auf Kontamination mit Bakteriensporen oder zu Forschungszwecken werden unterschiedliche Substanzen wie z. B. Formaldehyd, Glutardialdehyd, Natriumhypochlorit oder Peressigsäure (Spotts Whitney et al., 2003; Sagripanti & Bonifacino, 1996, 1999; Sagripanti et al., 2007; Majcher, 2008) eingesetzt. Mit Ausnahme von Peressigsäure (PES) sind diese Substanzen aufgrund ihrer Toxizität, ihren langen Einwirkzeiten oder ihrer Wirkungseinschränkung durch organische Belastung weniger zur Oberflächendekontamination der PSA nach einem Einsatz in biologischer Gefahrenlage geeignet. Zur Dekontamination von PSA-Materialien im Katastrophenschutz werden daher PES-Lösungen favorisiert, die kommerziell erhältlich sind und an entsprechenden Stellen wie z. B. bei Feuerwehren für den Einsatz bevorratet werden (Steffler & Daute, 2008). PES bietet den Vorteil, gegen alle relevanten Bakterien, Viren und auch Bakteriensporen in relativ kurzen Zeiten und selbst unter extremen Temperaturen, z. B.  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Steffler et al., 2003; Nattermann et al., 2005), wirksam zu sein. Sie eignet sich für unterschiedliche Desinfektions- bzw. Dekontaminationsmaßnahmen, z. B. auch zur Fahrzeugdekontamination, ist für den Anwender deutlich tolerabler als z. B. Aldehyde, hat weniger Wirkungsverlust durch organische Verunreinigungen als Natriumhypochlorit und ist biologisch abbaubar. Nachteile sind der intensive Geruch und die schleimhautreizenden Dämpfe, die durch Alkalizusatz (kommerziell erhältliche Pufferadditive) reduziert werden können (Steffler & Daute, 2008). Fraglich ist, inwieweit die Alkalisierung die sporizide Wirkung der PES beeinflusst, insbesondere hinsichtlich der schnellen Wirkung, die bei der PSA-Dekontamination gefordert ist. Ein Beispiel dafür ist z. B. Natriumhypochlorit, das in ungepuffert Form stark alkalisch und dadurch in Abhängigkeit von der Zeit weniger wirksam gegen Sporen ist als in neutralisierter Lösung (Sagripanti & Bonifacino, 1996 II).

Ein interessanter Aspekt ist auch die inaktivierende Wirkung der Peressigsäure auf Toxine unter dem Gesichtspunkt der PSA-Dekontamination. Bisher ist dazu wenig bekannt und darüber hinaus auch keine Methode für die Wirksamkeitsprüfung von Desinfektionsmitteln gegen Toxine etabliert.

Von Bedeutung ist des Weiteren, wie letztendlich in der Praxis eine effiziente Dekontamination der PSA mittels PES geprüft und durchgeführt werden kann.

Die Definitionen für Dekontamination und Desinfektion sind wie folgt (in Anlehnung an Steffler et al., 2007):

- Dekontamination bedeutet das Minimieren oder Entfernen von radioaktiven, chemischen oder biologischen Agenzien von Personen, Geräten oder anderen Oberflächen auf ein nicht gesundheitsschädliches Maß.
- Desinfektion ist die Reduktion von infektionstüchtigen pathogenen Mikroorganismen auf Oberflächen durch Abtötung bzw. irreversible Inaktivierung auf ein für die sichere Anwendung erforderliches Maß.

Demzufolge kann die Desinfektion ein zusätzliches Element der Dekontamination sein, wenn, wie hier in den Ergebnissen des Forschungsvorhabens dargestellt, gleichzeitig mit der Entfernung der biologischen Agenzien auch deren Abtötung bzw. Inaktivierung erfolgt.

# 2

## Versuchseinrichtungen



Die Versuche zur Etablierung der Keimträger-Prüfmodelle wurden mit Erregern der Sicherheitsstufen 1, 2 und 3 durchgeführt. Die für diese Arbeiten am RKI zur Verfügung stehenden Labors entsprechen den Sicherheitsstandards der Stufe 2 bzw. 3. In den Labors standen mikrobiologische Sicherheitswerkbanken der Klasse 2 sowie die notwendigen Apparaturen, Brutschränke und CO<sub>2</sub>-Inkubatoren zur Verfügung.

Die Praxisversuche fanden mit freundlicher Genehmigung der Berliner Feuerwehr, Leitung der Direktion Nord, am Standort Weißensee statt. Dort wurden uns Wannen zur Dekontamination und ein luftgestütztes Dekontaminationszelt mit Warmwasserdusche zur Verfügung gestellt. Mitarbeiter der Feuerwehr Weißensee unterstützten uns in der Vor- und Nachbereitung und stellten sich freundlicherweise auch als Probanden zur Verfügung. Personen- und Materialtransport vom RKI zum Feuerwehrstandort Berlin-Weißensee und zurück erfolgte mit dem Fahrdienst des Robert Koch-Institutes.

Als Fachliteratur wurden Artikel aus nationalen und internationalen Zeitschriften sowie im Internet zugängige Informationen ausgewertet.



# 3

## Durchgeführte Arbeiten



## Verwendete Materialien und Agenzien

**Reagenzien:** Peressigsäure (PES) wurde in Form von Wofasteril® E 400 verwendet. Die Substanz enthält lt. Hersteller 40 % G/V (400 g/l) PES. Die genaue PES-Konzentration wurde regelmäßig durch jodometrische Titration bestimmt (Spicher & Peters, 1991). Die gewünschten PES-Konzentrationen wurden jeweils kurz vor Gebrauch hergestellt. Als Tenside wurden 0,2 % SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) oder 0,5 % Alcapur® N als Endkonzentration eingesetzt. Die Originalsubstanz Alcapur® N enthält nach Angaben des Herstellers 45 % SLES (Sodium Laureth Sulfate). Das Pufferadditiv Alcapur® wurde in Kombination mit Wofasteril® E 400 verwendet. Das Produkt enthält < 15 % Natriumhydroxid (NaOH) und 5 % - < 15 % anionische Tenside. Wofasteril® E 400, Alcapur® N und Alcapur® wurden von der Fa. Kesla Pharma Wolfen GmbH bezogen. Die eingesetzten Konzentrationen und Kombinationen sind in den entsprechenden Kapiteln dargestellt. Die Verdünnungen wurden mit sterilem bidestilliertem Wasser (dest. Wasser) hergestellt. Natriumhypochlorit (Fa. Roth) wurde in Konzentrationen zwischen 250 ppm und 10.000 ppm freiem Chlor, gelöst in dest. Wasser, bzw. in 0,05 M Phosphatpuffer (PBS), pH 7, verwendet. Das nach Nattermann et al. (2005) hergestellte Neutralisationsmedium enthielt 9,0 % Tween 80, 0,9 % Lecithin und 3,0 % Histidin in Trypton-Soja-Bouillon (TSB).

**PSA-Materialien zur Herstellung von Keimträgern bzw. Carriers:** Verwendet wurden das Schutzanzugmaterial Tychem® F (Fa. Dupont), Schutzhandschuhmaterial aus Butylkautschuk (Fa. Rex), Schutzstiefel (n. EN 345/2; Fa. HVO) sowie der Sichtschutz des Tychem® C- Vollschutzanzugs.

**PSA in den Praxisversuchen:** In den Praxisexperimenten wurden die Schutzanzüge Tychem® C Standard (gelb, Modell CHA5, mit Kapuze), Tychem® F Standard (grau, Modell CHA5, mit Kapuze), die Vollschutzanzüge Astro Protect® C (aus Tychem® C), PM Blowersuit-Chemical Blue (Fa. PM Atemschutz) und Pro Chem III sowie der Schutzanzug Vautex Elite S eingesetzt. Dazu wurden Schutzhandschuhe aus Butylkautschuk und Vinyl sowie Schutzstiefel (EN 345/2) verwendet.

**Testorganismen bzw. Agenzien:** Folgende *Bacillus*-Sporensuspensionen wurden in den Untersuchungen eingesetzt: *B. subtilis* ATCC 6633, *B. cereus* ATCC 12826, *B. thuringiensis* DSM 350, *B. anthracis* CDC 10114 (W), *B. anthracis* Stamtin, Sokol (S), *B. anthracis* B 1138, *B. anthracis* B 2239 und *B. anthracis* 527. Die Sporen wurden nach EN 14347:2005 auf Mangansulfat-Agar hergestellt (s. u.).

Für die Versuche mit Viren wurden Vaccinia-Virus, Stamm Lister-Elstree, von ZBS 1 (Zentrum für biologische Sicherheit), RKI, und Adenovirus Typ 5, Stamm Adenoid 75, von FG 14, RKI, freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Untersuchungen mit Rizin erfolgten vorwiegend mit Rizinrohextrakt, der von ZBS 3, RKI, freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde.

## Produktion von *Bacillus*-Sporen

Die Herstellung von *Bacillus*-Sporen erfolgte nach der Europäischen Norm (EN) 14347:2005 auf Mangansulfat-Agar in Zellkulturflaschen (175 cm<sup>2</sup>, Fa. Nunc). Der Agar wurde entsprechend der EN-Rezeptur hergestellt und nach ausreichendem Trocknen der Agaroberfläche mit 8 ml *Bacillus*-Flüssigkultur (Trypton-Soja-Bouillon) beimpft. Die Zellkulturflaschen wurden für 3 Tage bei 37 °C und mindestens 21 Tage bei Raumtemperatur inkubiert. Der Grad der Sporulation wurde mit der Sporenfärbung nach Rakette mit 5 %iger Malachitgrünlösung (grüne Sporen) und der Gegenfärbung mit Fuchsin (rote vegetative oder nicht ausreichend versporete Bakterien) überprüft. Die Sporenernte erfolgte ab einem Sporengehalt von mindestens 90 %. Nicht ausreichend versporete sowie vegetative Formen wurden durch die anschließende Behandlung mit 70 %igem Isoopropanol (2-3 h) zerstört und ein Großteil der Fragmente sowie Alkohol durch die nachfolgenden Waschschrirte mit dest. Wasser (4 x) entfernt. Anschließend wurde eine Reinheitskontrolle durchgeführt und die Sporenkonzentration (KBE/ml) ermittelt. Nach dreiwöchiger Lagerung der Sporen in dest. Wasser bei 4 °C erfolgte die Qualitätskontrolle durch Bestimmung der chemischen Toleranz bzw. Tenazität gegen definierte PES- und Glutardialdehyd-Konzentrationen nach der EU-Norm (s. 3.3).

Zur Herstellung von *B. subtilis*-Sporen wurden auch verschiedene andere Sporulationsmedien in fester und flüssiger Form verwendet. Im Laufe des Projektes wurden zur Herstellung weiterer möglicher Testsporen Sporen von *B. thuringiensis* DSM 350 und von *Bacillus cereus* ATCC 12826 vorwiegend auf Mangansulfat-Agar produziert. Zur Testung von Sporen diverser *B. anthracis*-Stämme wurde auf Sporensuspensionen aus der Arbeitsgruppe zurückgegriffen. Die Sporenkonzentrationen der verschiedenen Spezies betragen zwischen  $1,0 \times 10^8$  und  $1,6 \times 10^9$  Sporen/ml bzw. KBE/ml.

### 3.1 Etablierung von Keimträger-Prüfmodellen mit Sporen von *Bacillus subtilis* als Testorganismus

Zur Etablierung eines Keimträgerverfahrens, um die dekontaminierende Wirkung von Desinfektionsmitteln auf PSA-Oberflächen zu untersuchen, wurden insgesamt drei verschiedene Prüfmethode oder -modelle getestet (Modell 1-3) und dazu Sporen von *B. subtilis*, Stamm ATCC 6633, als kontaminierendes Agens in einer Konzentration von  $1,4 \times 10^9$  KBE/ml eingesetzt. Während das Kontaminationsmuster mit  $5 \times 2 \mu\text{l}$  Sporensuspension pro Keimträger immer identisch war (Abb. 1-3), unterschieden sich die Modelle in der Größe der Keimträger, im Volumen und der Art der Aufbringung des zu testenden Desinfektionsmittels.

Als ein für die Zielsetzung geeignetes und vielversprechendes Desinfektionsmittel wurde Peressigsäure (PES) ausgewählt und basierend auf den Erfahrungen der Feuerwehr und des Katastrophenschutzes das Produkt Wofasteril® E 400 mit einem PES-Gehalt von zwischen 37 und 41 % (Vol/Vol) als Testsubstanz eingesetzt. Der genaue PES-Gehalt wurde kontinuierlich durch jodometrische Titration bestimmt.

Die 3 Prüfmodelle unterscheiden sich nach folgenden Kriterien:

Im **Modell 1** (Abb. 1) wird der gesamte Keimträger (Größe:  $1,0 \times 0,8$  cm) vollständig mit 1,0 ml Desinfektionsmittel überschichtet. Dazu wird der Keimträger mit Hilfe einer Pinzette vorsichtig, ohne den Rand zu berühren, in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen (Fa. Roth) überführt, wenn nötig mit einer Plastiköse am Boden fixiert und dann mit 1 ml Desinfektionsmittel überschichtet. Dabei bleibt der Keimträger während der Expositionszeit vollständig untergetaucht. Modell 1 wird deshalb auch als **Tauchmodell** bezeichnet.

Im **Modell 2** (Abb. 2) wird die kontaminierte Oberfläche des Keimträgers (Größe des Keimträgers:  $2,2 \times 2,5$  cm) mit 100  $\mu\text{l}$  Desinfektionsmittel ohne Detergenz (bedeckende Fläche ca.  $0,8$  cm<sup>2</sup>) oder 50  $\mu\text{l}$  Desinfektionsmittel mit Detergenz (bedeckende Fläche ca.  $1,5$  cm<sup>2</sup>) überschichtet. Aufgrund

dieser Technik wird das Verfahren auch als **Überschichtung ohne Mechanik** bezeichnet.

Im **Modell 3** (Abb. 3) wird die kontaminierte und umgebende Fläche von insgesamt  $2,0 \text{ cm}^2$  (1 Cent-Größe) der Keimträgeroberfläche (Größe des Keimträgers:  $2,2 \times 2,5 \text{ cm}$ ) durch Ausstreichen von  $10 \text{ }\mu\text{l}$  Desinfektionsmittel in Form eines dünnen Flüssigkeitsfilms benetzt. Dies ist durch Zusatz von Detergenzien (Tensiden) möglich, die die Oberflächenspannung der PES-Lösung gegenüber der hydrophoben PSA-Oberfläche reduzieren und geschieht mechanisch mit Hilfe von 2 Plastikösen: Eine Öse dient zum Fixieren des Keimträgers, während mit der anderen die tensidhaltige PES mäanderförmig und schließlich lückenlos für 20 s über die  $2 \text{ cm}^2$ -Fläche verstrichen wird. Das Verfahren wird daher als **Überschichtung mit Mechanik** bezeichnet. Im Unterschied zu Modell 1 und 2 werden durch diese Überschichtungs- oder auch Wischtechnik die Sporensports zum größten Teil zerstört. Zur Etablierung der Modelle wurde als Detergenz SDS in einer Endkonzentration von 0,2 % der PES-Lösung zugesetzt (PES/SDS).

Während mit den Modellen 1 und 2 sowohl tensidhaltige als auch tensidfreie Desinfektionsmittel auf ihre sporizide Wirkung getestet werden können, setzt die Technik des Modells 3 voraus, dass das Desinfektionsmittel einen gewissen Tensidanteil oder andere die Oberflächenspannung reduzierende Substanzen enthält, um es dünnsschichtig auf der hydrophoben PSA-Oberfläche ausstreichen zu können. Die Sporensuspension selbst enthält keine adhäsiv wirkenden Substanzen, die sich reduzierend auf die Oberflächenspannung auswirken könnten (s. 3.5).

Modell 3 stellt aufgrund des geringen Desinfektionsmittelvolumens potenziell die größte Herausforderung an die zu testende Substanz dar und hat durch die Art der Aufbringung offensichtlich den größten Realitätsbezug (Verwischen auf der PSA-Oberfläche mit Bürste oder Schwamm als vorwiegend dünnen Flüssigkeitsfilm insbesondere an vertikalen Positionen). Im Vergleich dazu ist das Tauchmodell mit dem hohen Desinfektionsmittelvolumen eher eine Methode zur Selektion (Screening) von Desinfektionsmitteln oder chemischen Substanzen mit sporiziden Eigenschaften.

Für die Modellentwicklung wurden vorwiegend Keimträger aus dem Schutzanzugmaterial Tychem® F hergestellt. Die Sterilisation der Keimträger erfolgte durch UV-Bestrahlung der Vorder- und Rückseite mit je  $4 \text{ J/cm}^2$ . Für die Über-

schichtungsmodelle wurden anschließend die einzelnen Keimträger (Größe: 2,5 x 2,2 cm) in Petrischalen mit 5,0 cm Durchmesser überführt. Die Versuche fanden ausschließlich an mikrobiologischen Sicherheitswerkbänken der Klasse 2 statt. Die Keimträger wurden auf der hydrophoben Oberfläche mit 10 µl Sporensuspension in Form von 5 x 2 µl-Spots auf einer Fläche von ca. 0,5 cm<sup>2</sup> kontaminiert und die Spots anschließend bei halbgeöffneter Petrischale für ca. 40 min luftgetrocknet. Die Auftragung der Spots erfolgte mittels Pipetten mit einer Kapazität von 0,1 bis 2,5 µl (SL-Pette XE<sup>®</sup> Professional) und entsprechend feinen Pipettenspitzen (beides Fa. SLG, Gauting).

Für die Desinfektionsmittelexposition wurden im Sinne der PSA-Dekontamination kurze Einwirkzeiten gewählt, beginnend mit 30 s oder 1 min, über 2, 3, 5 und 10 min. Der anschließende Transfer der Keimträger in Neutralisationsmedium (NM), anfangs 12 ml, dann reduziert auf 10 ml, dem sogenannten 3-fach-Enthemmer nach Nattermann et al. (2005), beendete die PES-Wirkung. Nachträgliches 10-minütiges Schütteln verstärkte die Ablösung der Sporen von der Keimträgeroberfläche.

Mit Neutralisationsmedien, die Keimträger enthielten, die für 30 s oder 1-2 min der PES exponiert waren, und in denen aufgrund dieser kurzen Einwirkzeiten sowie in Abhängigkeit von der PES-Konzentration noch reichlich vitale Sporen angenommen werden konnten (auch belegt durch Vorversuche), erfolgte nach 10-minütigem Schütteln eine dekadische Verdünnung mit TSB-Medium (Trypton-Soja-Bouillon). Anschließend wurde aus NM und den Verdünnungen ein definiertes Volumen, in der Regel 2 x 100 µl bzw. 2 x 250 µl bei längeren Einwirkzeiten ( $\geq 3$  min), auf TS-Agarplatten (TSA) ausplattiert. Von den restlichen Neutralisationsmedien mit Keimträgern, die 3, 5 und 10 min exponiert waren, wurden 2 x 100 µl aus NM auf TSA aufgebracht. Entsprechend den Vorversuchen konnte in diesen Proben davon ausgegangen werden, dass nach Behandlung mit PES-Konzentrationen von  $\geq 0,25$  % nur noch wenige bis keine Kolonien mehr auf TSA nachweisbar waren. Aus diesem Grund wurden hier keine Verdünnungsreihen angefertigt. Trotzdem wurden zum Vergleich und auch im Hinblick auf eine mögliche Validierung der Keimträgertestung zusätzliche Versuche durchgeführt, in denen prinzipiell, unabhängig von der Expositionszeit, dekadische Verdünnungsreihen bis  $10^{-6}$  hergestellt wurden. Aus jeder dieser Verdünnungsstufen wurden 2 x 250 µl bzw. 2 x 500 µl Medium auf TSA ausplattiert.

Durch Ausplattieren der Medien direkt nach Neutralisation (in den Experimenten auch als „Direktausstriche“ bezeichnet) wurde die Anzahl der keimungsfähigen Sporen ( $N$ ) in Abhängigkeit von Expositionszeit und PES-Konzentration durch Auszählen der Bakterienkolonien auf TSA ermittelt (KBE/ml) und in Relation zu den Werten der Keimträger, die mit reinem oder tensidhaltigem Wasser behandelt wurden (Negativkontrollen =  $N_0$ ), der Reduktionsfaktor berechnet ( $RF = \log_{10} N_0 - \log_{10} N$ ). Dazu wurden die bei 37 °C kultivierten TSA-Platten erstmalig nach 24 h und weiterhin täglich, bis zu 4 Tagen (um auch verzögertes Auskeimen zu erfassen) ausgewertet. Waren keine *B. subtilis*-typischen Kolonien auf TSA-Platten nachweisbar, wurde dies als methodisch bedingte maximal ermittelbare oder auch nur als maximal ermittelbare Sporenreduktion bezeichnet ( $RF \geq \log_{10} N_0$ ).

Pro Expositions- bzw. Einwirkzeit und PES-Konzentration wurden jeweils vier Keimträger eingesetzt und die Testungen in der Regel zwei- bis dreimal an unterschiedlichen Tagen von teils unterschiedlichen Personen wiederholt, so dass schließlich Werte von 8 bis 12 Keimträgern vorlagen. Für jeden Keimträger innerhalb einer Testung wurde der Reduktionsfaktor mit dem in dieser Testung erhaltenen Mittelwert der unbehandelten Kontrollen bzw. Negativkontrollen ( $N_0$ ) errechnet. Aus der Gesamtheit der Reduktionsfaktoren (8-12) pro Einwirkzeit und PES-Konzentration erfolgten die Berechnung der Mittelwerte und Standardabweichungen und deren graphische Darstellung. Die Ermittlung der RF-Werte aus den Direktausstrichen wurde auch als „Direktnachweis“ bezeichnet.

Bei nicht sichtbarem Wachstum von *B. subtilis*-Kolonien auf TSA verblieben die Keimträger bis zum Versuchsende (insgesamt 9 Tage, s.u.) im NM. Dies garantierte, dass auch das Wachstum von keimungsfähigen Sporen erfasst wurde, die nicht vom Keimträger abgelöst oder evtl. nur reversibel geschädigt wurden, unfähig in Fest-, jedoch fähig, in Flüssigmedium auszukeimen. Daher wurden die Neutralisationsmedien mit den darin verbliebenen Keimträgern für 7 Tage bei 37 °C inkubiert, anschließend wiederum je 100 µl NM auf TSA-Platten ausgestrichen und diese sowie weiterhin die Neutralisationsmedien, 48 h bei 37 °C bebrütet. Ermittelt wurde der prozentuale Anteil an Keimträgern bzw. Neutralisationsmedien mit spezifischem Wachstum im Verhältnis zu der Gesamtzahl der getesteten Keimträger pro Einwirkzeit und PES-Konzentration. Die Auswertungen wurden den Ergebnissen der Direktausstriche gegenübergestellt (beide Resultate sind in Diagrammform in den entsprechenden Abbildungen dargestellt).

## Modell 1: Tauchverfahren

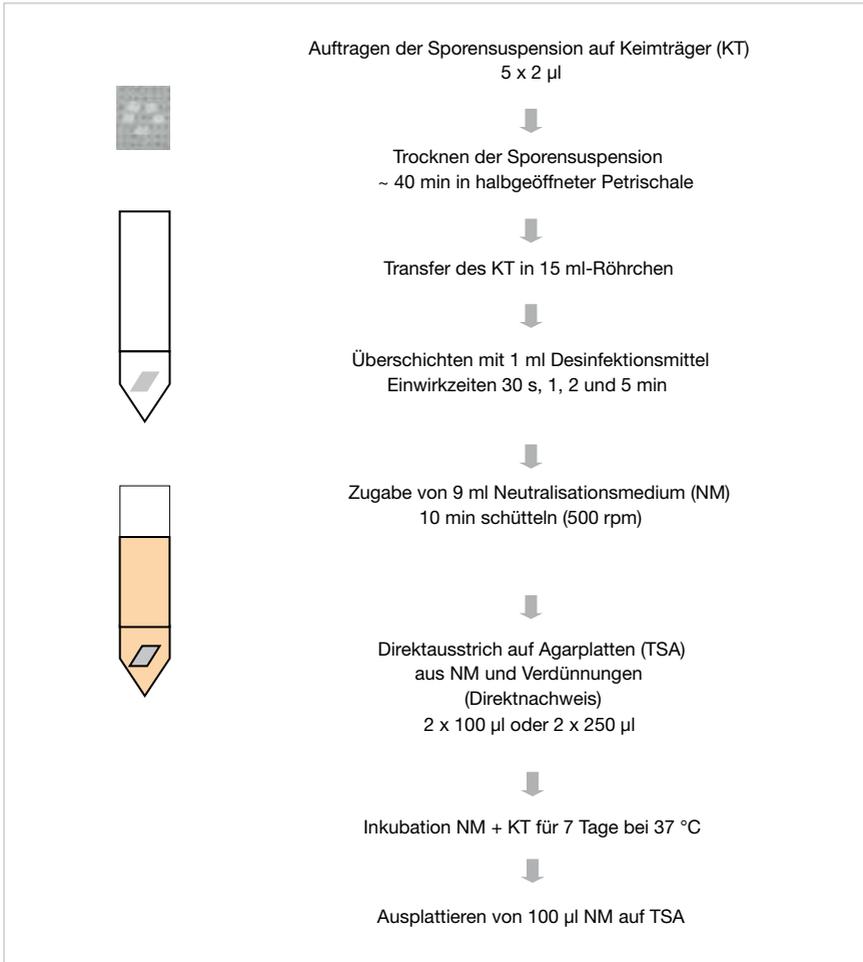


Abb. 1: Schematische Darstellung des Keimträgermodells 1 (Tauchverfahren). Der Keimträger wird vollständig mit Desinfektionsmittel überschichtet bzw. darin eingetaucht.

## Modell 2: Überschichtung ohne Mechanik

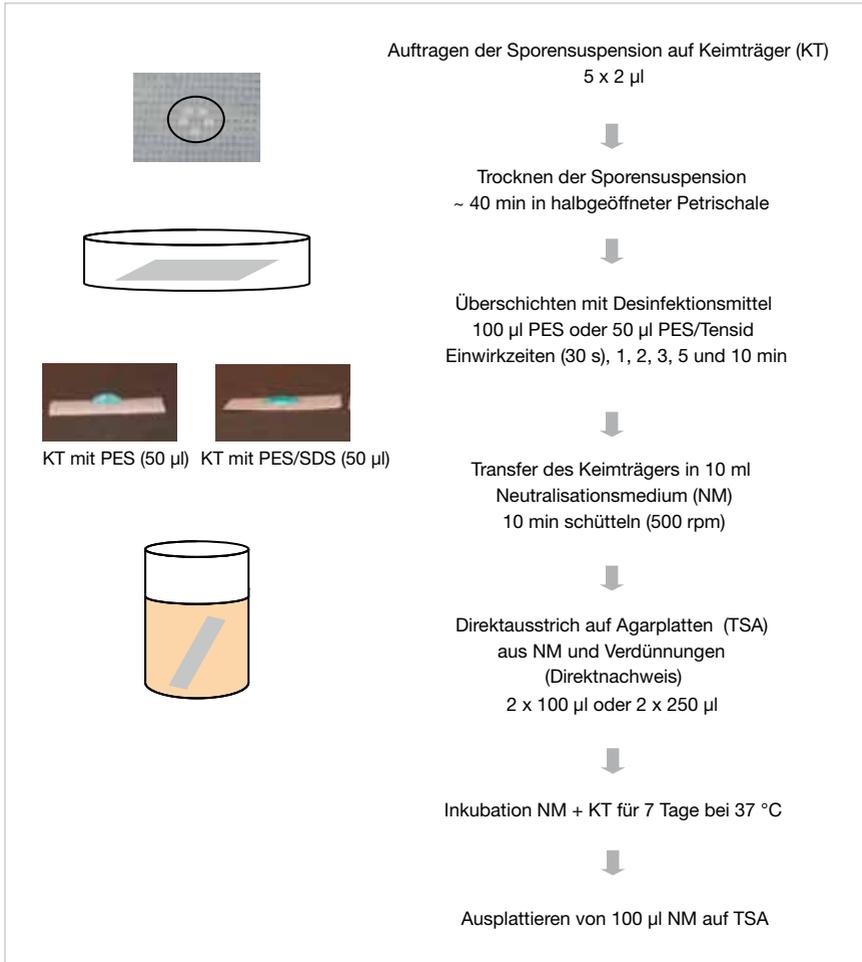


Abb. 2: Schematische Darstellung des Keimträgermodells 2. Die kontaminierte Oberfläche des Keimträgers wird mit 100 µl bzw. 50 µl Desinfektionsmittel tropfenförmig überschichtet ohne zusätzliche Verteilung des Desinfektionsmittels (Überschichtung ohne Mechanik).

### Modell 3: Überschichtung mit Mechanik

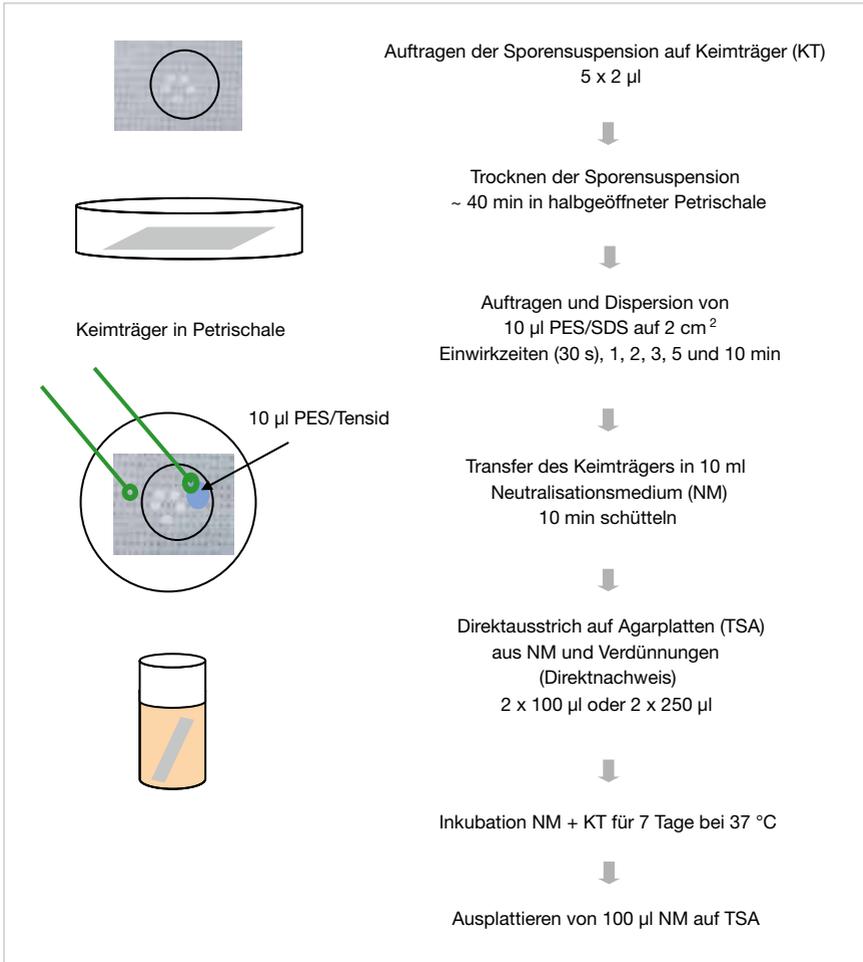


Abb. 3: Schematische Darstellung des Keimträgermodells 3. 10 µl Desinfektionsmittel werden innerhalb von 20 s über die kontaminierte und umgebende Fläche (2 cm<sup>2</sup>) des Keimträgers mit Hilfe einer Plastiköse ausgestrichen (Überschichtung mit Mechanik), so dass die gesamte Fläche mit einem dünnen Desinfektionsmittelfilm überzogen ist.

### **3.1.1 Untersuchungen der Prüfmodelle 1-3 mit unterschiedlichen PES-Konzentrationen ± SDS**

Die Wirksamkeit der PES gegenüber den *Bacillus subtilis*-Sporen wurde in den Keimträgermodellen in Konzentrationen von 0,125 (pH 3,5), 0,25 (pH 3,3), 0,5 (pH 3,0) bzw. 1,0 % PES (pH 2,8) getestet und die Sporenreduktion im Direktnachweis durch Ermittlung des Reduktionsfaktors bestimmt. In den Prüfmodellen 1 (Tauchmodell) und 2 (Überschichtung ohne Mechanik) wurde, wie schon unter 3.1 erwähnt, die PES ohne oder in Kombination mit 0,2 % SDS (± SDS) eingesetzt, in dem Prüfmodell 3 (Überschichtung mit Mechanik) erfolgte im Falle von *Bacillus*-Sporen als kontaminierendes Agens die Testung immer mit SDS- bzw. Tensidzusatz.

### **3.1.2 Anwendung von Prüfmodell 3 (Überschichtung mit Mechanik) zur Bestimmung der sporiziden Wirksamkeit der PES unter unterschiedlichen Versuchsbedingungen**

Trotz der niedrigen Desinfektionsmittelmenge und der mechanischen Applikation erschien Modell 3 aufgrund der Versuchserfahrungen als ein reproduzierbares Prüfsystem und wurde aufgrund der praxisnahen Testbedingungen zur Testung von für die PSA-Dekontamination relevanten Parametern eingesetzt. Hierzu wurden Sporen von *B. subtilis* und dazu, wenn nicht anders erwähnt, Keimträger aus Tychem® F-Material verwendet. Die Untersuchungen sollten Aussagen über die PES-Effektivität und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse unter den unterschiedlichen Versuchsbedingungen (3.1.2. 1-2) liefern und damit auch Aussagen zur Robustheit des Modellsystems im Hinblick auf die Modellstandardisierung.

#### *3.1.2.1 Verwendung unterschiedlicher PSA-Materialien als Keimträger*

Neben den Keimträgern aus Tychem® F wurden auch Keimträger aus Butylkautschukmaterial zur Herstellung von Schutzhandschuhen, aus Schutzstiefeln und aus dem Sichtschutz des Vollschutzanzugs Astro Protect® C hergestellt. Die Sterilisation der Keimträger erfolgte durch UV-Bestrahlung (3.1) oder im Falle des dicken Stiefelmaterials durch Autoklavieren bei 121 °C für 20 min. Die kontaminierten Keimträger wurden mit 0,5 % und 1,0 % PES in Kombination mit

0,2 % SDS (PES/SDS) behandelt. Hier stellte sich die Frage, ob auch diese PSA-Oberflächen (2 cm<sup>2</sup>) mit dem dünnen Desinfektionsmittelfilm (Überschichtung mit Mechanik) effektiv dekontaminiert werden können.

### 3.1.2.2 Einfluss unterschiedlicher Umweltbedingungen (Temperatur, organische Belastung) auf die PES-Wirksamkeit

Die sporizide Wirkung von 1,0 % PES wurde bei -5 °C, 0 °C und +10 °C untersucht. Sämtliche für die Versuche notwendigen Geräte und Hilfsmittel sowie die PES wurden in einem Klimaschrank (Fa. Binder) auf die gewünschte Temperatur gebracht und die kontaminierten Keimträger entsprechend exponiert.

Zur Testung der PES-Wirksamkeit unter organischer Belastung wurde die Sporensuspension mit einer Mischung aus 25,0 % Pferdeserum und 10,0 % Silikagel in dest. Wasser im Verhältnis 1:2 versetzt und pro Keimträger 10 x 2 µl Spots sowie in Parallelversuchen Sporensuspension (5 x 2 µl) und die Serum/Silikagel-Mischung einzeln in dem 2-cm<sup>2</sup>-Areal aufgetragen. Die Behandlung erfolgte mit 10 µl 0,5 % bzw. 0,5 % und 1,0 % PES/SDS.

### 3.1.2.3 Testung der PES mit kommerziellen Detergenzzusätzen

Im Vergleich zu SDS wurden das für Wofasteril® E-Produkte erhältliche Tensidadditiv Alcapur® N (zur Anwendung im Schaumverfahren) und das von den Feuerwehren häufig bevorratete Pufferadditiv Alcapur® getestet. Alcapur® N, das 45 % SLES enthält, wurde in allen Versuchen in einer Konzentration von 0,5 % eingesetzt, entsprechend einem Tensidgehalt von 0,2 % (exakt: 0,225 %). Das Produkt Alcapur® mit einem Natriumhydroxidgehalt von < 15 % und 5 - <15 % anionischen Tensiden bewirkt als Pufferadditiv eine Reduzierung der Korrosivität und des stechenden Geruches der PES. Um dies zu erreichen, empfiehlt der Hersteller das Mischungsverhältnis 1:4, d. h. 1 Teil Wofasteril® E 400 und 3 Teile Alcapur® in Wasser, z. B. 0,5 % Wofasteril® E 400 kombiniert mit 1,5 % Alcapur®.

Folgende PES-Konzentrationen und -Kombinationen wurden mit Sporen von *B. subtilis* (zusätzlich und im Vergleich zu PES/SDS) auf ihre sporizide Wirkung getestet:

- 0,5 % PES (1,25 % Wofasteril® E 400) kombiniert mit 0,5 % Alcapur® N
- 1,0 % PES (2,5 % Wofasteril® E 400) kombiniert mit 0,5 % Alcapur® N
- 1,0 % PES (2,5 % Wofasteril® E 400 = W) kombiniert mit 2,5 % Alcapur® = A (Verhältnis 1:2, d. h. 1 Teil W und 1 Teil A)
- 1,0 % PES (2,5 % Wofasteril® E 400) kombiniert mit 7,5 % Alcapur® (Verhältnis 1:4, d. h. 1 Teil W und 3 Teile A)

Die entsprechenden Volumina der konzentrierten Lösungen wurden in dest. Wasser gegeben, zuerst Alcapur®, dann Wofasteril® E 400 (nach Herstellerangaben). Die hier eingesetzten Wofasteril®- und Alcapur®-Konzentrationen waren deutlich höher als die Herstellerempfehlungen für eine bakterizide, fungizide oder viruzide Wirkung (s. o.).

### 3.1.3 Bewertung des Keimträger-Prüfverfahrens mit Natriumhypochlorit als sporizide Substanz

Zur Prüfung der Effektivität der Modellsysteme mit anderen Desinfektionsmitteln wurde Natriumhypochlorit als ein anerkanntes sporizides Desinfektionsmittel eingesetzt (WHO, 1989). Natriumhypochlorit wurde sowohl in gepufferter Form, mit 0,05 M PBS, pH 7, als auch ungepuffert, pH 10, in Konzentrationen von 250 bzw. 500 bis 10.000 ppm freiem Chlor gegen *B. subtilis*-Sporen auf Tychem® F-Keimträgern getestet. Mit zunehmender NaClO-Konzentration stieg auch der pH-Wert an, bis pH 8,4 in der gepufferten Lösung und bis pH 12 in der ungepufferten Lösung. Da den Lösungen kein Tensid zugesetzt wurde, fand die Exposition mit 100 µl NaClO nach dem Prinzip Übersichtung ohne Mechanik (Prüfmodell 2) statt. Der ungepufferten NaClO-Lösung wurden die Sporen bis zu 50 min ausgesetzt (Abb. 17).

### **3.2 Anwendung von Prüfmodell 3 (Überschichtung mit Mechanik) zur Untersuchung der Wirksamkeit von PES gegen Sporen von *Bacillus anthracis***

Nach ausreichender Testerfahrung mit Sporen von *B. subtilis* als mögliches Surrogat für *B. anthracis*-Sporen wurden die Keimträgermodelle auf ihre Effizienz mit dem eigentlichen biologischen Gefahrstoff und der PES als Desinfektionsmittel getestet. Die Versuche mit *B. anthracis*-Sporen erfolgten ausschließlich unter BSL3-Bedingungen (Biosafety Level 3). Für die Untersuchungen standen Sporen von Stämmen unterschiedlicher Pathogenität (Fehlen oder Vorhandensein eines oder beider Virulenzplasmide, pXO1 und pXO2) zur Verfügung, die nach EN 14347:2005 auf Mangansulfat-Agar produziert worden waren.

Die Sporen folgender *B. anthracis*-Stämme wurden untersucht: *B. anthracis* CDC 10114 (W), *B. anthracis* Stamatin, Sokol (S), *B. anthracis* B 1138, *B. anthracis* B 2239 und *B. anthracis* 527 (Klee et al., 2006).

Die Versuche wurden mit Sporenkonzentrationen von ca.  $4-8 \times 10^8$  KBE/ml durchgeführt. Aufgrund der zeitlichen und räumlichen Limitierung im BSL 3-Labor wurden in diesen Versuchsansätzen anstelle von vier jeweils nur zwei Keimträger pro Einwirkzeit und Konzentration getestet und aus Sicherheitsgründen die Volumina der aus 10 ml NM inkl. Keimträger herzustellenden 10-fach-Verdünnungen auf 500 µl (450 µl + 50 µl) bzw. 750 µl (675 µl + 75 µl) in 2,0-ml-Plastikröhrchen mit Schraubverschluss reduziert. Da sich die Sporen der *B. anthracis*-Stämme gegenüber 1,0 % PES resistenter erwiesen als die Sporen von *B. subtilis* ATCC 6633 wurde die PES-Konzentration auf 2,0 % erhöht und diese Konzentration unter Zusatz von Tensiden vorwiegend nach der Methode „Überschichtung mit Mechanik“ (Prüfmodell 3) getestet. Die Expositionszeiten betragen, ähnlich wie mit *B. subtilis*-Sporen, 1, 2, 3, 5 und 10 min. Neben den Resultaten der Direktausstriche gingen auch die Ergebnisse der Verdünnungsreihen in die Bewertungen und graphischen Darstellungen mit ein. Diesbezüglich erfolgte eine „theoretische“ Berechnung der KBE/ml und des Reduktionsfaktors entsprechend dem unter 3.4 dargestellten Verdünnungsschema.

Folgende PES-Konzentrationen und -Kombinationen wurden mit Sporen von *B. anthracis* auf ihre sporizide Wirkung getestet:

- 1,0 % PES (2,5 % Wofasteril® E 400) kombiniert mit 0,2 % SDS
- 2,0 % PES (5,0 % Wofasteril® E 400) kombiniert mit 0,2 % SDS
- 2,0 % PES (5,0 % Wofasteril® E 400) kombiniert mit 0,5 % Alcapur® N
- 2,0 % PES (5,0 % Wofasteril® E 400) kombiniert mit 15,0 % Alcapur®  
(Verhältnis 1:4, d. h. 1 Teil W und 3 Teile A)

### 3.3 Testung der Tenazität der *Bacillus*-Sporen

Die Bestimmung der chemischen Tenazität der hergestellten Sporenpräparationen erfolgte nach EN 14347:2005 mit den unten angegebenen Modifikationen. Die Bestimmung konzentrierte sich durch die Zielsetzung, die Testung von PES als exemplarisches Desinfektionsmittel, im Wesentlichen auf die Untersuchung der Tenazität bzw. Toleranz der verwendeten Sporen gegen PES. Die Toleranz gegen Glutardialdehyd, als in der Norm vorgegebene zweite Substanz zur Testung der chemischen Tenazität von Prüfsporen, wurde im Verlauf der Arbeit weniger mit den hergestellten Sporenpräparationen untersucht. Da mit den Sporenpräparationen von *B. subtilis* ATCC 6633 nicht die vorgegebene PES-Toleranz, sondern niedrigere Toleranzwerte bzw. höhere Reduktionsfaktoren erreicht wurden (s. Abb. 16 A), wurde für diese Sporenpräparationen zusätzlich zu der vorgeschriebenen PES-Konzentration von 0,05 % auch die Tenazität gegenüber 0,025 % PES bei der vorgegebenen Einwirkzeit von 15 min bestimmt.

Die Tenazitätsuntersuchungen mit Sporen von *B. anthracis* erfolgten mit 0,05 % und 0,1 % PES entsprechend der Testung von *B. cereus* ATCC 12826. Der *B. cereus*-Stamm ist neben *B. subtilis* ATCC 6633 auch als Prüfstamm in der Norm vorgegeben. Mit diesen Sporen soll nach 15 min Exposition mit 0,01 % PES ein Reduktionsfaktor von  $1,25 \pm 0,5$  erreicht werden.

Auf der Suche nach einem geeigneten Surrogat für die gegenüber den *B. subtilis*-Sporen PES-resistenteren *B. anthracis*-Sporen wurden Sporen von *B. thuringiensis* DSM 350 hergestellt und ihre PES-Toleranz bestimmt. Für Sporen von *B. thuringiensis* liegen keine Normvorgaben vor. Die Tenazitätsbestimmung der Sporenpräparationen des *B. thuringiensis*-Stammes DSM 350 erfolgten nach Vorversuchen mit PES-Konzentrationen zwischen 0,1 % und 0,3 %. Die Verwendung von Sporen der Spezies *B. thuringiensis* als Surrogatsporen war auch insofern interessant, als sie, ähnlich wie die Sporen von *B. anthracis* und *B. cereus*, mit einer zusätzlichen äußeren Hülle, dem Exosporium, umgeben sind, das *B. subtilis*-Sporen fehlt. *B. thuringiensis* ist wie *B. subtilis* in die Risiko-

gruppe (RG) 1 eingestuft und somit gegenüber *B. cereus* (RG 2) auch für Versuche außerhalb von BSL 2-Laborbedingungen einsetzbar.

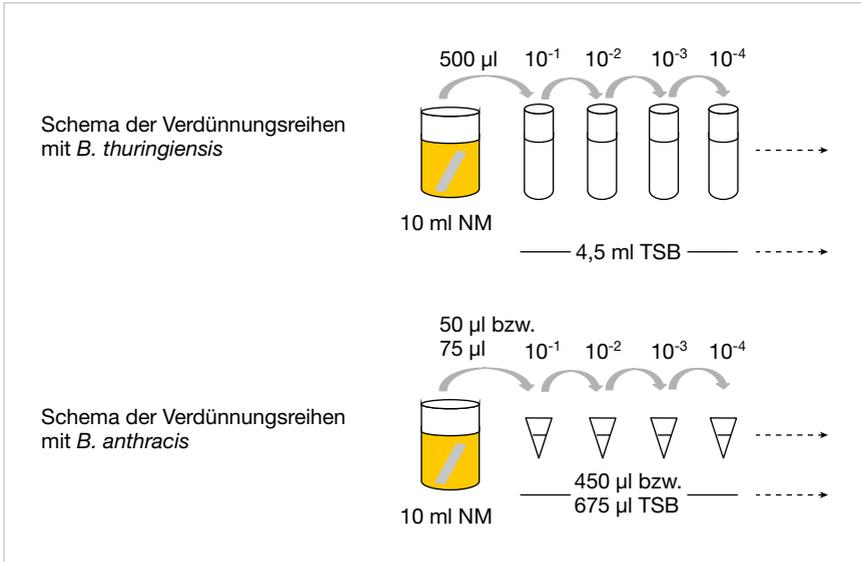
Gegenüber den Angaben der Norm wurden für die Test- und Kontrollansätze kleinere Volumina mit gleichen Verhältnissen gewählt und diese „Midi-“ (von 10 ml reduziert auf 5 ml) oder „Mini-Ansätze“ (500 µl) lieferten im Vergleich zum Originalvolumen bzw. zum 5 ml-Ansatz identische, gut reproduzierbare Ergebnisse. Die Mini-Ansätze waren einerseits materialsparend und erhöhten andererseits die Sicherheit der Tenazitätstestung mit *B. anthracis*-Sporen unter BSL3-Bedingungen.

### 3.4 Untersuchung der PES-Wirksamkeit gegen Sporen von *Bacillus thuringiensis* als Surrogat für *Bacillus anthracis*

Infolge der Keimträgermessungen und der Tenazitätsstudien zeigte sich, dass die Sporen der *B. anthracis*-Stämme insgesamt resistenter gegenüber PES waren als die für die Modellentwicklung verwendeten *B. subtilis*-Sporen. Infolgedessen wurden Sporenpräparationen von *B. cereus* ATCC 12826 und *B. thuringiensis* DSM 350 als mögliche Surrogate getestet. Aufgrund der Tenazitätsergebnisse und der Einstufung als RG 1-Organismus, auch im Hinblick auf die geplanten Umsetzungen der Laborergebnisse in die Praxis, wurden die Sporen von *B. thuringiensis*, Stamm DSM 350, als Surrogat für die Keimträgermodelle favorisiert. Diese Sporen wurden in den Keimträgermodellen 2 und 3 zur Untersuchung der PES-Wirksamkeit eingesetzt. Obwohl die Sporen dieses *B. thuringiensis*-Stammes eine noch höhere PES-Resistenz aufwiesen als die Sporen der untersuchten *B. anthracis*-Stämme (s. Abb. 16 B) konnte in Vorversuchen mit 2,0 % PES eine hohe Sporenreduktion nachgewiesen werden. Die weiteren Untersuchungen erfolgten hauptsächlich von bis zu 5  $\log_{10}$ -Stufen nach 3 min Einwirkzeit mit dem Prüfmodell 3 (Überschichtung mit Mechanik). Die daraus resultierenden Ergebnisse waren auch von Interesse im Hinblick auf den Einsatz dieses Prüfmodells als Standardprüfverfahren zur Testung der sporiziden Wirkung von Desinfektionsmitteln auf PSA mit *B. thuringiensis*-Sporen als Modellorganismus.

Die Sporenreduktion bzw. die Reduktionsfaktoren in Abhängigkeit von der Einwirkzeit der 2 %igen PES-Lösung wurden nicht nur anhand der Direktausstriche ermittelt (KBE/ml NM), sondern auch, wie in den Versuchen mit *B. anthracis*, das Wachstum in den TSB-Verdünnungsreihen (dekadische Verdünnungen) mit berücksichtigt. Die Verdünnungsreihen wurden nach folgendem Schema hergestellt (siehe Abbildung auf Seite 49).

Die RF-Werte der Verdünnungsreihen wurden wie folgt berechnet: Bei der Berechnung wurde davon ausgegangen, dass bei einem ausschließlich nur im Neutralisationsmedium (10 ml) nachweisbaren Wachstum (Verdünnung  $10^0$ ) weniger als 2 KBE/ml ( $\log_{10} = < 0,3$ ) vorhanden sind. Zeigt sich auch in der ersten Verdünnungsstufe Wachstum (0,5 ml NM in 4,5 ml TSB), sollten maximal 190



Sporen in 10 ml NM, d. h. 19 KBE/ml NM ( $\log_{10} = 1,3$ ) vorhanden sein. Übertragen auf *B. anthracis*-Sporen erhöht sich dieser Wert auf 190 oder 133 KBE/ml NM, da aus 10 ml NM lediglich 50 µl bzw. 75 µl in 450 µl bzw. 675 µl übertragen wurden (s. o.). Die RF-Werte der Verdünnungsreihen sind in den Diagrammen den RF-Werten der Direktausstriche gegenübergestellt. Der Aspekt, dass möglicherweise am Keimträger haftende Sporen die Ursache für ein nur im Neutralisationsmedium nachweisbares Wachstum sind, blieb dabei unberücksichtigt, sollte aber vernachlässigbar sein, da das Wachstum in den Verdünnungen der Kontrollen (kontaminierte Keimträger, die mit dest. Wasser oder Tensidlösung behandelt wurden) immer mindestens der eingesetzten Sporenmenge entsprach. In jeder Testung wurden 2 Kontrollkeimträger mitgeführt und dementsprechend 2 unabhängige Verdünnungsreihen angefertigt.

Im Hinblick auf die Validierung des Standardprüfverfahrens zum Nachweis der Sporizidie von Desinfektionsmitteln auf PSA wurden auch hier, wie in den Versuchen mit *B. subtilis*, vergleichende Untersuchungen durchgeführt, in denen, unabhängig von der Einwirkzeit, von allen Neutralisationsmedien Verdünnungsreihen bis zu  $10^{-6}$  angefertigt wurden und jeweils  $2 \times 500$  µl auf TSA ausplattiert wurden.

Wie mit *B. subtilis*-Sporen wurde auch mit den *B. thuringiensis*-Sporen die Belastbarkeit des Modells und der PES-Lösung mit 12,5 % Pferdeserum und 5,0 % Silikagel geprüft und dabei im Hinblick auf die praxisnahe Anwendung 2,0 % PES kombiniert mit Alcapur® N anstelle von SDS getestet.

Folgende PES-Konzentrationen und -Kombinationen wurden mit Sporen von *B. thuringiensis* in erster Linie auf ihre sporizide Wirkung und vorwiegend im Prüfmodell 3 getestet:

- 2,0 % PES (5,0 % Wofasteril® E 400) ohne und in Kombination mit 0,2 % SDS
- 2,0 % PES (5,0 % Wofasteril® E 400) kombiniert mit 0,5 % Alcapur® N
- 2,0 % PES (5,0 % Wofasteril® E 400) kombiniert mit 5,0 % Alcapur® (Verhältnis 1:2, d. h. 1 Teil W und 1 Teil A)
- 2,0 % PES (5,0 % Wofasteril® E 400) kombiniert mit 15,0 % Alcapur® (Verhältnis 1:4, d. h. 1 Teil W und 3 Teile A)

### **3.5 Anwendung von Prüfmodell 3 (Überschichtung mit Mechanik) zur Untersuchung der Wirksamkeit von PES gegen Vaccinia-Virus und Adenovirus**

Das als Standardprüfverfahren favorisierte Modell 3 wurde zur Untersuchung der Wirksamkeit von PES gegen behüllte (Vaccinia-Virus, Stamm Elstree) und unbehüllte Viren (Adenovirus Typ 5) eingesetzt (Abb. 4 und 5). Die quantitative Bewertung der PES-Wirksamkeit gegen Vaccinia-Virus erfolgte mit dem Plaque-Test (PFU/ml) unter Verwendung von Vero E6-Zellen in 24-Well-Platten nach einem in der Abteilung ZBS 1 des RKI etablierten Testverfahren (Abb. 4). Für Adenovirus wurde ein in FG 14 des RKI etabliertes Nachweisverfahren eingesetzt. Mit Adenovirus erfolgte die Bestimmung der infektiösen Dosis (TCID<sub>50</sub>/ml NM) mittels Endpunktverdünnung (Bonin, 1973) durch die mikroskopische Bewertung des zytopathischen Effektes (CPE) auf A 549-Zellen in 96-Well-Platten (Abb. 5). In beiden Tests wurde die viruzide Wirkung der PES durch Ermittlung der Reduktionsfaktoren (RF/ml) bestimmt.

Die PES wurde in Konzentrationen von 0,001 % bis 1,0 % getestet. Im Falle von Vaccinia-Virus wurde die PES vorwiegend ohne Tensidzusätze eingesetzt, da anzunehmen war, dass SDS alleine schon, durch Zerstörung der Hülle, die Infektiosität der Viren reduziert (Kayser et al., 1998). Die Tensidzusätze wurden ohne PES getestet. Mit Adenovirus wurde die Wirkung der PES ohne und mit Tensidzusätzen sowie letztere auch ohne PES untersucht (Tabellen 1 und 2). Auch im Falle der Viren wurden Keimträger aus Tychem<sup>®</sup> F (Keimträgergröße: 2,0 x 2,0 cm) mit 10 µl (5 x 2 µl) Virussuspension kontaminiert (~10<sup>8</sup> Viren/ml) und mit 10 µl PES ± Tenside behandelt. Da die Viren in Zellkulturmedium vorlagen, reichte der Gehalt an adhäsiven Substanzen aus, um mit 10 µl PES auch ohne Tensidzusatz einen dünnen Flüssigkeitsfilm innerhalb des 2 cm<sup>2</sup> großen Keimträgerareals zu generieren. Nach Einwirkzeiten von 1 und 2 min, z. T. auch 1,5 min, wurden die Keimträger in 5,0 ml Neutralisationsmedium überführt. Als Neutralisationsmedium wurde sowohl 0,3 % Natriumthiosulfat in PBS verwendet (im Falle von Adenovirus auch unter Zusatz von 0,1 % Triton) als auch Zellkulturmedium (DMEM bzw. EMEM mit L-Glutamin, 10 % fetalen Kälberserum u. a. Zusätzen). Natriumthiosulfat wurde 1:10 mit Zellkulturmedium verdünnt bevor es mit den Zellen inkubiert bzw. auf den Zellrasen aufgebracht wurde, so dass die Testung mit der Verdünnung 10<sup>-1</sup> startete.

Modell 3: Plaque-Test (Vaccinia-Virus)

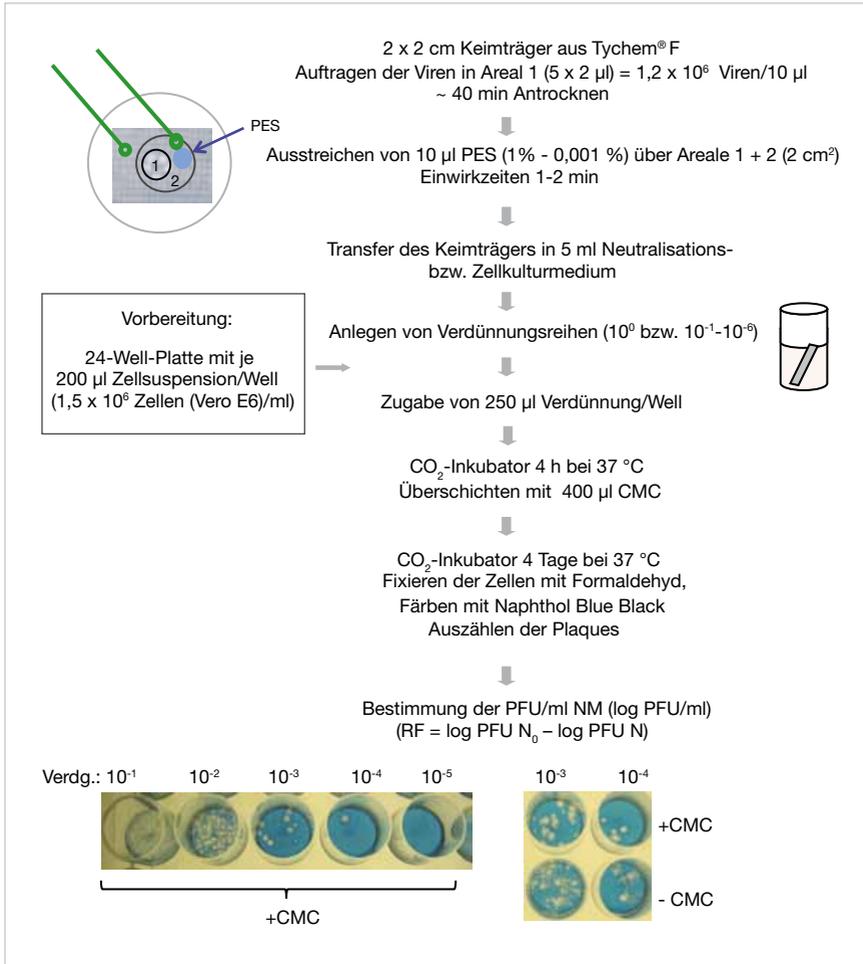


Abb. 4: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus mit Vaccinia-Virus als kontaminierendes Agens im Keimträgermodell 3 (Überschichtung mit Mechanik). PES wurde vorwiegend ohne Tenside eingesetzt. Der Nachweis der viruziden Wirkung von PES erfolgte mit dem Plaque-Test mit Vero E6-Zellen. Die Überschichtung der Zellen mit CMC (Caroxymethylcellulose)-haltigem Medium verhinderte ein Ausbreiten der Viren über den gesamten Zellrasen.

### Modell 3: Endpunktverdünnung (Adenovirus)

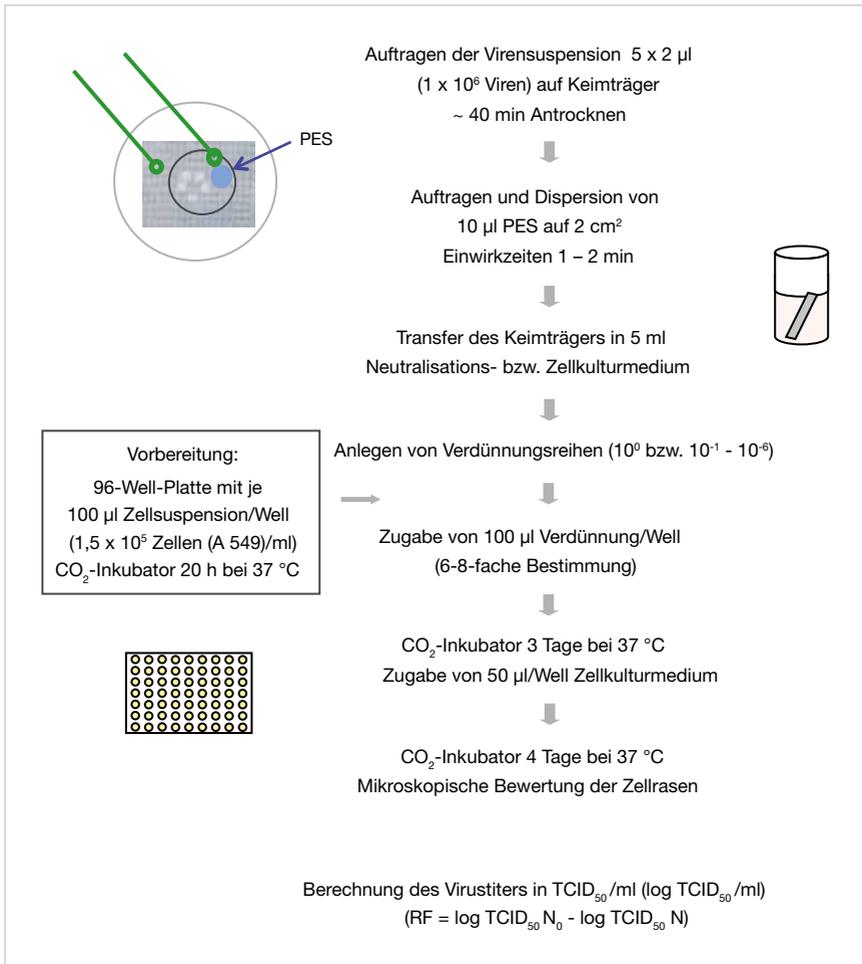


Abb. 5: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs mit Adenovirus als kontaminierendes Agens im Keimträgermodell 3 (Übersichtung mit Mechanik). Die PES wurde mit und ohne Zusatz von Tensiden eingesetzt. Der Nachweis der viruziden Wirkung von PES erfolgte durch Bestimmung der infektiösen Dosis  $\text{TCID}_{50}/\text{ml}$  mittels Endpunkt-Titration mit A 549-Zellen.

Der Einsatz von Zellkulturmedium als Neutralisationsmittel ermöglichte die Ermittlung höherer Reduktionsfaktoren, da es direkt nach Anfertigen der dekadischen Verdünnungsreihe als  $10^0$ -Verdünnung mit den Zellen inkubiert bzw. auf den Zellrasen aufgebracht werden konnte. Dadurch konnte die Nachweissensitivität um eine Zehnerpotenz gesteigert werden. Nach Anfertigen der dekadischen Verdünnungsreihen mit Zellkulturmedium wurden im Falle von Vaccinia-Virus definierte Volumina zur gleichen Zeit mit Vero E6-Zellen in die Kulturgefäße (24-Well-Platten) pipettiert oder die Verdünnungen wurden, wie im Falle des Adenovirus auf einen subkonfluenten Zellrasen (A 549-Zellen) in 96-Well-Platten aufgetragen (je 6 bzw. 8 Wells pro Verdünnung). Bei Adenovirus wurde nach 3-tägiger Inkubation der Platten bei  $37^\circ\text{C}$  im  $\text{CO}_2$ -Inkubator  $50\ \mu\text{l}$  Zellkulturmedium pro Well zugegeben, um die Zellvitalität zu sichern, d. h. ein evtl. vorzeitiges Absterben der Zellen, unabhängig von der Aktivität der Viren, zu verhindern, um somit nach insgesamt 7-tägiger Inkubationszeit den CPE bewerten zu können (Abb. 5). Mit beiden Viren erfolgte die Durchführung von 2-3 unabhängigen Versuchsreihen pro relevanter PES-Konzentration und 1 min Einwirkzeit (Tabellen 1 und 2).

### **3.6 Anwendung der Prüfmodelle 2 und 3 (Überschichtung ohne und mit Mechanik) zur Untersuchung der Wirksamkeit von PES gegen Rizin**

Auch zur Bestimmung der PES-Wirkung gegen Rizin wurde bevorzugt Modell 3 eingesetzt (Abb. 6), jedoch im Verlauf der Untersuchungen auch die Wirksamkeit im Modell 2 ermittelt. Ähnlich wie bei Viren wurde im Prüfmodell 3 (Überschichtung mit Mechanik) PES mit und ohne Tensidzusätze sowie die Wirkung der reinen Tensidlösungen getestet. Auf Tychem® F-Keimträger wurde 1 x 1 µl Rizinrohextrakt (5 mg Rizin/ml) tropfenförmig aufgetragen (Spot) und nach dem Antrocknen mit 10 µl PES-Lösung behandelt. Nach Vorversuchen mit unterschiedlichen PES-Konzentrationen wurden schließlich 2,0 % PES eingesetzt und Expositionszeiten von 5, 10 und 15 min gewählt, wobei allerdings mit zunehmender Expositionszeit ein Antrocknen der PES/Tensid-Lösung vom Rand her zu beobachten war und mit PES ohne Tensid die adhäsiven Zusätze im Rizinrohextrakt nicht ausreichten, um Kohäsion der PES-Lösung vollständig zu verhindern. Unter Anwendung der Technik von Modell 2 wurde der Rizin-spot mit 10 µl PES-Lösung ohne mechanische Verteilung überschichtet. Vergleichsweise erfolgte auch die Auftragung von 3 x 2 µl Rizinrohextrakt und Dekontamination mit 10 µl PES + Tenside mit Mechanik und 50 µl PES ± Tenside mit und ohne Mechanik (Modelle 3 und 2). Nach den verschiedenen Einwirkzeiten wurden die Keimträger in 20 ml PBS-Lösung überführt, die Lösung mittels Ultrafiltration aufkonzentriert (10 kD-Filter, Fa. Amicon) und in Zytotoxizitätsmedium äquilibriert (Endvolumen 500 µl). Die Effizienz der PES-Wirkung wurde mit dem MTT-Zytotoxizitätstest in 96-Well-Platten nach Pauly et al. (2009) ermittelt. Zur Erhöhung der Sensitivität, d.h. der Extinktionsdifferenz zwischen ungehemmtem Zellwachstum (Vitalität der Zellen = 100 %) und zytotoxischer Wirkung, wurden in Abwandlung der Testvorgaben zu 50 µl Zellsuspension direkt ohne Vorinkubation 50 µl der Probenlösung pipettiert (Abb. 6). Nach Inkubation bei 37 °C für 48 h im CO<sub>2</sub>-Brutschrank wurde der Zytotoxizitätsassay durchgeführt. Die Detektion von vitalen Zellen erfolgte durch den Nachweis der Aktivität zellulärer Reduktionsäquivalente, die wasserlösliches gelbes Titrazoliumsalz (MTT) in blaues wasserunlösliches Formazan umwandeln. Aus den gemessenen Extinktionen wurde, wie in Abbildung 6 dargestellt, die Vitalität der Zellen (%) im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (100 %) ermittelt (Formel s. Abb. 6).

Modell 3: Zytotoxizitätsassay (Rizin)

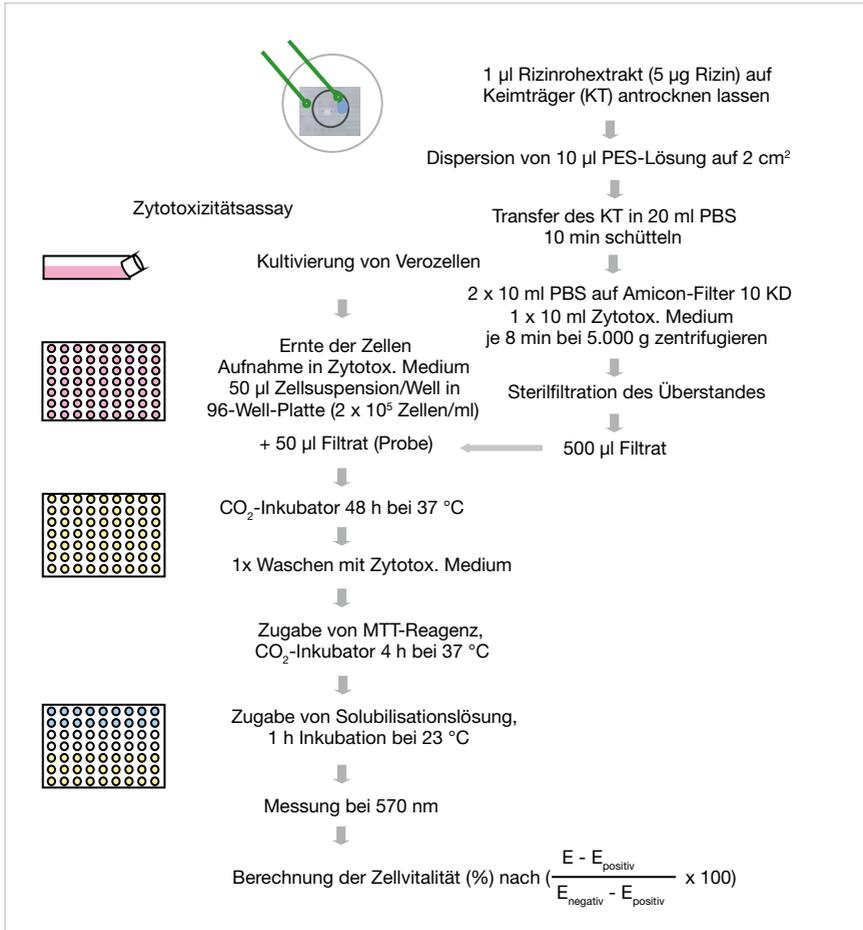


Abb. 6: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs zur Testung von Rizin als kontaminierendes Agens im Keimträgermodell 3 (Überschichtung mit Mechanik). PES wurde mit und ohne Tenside eingesetzt. Der Nachweis der Rizininaktivierung durch PES erfolgte mit dem Zytotoxizitätsassay mit Vero-Zellen. Die Berechnung der Zellvitalität (%) erfolgte anhand der gemessenen Extinktionen: E = Extinktion der Probe, E<sub>positiv</sub> = Mittlere Extinktion der mit 3,3 ng Rizin behandelten Zellen (Positivkontrolle), E<sub>negativ</sub> = Mittlere Extinktion der unbehandelten Zellen (Negativ- bzw. Zellkontrolle).

In der Regel wurden mindestens 2 unabhängige Versuche durchgeführt mit je 4-8 Wells pro Probe (1 Keimträger/Zeit und Desinfektionsmittelzusammensetzung). Die berechneten Werte der Zellvitalität aus den einzelnen unabhängigen Versuchen in Abhängigkeit von den entsprechenden Versuchsbedingungen wurden zusammengefasst und daraus die Mittelwerte sowie Standardabweichungen berechnet. Wurden nur einzelne Versuche durchgeführt, ist dies in den Legenden der Abbildungen erwähnt.

## 3.7 Übertragung der sporiziden Modellbedingungen in die Praxis

### 3.7.1 Praxisversuche am Puppenmodell

Die mit dem Keimträger-Prüfmodell 3 (Überschichtung mit Mechanik) ermittelten Versuchsbedingungen, aus denen eine hohe bis experimentell maximal mögliche Sporenreduktion resultierte ( $RF > 5 \log_{10}$ -Stufen), wurden unter praxisnahen Bedingungen am Puppenmodell, d. h. mit einer Schaufensterpuppe in PSA in klimatisierten Räumen bei ca. 23 °C getestet. Die Vorgehensweise ist in Abbildung 7 dargestellt. Verschiedene Anzugtypen aus unterschiedlichen Materialien standen zur Verfügung (Abb. 8). Die Kontamination der Anzüge erfolgte mit Sporen von *B. thuringiensis* DSM 350 vorwiegend in einer Konzentration von ca.  $2 \times 10^8$  KBE/ml. Als Dekontaminationsmittel wurde 2,0 % PES kombiniert mit 0,5 % Alcapur® N eingesetzt. Dazu wurden pro Liter Gebrauchslösung 945 ml dest. Wasser vorgelegt und nacheinander 50 ml Wofasteril® E 400 und 5 ml Alcapur® N unter Mischen zugegeben.

Folgende Anzugtypen wurden im Puppenmodell eingesetzt (Abb. 8):

Schutzanzug Tychem® C Standard (gelb, Modell CHA5, mit Kapuze), Tychem® F Standard (grau, Modell CHA5, mit Kapuze), die Vollschutzanzüge Astro Protect® C (Tychem® C) und PM Blowersuit-Chemical Blue (Fa. PM Atemschutz). Teils wurden auch Schutzhandschuhe aus Butylkautschuk oder Vinyl und Schutzstiefel mit einbezogen.

Die Anzüge wurden an definierten Stellen mit je 3 untereinander angeordneten Kreisen markiert ( $7 \text{ cm}^2/\text{Kreis}$ ) und jeweils nur der oberste Kreis mit  $10 \times 2 \mu\text{l}$  Sporen kontaminiert. Durch Beprobieren der beiden unteren Kreise sollten Sporendriftungen bzw. -abschwemmungen während der Dekontamination oder dem Abspülen erfasst werden. Nach Lufttrocknung der Sporensports für ca. 40 min erfolgte die Dekontamination mit insgesamt 4 Liter PES/Alcapur® N-Lösung durch Begießen (5 l-Gießkanne) ohne oder mit mechanischer Verteilung der PES auf der gesamten Anzugoberfläche. Letzteres erfolgte mit einem

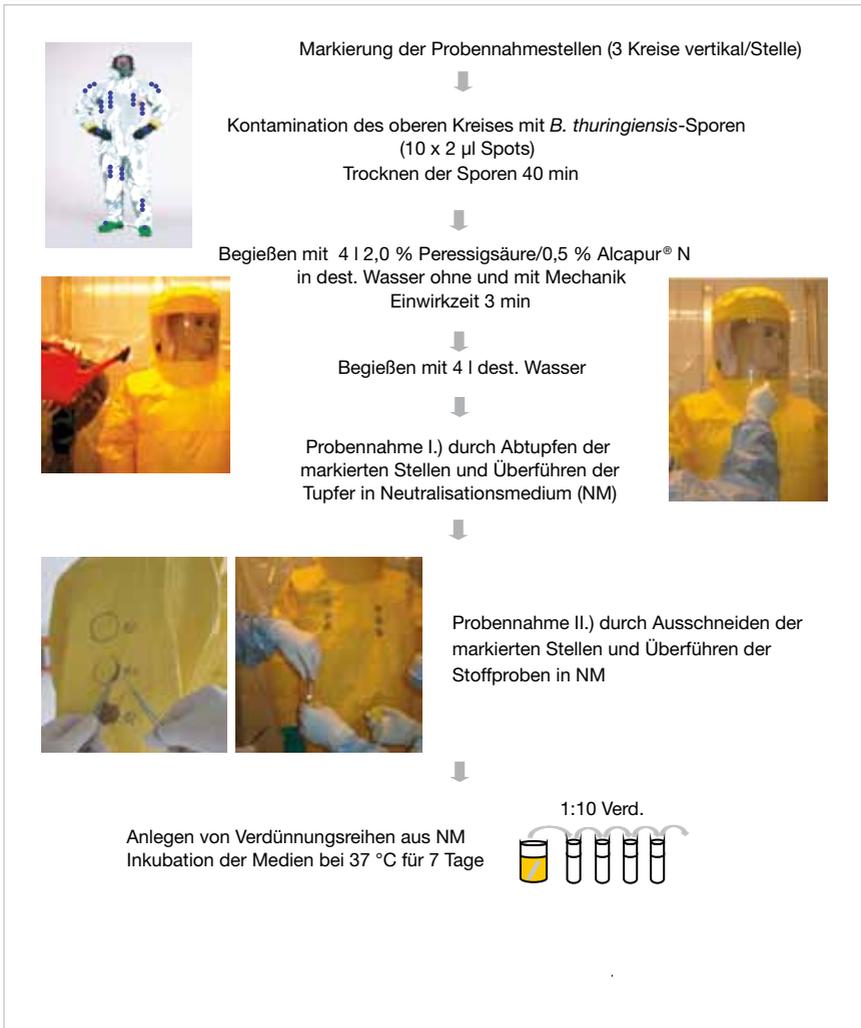


Abb. 7: Schematische Darstellung der Praxisversuche am Puppenmodell. Die Versuche wurden mit einer Schaufensterpuppe in PSA in klimatisierten Räumen bei ca. 23 °C durchgeführt. Die Dekontamination erfolgte durch Benetzen mittels Gießkanne ohne und mit mechanischer Verteilung der PES/Tensid-Lösung. Die Einwirkzeit von 3 min schloss die Benetzungszeit (ca. 40-60 s) mit ein. (Oberes Foto mit Person in PSA aus dem Internet)

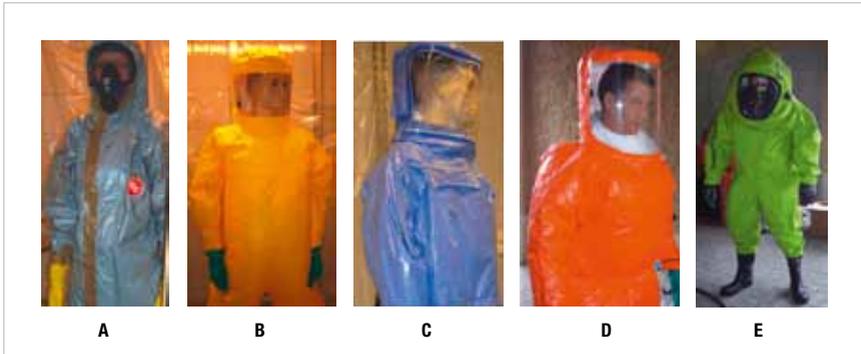


Abb. 8: Darstellung der in den Praxisversuchen verwendeten Schutzanzüge: Tychem<sup>®</sup> F (A), Astro Protect<sup>®</sup> C (B), PM Blowersuit-Chemical Blue (C), Pro Chem III (D) und Vautex Elite S (E)

ca. 10 cm breiten Flachpinsel. Benetzen der Anzugoberfläche ohne Mechanik bedeutete, dass der Anzug beginnend von oben (über dem Kopf bei Vollschutz unter Zuhilfenahme einer Klappleiter, am Hinterkopf bei den Anzügen mit Kapuze, eine Schutzmaske wurde nicht verwendet) und durch Umrunden der Puppe an allen Stellen mit PES begossen wurde. Die Technik mit Mechanik beinhaltete das zusätzliche Verteilen des Desinfektionsmittels mit dem Pinsel, mäanderförmig am Rumpfbereich, ansonsten durch vorsichtiges Wischen, um Verspritzungen zu vermeiden. Um durch die Mechanik bedingte Sporenverschleppungen zu erfassen, wurden noch zusätzliche Anzugstellen markiert und beprobt. Nach 3 min PES-Exposition inkl. Auftragung ( $\leq 1$  min) und mechanischer Verteilung der PES-Lösung wurde die Anzugoberfläche mit 4 Liter dest. Wasser abgespült und die markierten Kreise wurden beprobt. Zum Vergleich fanden die Dekontaminationsmaßnahmen auch nur mit 0,5 %iger Alcapur<sup>®</sup> N-Lösung ohne PES statt, z. B. stellenweise an dem gelben Tychem<sup>®</sup> C-Anzug und an einem kompletten Tychem<sup>®</sup> F-Anzug. Mit letzterem wurde eine Hälfte des Anzugs ohne Mechanik und die andere Hälfte mit Mechanik behandelt. Auch in diesen Versuchen erfolgte abschließend die Spülung mit dest. Wasser.

Die Beprobung aller markierten Stellen erfolgte durch Abtupfen der Kreisflächen mit sterilen Schaumstofftupfern (Fa. Micro Rheologics). Die Tupfer wurden an der Sollbruchstelle abgeschnitten und in 10 ml NM überführt. Anschließend wurden die Kreise von unten nach oben ausgeschnitten und jedes Stoffstück ebenfalls in 10 ml NM überführt. Von allen Proben wurden deka-

dische Verdünnungsreihen mit TSB angefertigt (0,5 ml in 4,5 ml TSB) und diese 7 Tage bei 37°C bebrütet mit, soweit möglich, täglicher Kontrolle. Beendet wurde der Versuch durch Ausstreichen der Neutralisationsmedien oder der letzten Verdünnungsstufe mit Bakterienwachstum auf TSA zum Nachweis und zur Differenzierung der Bakterien.

In den Versuchen am Puppenmodell konnten umfangreiche Erfahrungen zur Dekontamination der Schutzanzüge hinsichtlich Materialflexibilität, Benetzbarkeit von großen Oberflächen, Stofffaltungen und Stellen, die durch Gießen ohne Mechanik schwer zugänglich sind, gesammelt werden.

### 3.7.2 Praxisversuche mit Probanden in PSA

Die am Puppenmodell etablierten Testprotokolle wurden in Feldversuchen mit Probanden in PSA getestet. Die Versuche fanden auf dem Gelände der Berliner Feuerwehr in Berlin-Weißensee statt. In Zusammenarbeit und mit großer Unterstützung dortiger Mitarbeiter, auch als Schutzanzugträger (Probanden), konnten verschiedene Anzugtypen unter unterschiedlichen Wetterlagen und mit unterschiedlichen Dekontaminationstechniken untersucht werden. Die Versuche wurden in einem überdachten, doch seitlich teilweise offenen Areal durchgeführt. In diesem Bereich erfolgte das Anlegen der PSA, die Kontamination der PSA mit *B. thuringiensis*-Sporen, die Dekontamination mit PES/Alcapur® N in einer Plastikwanne, das Abduschen der PSA mit warmem Wasser in einem luftgestützten Dekontaminationszelt sowie das Beprobieren der Anzüge (Abb. 9). Das Markieren der PSA und die Kontamination erfolgten wie unter 3.7.1 beschrieben. In Abhängigkeit von den klimatischen Verhältnissen trockneten die Sporensuspensionen unterschiedlich schnell (30-60 min). Auch in diesen Versuchen wurde ausschließlich mit 2,0 % PES kombiniert mit 0,5 % Alcapur® N dekontaminiert. Dazu wurden pro Liter Gebrauchslösung 945 ml Leitungswasser vorgelegt und nacheinander 50 ml Wofasteril® E 400 und 5 ml Alcapur® N unter Mischen zugegeben. Die Dekontamination erfolgte mit der Gießkannentechnik (Begießen) oder mit der Sprühtechnik (Besprühen) unter relativ niedrigem Druck, um Versprühungen möglichst gering zu halten (Drucksprüngerät Typ DS 5, Fa. Kärcher). Die Dekontaminationsaktion startete mit Hilfe einer Klapplleiter am Kopfbereich. Mit abgewinkelter Armhaltung des Probanden wurden dann die Vorderseite, nach Umdrehen die Rückseite, und schließlich noch Arm-, Achsel- sowie



Abb. 9: Schematische Darstellung der Praxisversuche bei der Berliner Feuerwehr am Standort Weißensee. Die Versuche wurden mit Probanden in PSA bei unterschiedlichen Wetterbedingungen in einem überdachten, jedoch seitlich teilweise offenen Areal durchgeführt. Die Dekontamination erfolgte durch Begießen oder Besprühen ohne und mit mechanischer Verteilung der PES/Tensid-Lösung mittels Bürste. (Oberes Foto links mit Person in PSA aus dem Internet. Fotos mit Person in PSA mit Maske von W. Maziejewski, Berliner Feuerwehr.)

Beinregionen mit insgesamt 5 Liter PES-Lösung begossen oder mit weniger als 2 Liter (1,2-1,8 l) besprüht. Beide Dekontaminationsverfahren wurden ohne und mit Mechanik durchgeführt. Mit Mechanik bedeutete Wischen mit weicher Bürste (Dekontaminationsbürste, Fa. Vetter). In diesem Fall erfolgte alternierend Begießen bzw. Besprühen, Wischen und erneut Begießen bzw. Besprühen. In den Versuchen mit Probanden zeigte sich, dass die Dekontaminationsabläufe mehr Zeit in Anspruch nahmen als unter statischen Bedingungen am Puppenmodell. Insbesondere dann, wenn die Sprühtechnik angewendet wurde, dauerte bedingt durch den feinen Sprühstrahl die Benetzung der PSA länger. Infolgedessen wurden die Dekontaminationszeiten von 3 min auf 4 min und schließlich auf 5 min verlängert.

Technische Probleme in Form eines Gießkopffektes, wodurch kein gleichmäßiges Gießen möglich war, oder durch abfallenden Sprühdruck wurden in den Bewertungen der Dekontamination berücksichtigt.

Die Technik des Sprühens ermöglichte, dass die Achselbereiche und ausgeprägte Stofffalten, auch ohne Wischen, ausreichend benetzt werden konnten. Bei kontinuierlichem Sprühen über einen Zeitraum von 5 min wurden weniger als 2 Liter PES-Lösung verbraucht. Weitere Details sind auch unter 5.7.2 aufgezeigt. Durch den relativ niedrigen Druck des Sprühgerätes kam es zu keiner übermäßigen durch den Tensidgehalt bedingten Schaumbildung. Zusätzliches Wischen erhöhte auch hier die Wahrscheinlichkeit der vollständigen Benetzung der Schutzanzüge. Das Abspülen der PES-Lösung in dem Duschzelt wurde auf 40 Sekunden begrenzt. Dadurch wurde die PES-Wirkung aufgehoben oder zumindest deutlich reduziert und der Verlust von oberflächlich haftenden, möglicherweise noch intakten Sporen begrenzt. Als Anzugtypen wurden der graue Tychem® F-Anzug mit Kapuze, der Pro Chem III-Vollschutzanzug und der Vautex Elite S in die Untersuchungen eingeschlossen (Abb. 8). Mit letzterem erfolgte die Dekontamination nicht in der Plastikwanne außerhalb des luftgestützten Zeltes, sondern unter Sprühen mit Mechanik im Eingangsbereich des Zeltes. Nach 5 min Behandlung mit PES erfolgte umgehend das Duschen mit warmem Wasser für 40 s. Alle anderen Kandidaten wurden in der Plastikwanne dekontaminiert und gingen anschließend über eine Distanz von ca. 5 m zum Duschzelt.



# 4

## Ergebnisse/Bewertungen



## 4.1 Etablierung eines Standardprüfverfahrens mit Sporen von *Bacillus subtilis* ATCC 6633 als Testorganismus

Um ein Standardprüfverfahren zu etablieren, mit dem es möglich ist, die Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln oder anderen chemischen Substanzen auf PSA-Oberflächen zu untersuchen, wurden 3 Prüfmodelle oder Prüfverfahren entwickelt. Gemäß den Forderungen der Praxis wurden kurze Expositionszeiten ( $\leq 10$  min) gewählt, in denen eine hohe Sporenreduzierung ( $> 5 \log_{10}$ -Stufen) bzw. eine vollständige Entfernung oder Inaktivierung der Sporen erreicht werden sollte.

Wie in Abbildung 10 ersichtlich, führten alle 3 Prüfmodelle, das Tauchverfahren und die Methoden der Überschichtung ohne und mit Mechanik, zum Erfolg. Nach 1-2 min Behandlung mit 1,0 % PES konnte nach Ausplattieren der Medien auf TSA keine keimungsfähige Spore und kein Wachstum in den Neutralisationsmedien, in denen die Keimträger über 7 Tage bei 37 °C bebrütet wurden, nachgewiesen werden. Demnach wurde eine vollständige Sporeninaktivierung erreicht mit einer Reduktion von  $\geq 6 \log_{10}$ -Stufen. PES erwies sich somit als ein effizientes Mittel zur Dekontamination der hydrophoben Oberfläche des Tychem® F-Materials.

Wie schon unter 3.1 erwähnt, ist das Tauchverfahren (Abb. 1) aufgrund der hohen Desinfektionsmittelmenge gegenüber den Überschichtungsverfahren ohne und mit Mechanik (Modelle 2 und 3; Abb. 2, 3) ein weniger praxisnahes Prüfmodell. Es ermöglicht keine Aussagen über die volumenabhängige Wirkung und die Interaktion des Desinfektionsmittels mit der PSA-Oberfläche. Diese Eigenschaften sind mit dem Modell 2 und insbesondere mit Modell 3 besser überprüfbar. Diese beiden Modelle sind aufgrund des Desinfektionsmittelvolumens deutlich mehr der Praxis angepasst als Modell 1. Im Modell 2 wird z. B. durch Zugabe von SDS die Schichtdicke der PES-Lösung auf der hydrophoben PSA-Oberfläche deutlich reduziert (Abb. 2 und 10 C-F) und mittels Mechanik (Modell 3) kann mit 10  $\mu\text{l}$  PES/SDS eine Fläche von 2  $\text{cm}^2$  filmartig überschichtet werden. Diese niedrige Desinfektionsmittelmenge stellt eine große Herausforderung an die Wirksamkeit der zu testenden Mittel dar und entspricht möglicherweise am

ehesten den Praxisbedingungen insofern, als bei Benetzung der PSA-Oberfläche mit oder ohne Mechanik auf vielen vertikalen Stellen das Desinfektionsmittel die PSA-Oberfläche wahrscheinlich häufig nur als dünne Schicht bedeckt, da es von der glatten Oberfläche schnell abläuft. Trotz des niedrigen Desinfektionsmittelvolumens lieferte dieses Verfahren gut reproduzierbare Ergebnisse (Abb. 10 G, H) und schien aufgrund seiner Technik weniger anfällig für „Ausreißer“ als Prüfmodell 2 mit z. B. Wachstum in den Neutralisationsmedien nach 3 und 10 min Behandlung mit 0,5 % PES (Abb. 10 F). Der Vergleich der Ergebnisse der Überschichtungsmodelle (Abb. 10 C-H) zeigt auch, dass das Volumen des Desinfektionsmittels nur geringen Einfluss auf die sporizide Wirkung hat. Lediglich unter Einsatz des Tauchverfahrens zeigte sich, dass mit 0,5 % PES schon nach 30 s die maximale Reduktion erreicht wurde, während dies in den Modellen 2 und 3 (Überschichtung ohne und mit Mechanik) erst nach 2 min Einwirkzeit nachweisbar war. Aufgrund der Ergebnisse und der praxisnahen Untersuchungsbedingungen wurde Prüfmodell 3 als ein geeignetes Standardprüfverfahren angesehen und die sporizide Wirkung der PES unter unterschiedlichen Bedingungen mit diesem Prüfmodell getestet (Abb. 11-13).

Die in den Abbildungen 10-12 dargestellten und mit dem Prüfmodell 3 erhaltenen Ergebnisse repräsentieren zum einen die Robustheit des Modells bezüglich der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse unter unterschiedlichen Versuchsbedingungen und belegen zum anderen die Effizienz der PES bezüglich ihrer sporiziden Wirkung. Auf allen untersuchten PSA-Oberflächen und unter organischer Belastung sowie bei Temperaturen von -5 °C, 0 °C und 10 °C konnte in allen Versuchen mit 0,5 % und/oder 1,0 % PES in Kombination mit 0,2 % SDS nach 2 – 3 min Einwirkzeit eine hohe bis vollständige Sporeninaktivierung erreicht werden ( $RF \geq 6$ ).

Da Peressigsäure aufgrund der sporiziden Wirkung und relativ guten Umweltverträglichkeit als ein geeignetes Desinfektionsmittel für die Etablierung und Überprüfung der Testverfahren ausgewählt wurde, bot sich zudem die Möglichkeit, mit Tensidzusätzen zu arbeiten, wodurch die Oberflächenspannung der wässrigen PES reduziert und mit wenig Desinfektionsmittelvolumen eine gleichmäßige Benetzbarkeit der PSA-Oberflächen erreicht werden konnte. Demnach reichten 10 µl PES/SDS-Lösung aus, um eine Fläche von 2 cm<sup>2</sup> (50 ml/m<sup>2</sup>) homogen durch Überschichten mit Mechanik, im Modell durch Ausstreichen mittels Plastiköse, zu benetzen (Abb. 3). Ohne Tensidzusätze konnte mit dieser Technik kein stabiler Flüssigkeitsfilm hergestellt wer-

den. Der Tensidzusatz war im Falle der Keimträgerkontamination mit *Bacillus*-Sporen, die ausschließlich in dest. Wasser aufbewahrt wurden, obligat. Die verwendeten Tenside in Form von SDS oder dem kommerziell erhältlichen Produkt Alcapur® N (Abb. 13 A, B), das mit ähnlicher Tensidkonzentration wie SDS eingesetzt wurde, schienen die sporizide Wirkung der PES nicht zu verändern. Im Experiment mit Modell 1 (Tauchverfahren) hatten SDS-Konzentrationen bis 2,0 % keinen negativen Einfluss auf die Keimungsfähigkeit von *B. subtilis*-Sporen.

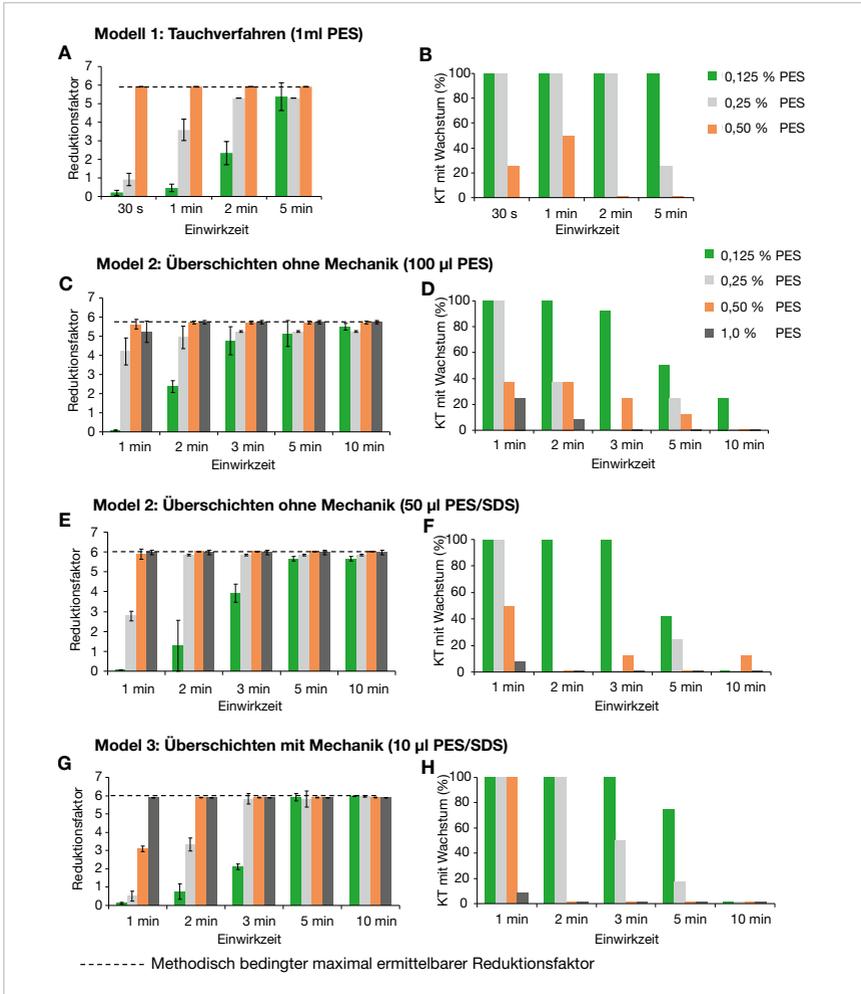
Der Zusatz des Pufferadditivs Alcapur® im Verhältnis 1:2 zu Wofasteril® E 400 beeinflusste trotz pH-Wert-Erhöhung von pH 2,7 auf pH 5,1 die sporizide Wirkung der 1 %igen PES gegen Sporen des *B. subtilis*-Stammes kaum. Wurde allerdings die Kombination 1 Teil Wofasteril® E 400 und 3 Teile Alcapur® eingesetzt (pH > 9), reduzierte dies die sporizide Wirkung, so dass nach 10 min Exposition zwar eine hohe Sporenreduktion von über 5  $\log_{10}$ -Stufen, jedoch noch Bakterienwachstum im Direktausstrich nachweisbar war und entsprechend noch 67 % der Keimträger (8 von 12) im Neutralisationsmedium Wachstum zeigten (Abb. 13 C, D). Die Ergebnisse zeigen, dass der pH-Wert die sporizide Wirkung der PES-Lösung beeinflusst und für eine schnelle (<5 min) effiziente Wirkung offensichtlich ein saurer pH-Bereich notwendig ist (vgl. 4.4). Auch diese Untersuchungen konnten mit dem Prüfmodell 3 durchgeführt werden, da Alcapur® ausreichend Tenside enthält.

Trotz des niedrigen Desinfektionsmittelvolumens im Prüfmodell 3 waren die Ergebnisse innerhalb einer Versuchsreihe, aber auch in unabhängigen Wiederholungen und von unterschiedlichen Personen durchgeführten Versuchen immer reproduzierbar. Aufgrund dessen und der offensichtlich strengsten und der Praxis am nächsten kommenden Prüfbedingungen (geringes Volumen und mechanische Verteilung) wurde schließlich das Prüfmodell 3 als geeignetes Standardprüfverfahren ausgewählt, das alleine, aber auch zusammen mit dem Prüfverfahren 2 (Überschichtung ohne Mechanik) zur Testung der sporiziden Wirkung von Desinfektionsmitteln auf PSA genutzt werden kann. Inwieweit es auch bei Virus- oder Toxinkontaminationen einsetzbar ist, werden die nachfolgenden Untersuchungsergebnisse zeigen.

Prüfverfahren 2 wurde z. B. eingesetzt, um die Verwendbarkeit der Keimträgermodelle mit einem zweiten Desinfektionsmittel mit sporizider Wirkung zu bestätigen (Abb. 14). Diesbezüglich wurde Natriumhypochlorit sowohl

in gepufferter als auch ungepufferter Form ohne Tensidzusatz getestet und dementsprechend die Sporen mit 100 µl NaClO-Lösung tropfenförmig ohne Mechanik überschichtet. Mit dem Prüfverfahren konnte die sporizide Wirkung bestätigt und gezeigt werden, dass die gepufferte Hypochloritlösung in Abhängigkeit von der Zeit eine deutlich bessere Inaktivierungskinetik aufwies als die ungepufferte Lösung (Sagripanti & Bonifacino, 1996 II). Somit wurde mit Konzentrationen von 1.000 bis 10.000 ppm freiem Chlor bei neutralem bis leicht basischem pH (pH 7,1-8,4) die versuchsbedingte maximal erreichbare Sporenreduktion im Direktnachweis schon nach 3 min (Abb. 14 A), dagegen mit der ungepufferten Lösung (pH 10,7-12,0) erst nach 30 min Einwirkzeit erzielt (Abb. 14 C). Die Bewertung der Neutralisationsmedien nach siebentägiger Kultivierung ergab, dass bei einer Konzentration von 10.000 ppm freiem Chlor nach 3 bzw. 30 min Einwirkzeit kein Wachstum mehr nachweisbar war (Abb. 14 B, D). Die Untersuchungen zeigten, dass sich die mit PES angewandten Prüfverfahren auch zur Bewertung der sporiziden Wirkung anderer Desinfektionsmittel eignen. So konnte mit dem Prüfverfahren 2 die sporizide Wirkung eines tensidfreien Desinfektionsmittels in Form von NaClO bewertet werden, das in einer Konzentration von 10.000 ppm freiem Chlor und einem pH von ~8,4, ähnlich wie mit 1,0 % PES, nach 3 min Einwirkzeit zu einer vollständigen Reduktion von keimungsfähigen Sporen führte (Abb. 14 A, B).

In Anlehnung an die Norm EN 14347:2005 wurden zur Entwicklung der Prüfmodelle und Etablierung des Standardprüfverfahrens Sporen von *B. subtilis* ATCC 6633 in einer Konzentration von  $1,4 \times 10^9$  KBE/ml eingesetzt. Sporen dieser Spezies finden häufig als Surrogat für *B. anthracis* in Desinfektionsmitteltestungen Verwendung und werden generell vor Verwendung auf ihre chemische Toleranz geprüft (Sagripanti & Bonifacino, 1996; 1999; ASTM E2414-05; Majcher, 2008). Die nach EN 14347:2005 durchgeführten Toleranz- bzw. Tenazitätstestungen mit verschiedenen Sporenpräparationen von *B. subtilis* ATCC 6633 gegen PES ergaben einheitliche RF-Werte, die jedoch unterhalb des in der EN vorgegebenen Toleranzbereiches lagen. (s. 4.3).



**Abb. 10:** Wirksamkeit unterschiedlicher PES-Konzentrationen ohne und mit SDS-Zusatz in den Keimträgermodellen 1-3 gegen Sporen von *B. subtilis* ATCC 6633. Unter A, C, E und G sind die im Direktnachweis ermittelten Reduktionsfaktoren (RF/ml NM) in Abhängigkeit von der PES-Konzentration und Einwirkzeit dargestellt. Die Diagramme B, D, F und H zeigen den prozentualen Anteil der Keimträger, bei denen nach 7-tägiger Inkubation im Neutralisationsmedium (NM) Wachstum von *B. subtilis* nachweisbar war. Die Ergebnisse basieren auf 2-4 unabhängigen Versuchen mit je 4 Keimträgern pro PES-Konzentration und Einwirkzeit.

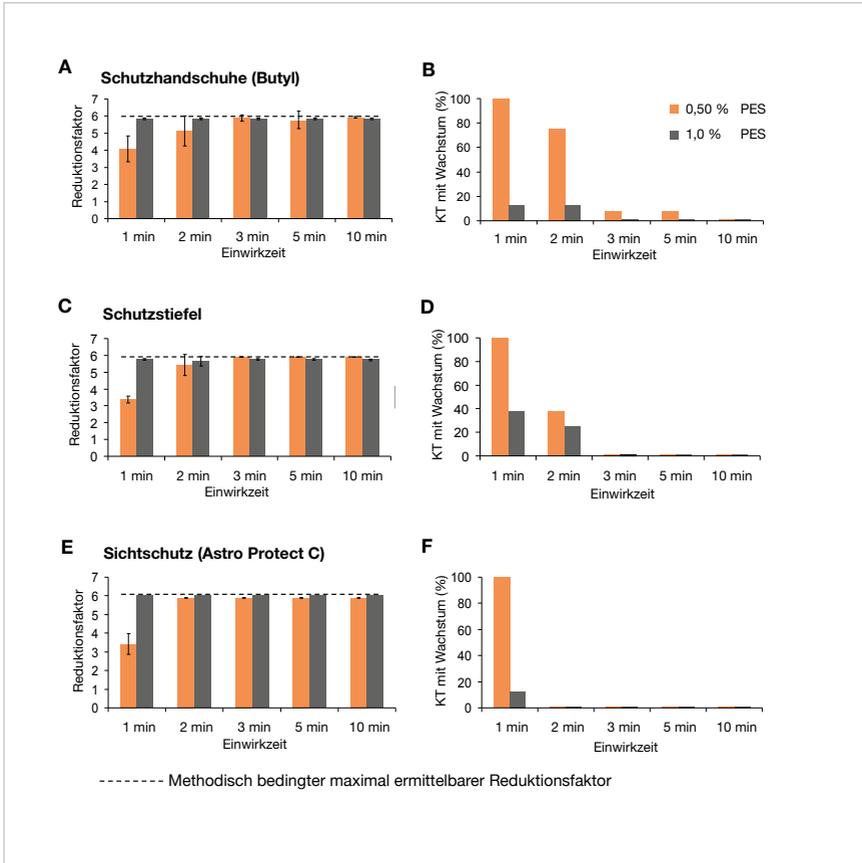
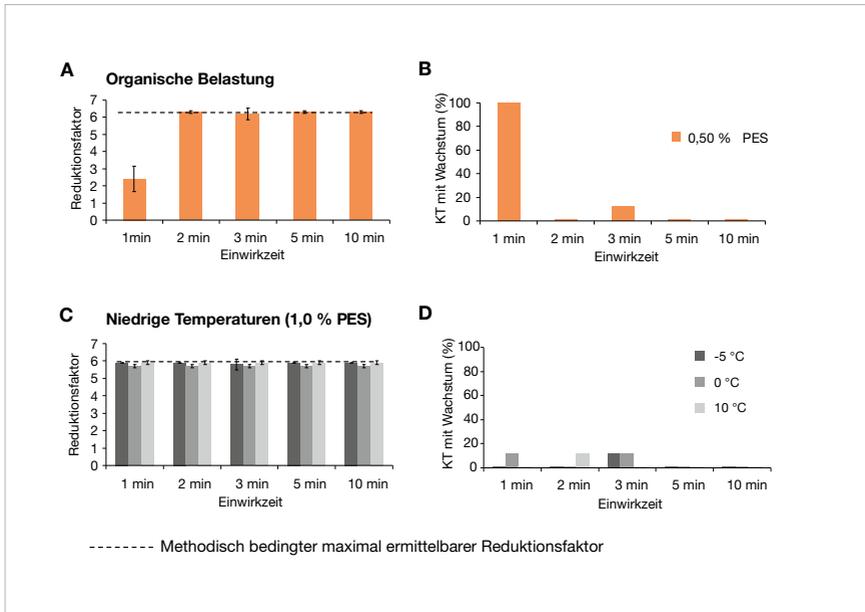
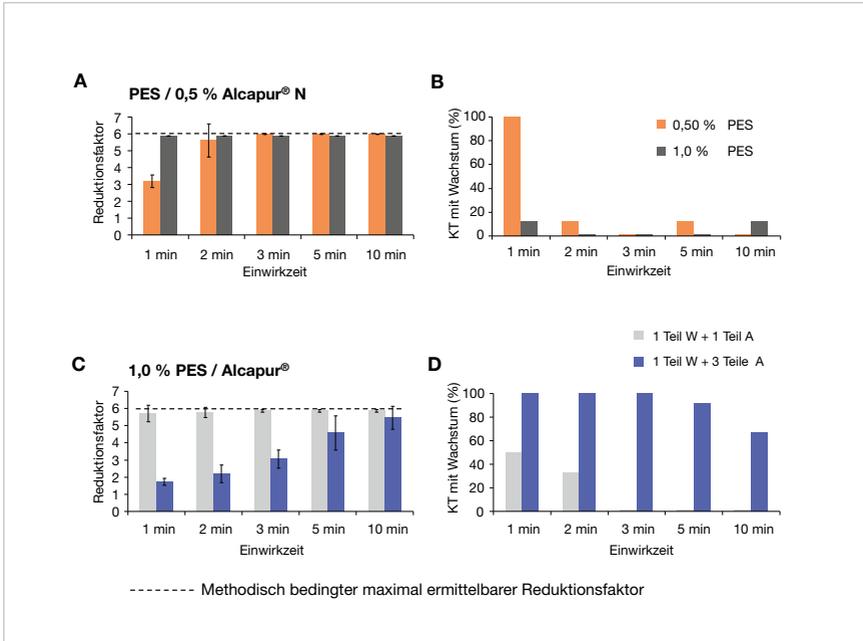


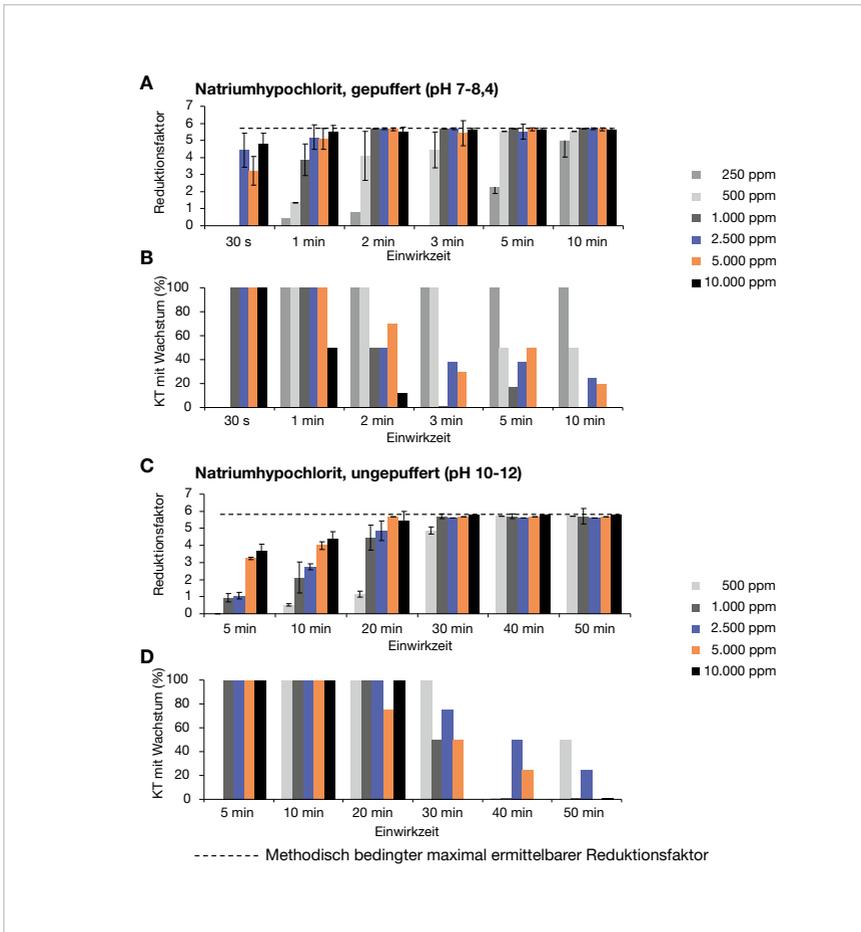
Abb. 11: Wirksamkeit von 0,5 % und 1,0 % PES kombiniert mit 0,2 % SDS auf unterschiedlichen PSA-Oberflächen im Keimträgermodell 3 (Überschichtung mit Mechanik) gegen Sporen von *B. subtilis*. Unter A, C und E sind die im Direktnachweis ermittelten Reduktionsfaktoren (RF/ml NM) in Abhängigkeit von der PES-Konzentration und Einwirkzeit dargestellt. Die Diagramme B, D und F zeigen den prozentualen Anteil der Keimträger, bei denen nach 7-tägiger Inkubation im Neutralisationsmedium (NM) Wachstum von *B. subtilis* nachweisbar war. Die Ergebnisse basieren auf 2-3 unabhängigen Versuchen mit je 4 Keimträgern pro PES-Konzentration und Einwirkzeit.



**Abb. 12:** Wirksamkeit von 0,5 % bzw. 1,0 % PES kombiniert mit 0,2 % SDS unter organischer Belastung (A, B) und bei niedrigen Temperaturen (C, D) im Keimträgermodell 3 (Überschichtung mit Mechanik) gegen Sporen von *B. subtilis* ATCC 6633. Unter A und C sind die im Direktnachweis ermittelten Reduktionsfaktoren (RF/ml NM) in Abhängigkeit von der Einwirkzeit (A) und unterschiedlichen Temperaturen (C) dargestellt. Die Diagramme B und D zeigen den prozentualen Anteil der Keimträger, bei denen nach 7-tägiger Inkubation im Neutralisationsmedium (NM) Wachstum von *B. subtilis* nachweisbar war. Die Ergebnisse basieren auf 2-3 unabhängigen Versuchen mit je 4 Keimträgern pro Einwirkzeit und Temperatur.



**Abb. 13:** Wirksamkeit von 0,5 % und 1,0 % PES kombiniert mit 0,5 % Alcapur® N, pH 3,0 bzw. 2,8 (A, B) sowie 2,5 % Wofasteril® E 400 [W] (entsprechend 1,0 % PES) kombiniert mit Alcapur® [A] (C, D) im Verhältnis 1:2 (pH 5,1) und 1:4 (pH 9,3) im Keimträgermodell 3 (Überschichtung mit Mechanik) gegen Sporen von *B. subtilis* ATCC 6633. Unter A und C sind die im Direktnachweis ermittelten Reduktionsfaktoren (RF/ml NM) in Abhängigkeit von der PES-Konzentration und der Einwirkzeit dargestellt. Die Diagramme B und D zeigen den prozentualen Anteil der Keimträger, bei denen nach 7-tägiger Inkubation im Neutralisationsmedium (NM) Wachstum von *B. subtilis* nachweisbar war. Die Ergebnisse basieren auf 2 unabhängigen Versuchen mit je 4 Keimträgern pro PES-Konzentration und Einwirkzeit.



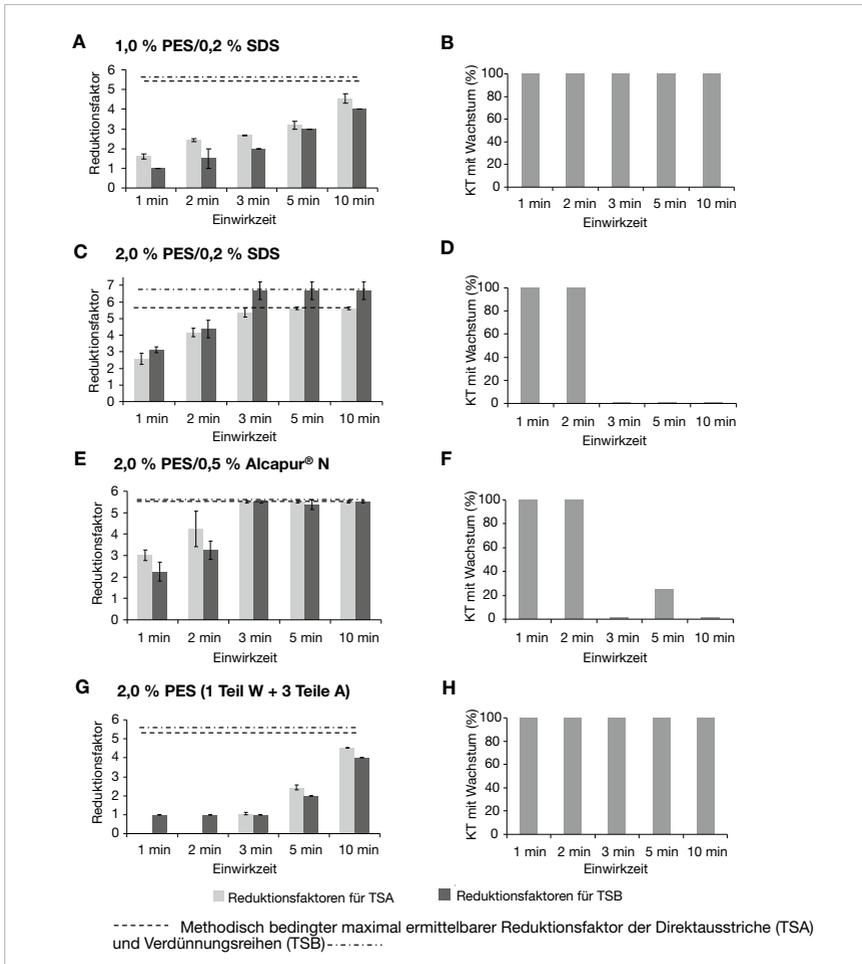
**Abb. 14:** Wirksamkeit der PBS-gepufferten (A, B) und ungepufferten Natriumhypochlorit-Lösung (C, D) im Keimträgermodell 2 (Überschichtung ohne Mechanik) gegen Sporen von *B. subtilis* ATCC 6633. Die Überschichtung erfolgte mit 100  $\mu$ l NaClO-Lösung in den o.g. Konzentrationen. Unter A und C sind die im Direktnachweis ermittelten Reduktionsfaktoren (RF/ml NM) in Abhängigkeit von der NaClO-Konzentration und Einwirkzeit dargestellt. Die Diagramme B und D zeigen den prozentualen Anteil der Keimträger, bei denen nach 7-tägiger Inkubation im Neutralisationsmedium (NM) Wachstum von *B. subtilis* nachweisbar war. Die einzelnen Ergebnisse basieren auf 2 unabhängigen Versuchen (A, B) bzw. einem Versuch (C, D) mit je 4 Keimträgern pro NaClO-Konzentration und Einwirkzeit.

## 4.2 Anwendung des Standardprüfverfahrens (Überschichtung mit Mechanik) zur Ermittlung der Wirksamkeit von PES gegen Sporen von *Bacillus anthracis*

Im Vergleich zu den Sporen von *B. subtilis* wiesen die Sporen der untersuchten *B. anthracis*-Stämme eine höhere Stabilität gegenüber der oxidativen Wirkung der Peressigsäure auf. Die in Abbildung 15 dargestellten Untersuchungsergebnisse des virulenten Stammes 527 zeigen, dass mit 1,0 % PES in Kombination mit 0,2 % SDS, aufgetragen nach dem Prinzip des Standardprüfverfahrens (Prüfverfahren 3), auch nach 10 min Einwirkzeit nicht die maximal ermittelbare Sporenreduktion erreicht wurde. Die Erhöhung der PES-Konzentration auf 2,0 % in Kombination mit 0,2 % SDS oder 0,5 % Alcapur® N brachte den gewünschten Erfolg und es konnten innerhalb von 3 min keine keimungsfähigen Sporen, d. h. keine Bakterienkolonien auf TSA oder Wachstum in TSB nachgewiesen werden (Abb. 15 C-F). Das zusätzlich zu den Direktausstrichen (TSA) bewertete Wachstum der Verdünnungsreihen (TSB) bestätigte generell die Ergebnisse der Direktausstriche insofern, als dass die mittels KBE/ml ermittelte Sporenreduktion den theoretisch berechneten RF-Wert der Verdünnungsreihen widerspiegelte.

Der Zusatz des Pufferadditivs Alcapur® im Verhältnis 4:1 zu Wofasteril® E 400, ausgehend von einer PES-Konzentration von 2,0 % (entsprechend 15,0 % Alcapur® und 5,0 % Wofasteril® E 400), erwies sich ähnlich wie in den Untersuchungen mit *B. subtilis*-Sporen als nicht effizient (Abb. 15 G, H). Nach 10 min Einwirkzeit wurde eine Reduktion von ca. 4,5 log<sub>10</sub>-Stufen erreicht bei einer maximal möglichen Reduktion von etwa 6 log<sub>10</sub>-Stufen. Auch hier wurden die Ergebnisse durch die Bewertung des Wachstums in den Verdünnungsreihen bestätigt.

Obwohl unter S3-Bedingungen die Anzahl der Keimträger pro Test aufgrund zeitlicher und räumlicher Begrenzung reduziert war, zeigte sich unter Anwendung des Standardprüfverfahrens (Prüfverfahren 3: Überschichtung mit Mechanik) immer eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse innerhalb eines Versuchsansatzes und in unabhängigen Untersuchungsreihen unter gleichen Bedingungen.



**Abb. 15:** Wirksamkeit von 1,0 % und 2,0 % PES kombiniert mit SDS (A-D), Alcapur® N (E, F) oder Alcapur® [A] im Verhältnis 4:1 mit Wofasteril® E 400 [W] (G, H) im Keimträgermodell 3 gegen Sporen des *B. anthracis*-Stammes 527. Unter A, C, E, G sind die mittels Direktausstrichen (TSA) und Verdünnungsreihen (TSB) ermittelten Reduktionsfaktoren (RF/ml NM) dargestellt. Die Diagramme B, D, F, H zeigen den prozentualen Anteil der Keimträger, bei denen nach 7-tägiger Inkubation im Neutralisationsmedium (NM) Wachstum von *B. anthracis* nachweisbar war. Die Ergebnisse basieren auf einer Untersuchung bzw. 2 unabhängigen Versuchen (C-F) mit je 2 Keimträgern pro PES-Konzentration und Einwirkzeit.

Die Sporen der virulenten *B. anthracis*-Stämme B 1138 und B 2239 zeigten eine ähnliche PES-Resistenz wie die Sporen des Stammes 527 (Abb. 21), während die Sporen der Stämme *B. anthracis* Stamatin, Sokol (= S; der Stamm enthält nur das Toxinplasmid pXO1) und *B. anthracis* CDC 10114 (= W; der Stamm enthält weder das Toxin- noch das Kapselplasmid pXO2), etwas sensitiver reagierten (Ergebnisse nicht dargestellt).

## 4.3 Untersuchungen zur Tenazität der *Bacillus*-Sporen

Aus den Untersuchungsergebnissen der Prüfmodelle, insbesondere des als Standardprüfverfahren vorgesehenen Prüfmodells 3 (Überschichtung mit Mechanik) geht eindeutig hervor, dass Unterschiede in der Stabilität der Sporenisolate des *B. subtilis*-Stammes ATCC 6633 und den *B. anthracis*-Stämmen gegenüber PES bestehen. Obwohl die Sporen des *B. subtilis*-Stammes nach der EU-Norm 14347:2005 hergestellt wurden, konnte mit diesen Sporen, wie schon unter 3.3 erwähnt, nicht die in der Norm vorgegebene PES-Toleranz für diesen Stamm erreicht werden (Abb. 16 A). Auch die Sporen der *B. anthracis*-Stämme wurden nach diesen Normvorgaben produziert (Nattermann et al., 2005). Das in den Prüfmodellen beobachtete Resistenzverhalten spiegelte sich erwartungsgemäß in den Tenazitätsergebnissen wider (Abb. 16 B). Diese zeigen, dass die *B. subtilis*-Sporen deutlich sensitiver gegen die eingesetzten PES-Konzentrationen reagierten als die Sporen der beiden untersuchten *B. anthracis*-Stämme.

Mit den Sporen von *B. cereus* ATCC 12826, die ebenfalls in der Norm als Prüfsporen empfohlen werden, konnte zwar die höhere PES-Toleranz gegenüber den *B. subtilis*-Sporen bestätigt werden, doch konnte auch mit diesen Sporen nicht die angegebene Tenazität gegen 0,1 % PES mit einem Reduktionsfaktor von  $1,25 \pm 0,5$  nach einer Einwirkzeit von 15 min erreicht werden (Abb. 16 B). Diese Spezies ist, wie schon unter 3.3 erwähnt, aufgrund ihrer biologischen Einstufung (Risikogruppe 2) nicht für Praxisversuche außerhalb von BSL 2-Laborbedingungen einsetzbar und war daher auch weniger interessant als Modellorganismus.

Auf der Suche nach einem Surrogat, das mindestens genauso PES-tolerant ist wie die Sporen der virulenten *B. anthracis*-Stämme und auch für Praxisversuche außerhalb von S 2-Laborbedingungen verwendet werden kann, fiel die Wahl auf *B. thuringiensis* DSM 350 (s. 3.3). Die Sporen dieses Stammes wiesen die höchste PES-Toleranz auf, so dass mit 0,2 % oder 0,3 % PES nach der vorgeschriebenen Einwirkzeit von 15 min nur maximal eine Reduktion von 2  $\log_{10}$ -Stufen erreicht wurde (Abb. 16 B, Tabelle 1).

Alternative Sporenpräparationsmethoden, wie z. B. die Sporulation in Flüssigmedium (Tabelle 1), die zum einen durchgeführt wurden, um *B. subtilis*-Sporen mit höherer PES-Toleranz zu erhalten, zum anderen aber auch, um eine schnellere Sporenerstellung und eventuell noch höhere Sporenausbeute zu erzielen, erhöhten nicht die PES-Resistenz der *B. subtilis* – wie auch vergleichsweise der *B. thuringiensis*-Sporen (Tabelle 1).

Um die normgerechte Tenazität mit z. B. den Sporen von *B. subtilis* zu erreichen, wäre die Prüfung und Verwendung von Sporen eines anderen *B. subtilis*-Stammes empfehlenswert.

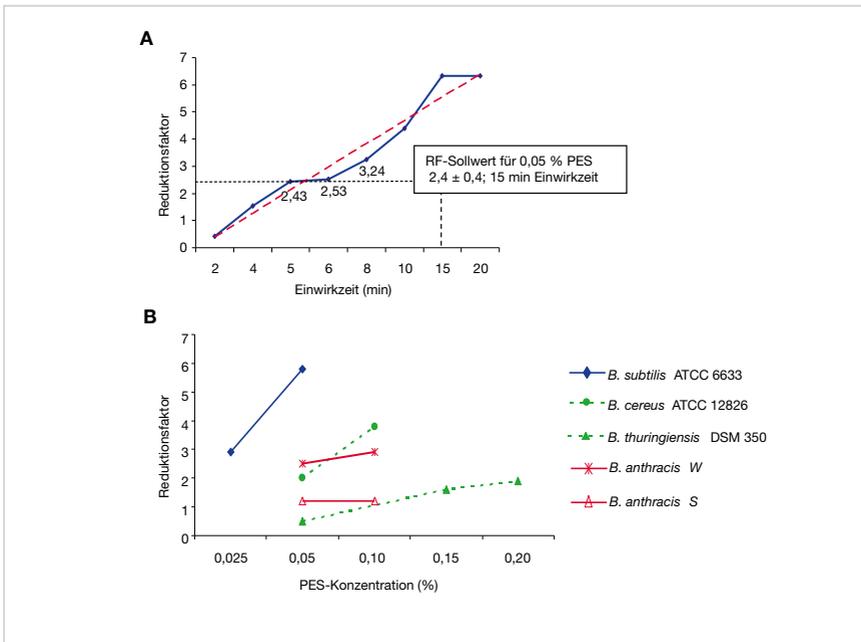


Abb. 16: Reduktion der keimungsfähigen Sporen von *B. subtilis* ATCC 6633 in Abhängigkeit von der Expositionszeit in 0,05 % PES (A). Die Tenazität der Sporen bzw. der RF-Sollwert der Sporen sollte mit 0,05 % PES nach einer Einwirkzeit von 15 min nach EN 14347:2005  $2,4 \pm 0,4$  betragen. B: Vergleich der PES-Toleranz von Sporenpräparationen, die in den Keimträgerrestungen eingesetzt wurden. Die Sporen wurden entsprechend den EN-Vorgaben 15 min in der PES-Lösung inkubiert und anschließend nach Verdünnung in Neutralisationsmedium durch Ermittlung der KBE/ml der Reduktionsfaktor (RF) bestimmt.

Stamm	Medium	PES (%)			
		0,025	0,05	0,15	0,3
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	Festmedium (EN)	3,29 ± 0,7	≥ 5,77	–	–
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	Flüssigmedium	2,64	≥ 6,71	–	–
<i>B. thuringiensis</i> DSM 350	Festmedium (EN)	–	0,26 ± 0,32	0,47	1,21
<i>B. thuringiensis</i> DSM 350	Flüssigmedium	–	2,48	3,75	4,16

Tab. 1: PES-Toleranz der Sporenpräparationen nach Sporulation auf Festmedium, hergestellt nach EN 14347:2005 und in Flüssigmedium (Kim & Goepfert, 1974). Dargestellt sind die nach PES-Exposition ermittelten Reduktionsfaktoren.

#### 4.4 Prüfung von *Bacillus thuringiensis* als Surrogat für *Bacillus anthracis*

Die Keimträgeruntersuchungen, die im Überschichtungsverfahren ohne Mechanik (Abb. 17) und dann primär mit dem Standardprüfverfahren (Prüfmodell 3) durchgeführt wurden (Abb. 18, 19), zeigten, dass die Sporen des *B. thuringiensis*-Stammes DSM 350 gegenüber 2,0 % PES insgesamt resistenter waren als die Sporen der untersuchten *B. anthracis*-Stämme. Dieser Befund war aufgrund der Tenazitätsuntersuchungen zu erwarten.

Mit 2,0 % PES ohne (im Prüfverfahren 2) sowie kombiniert mit 0,2 % SDS oder 0,5 % Alcapur® N (im Prüfverfahren 3) wurde die methodisch bedingte maximale Sporenreduktion ähnlich wie mit *B. anthracis*-Sporen nach einer Einwirkzeit von 3-5 min erreicht (bei den *B. anthracis*-Stämmen eher nach 3 min), doch trat in den meisten Neutralisationsmedien (mit Keimträger) auch nach einer Einwirkzeit von 10 min innerhalb der 7-tägigen Inkubation bei 37 °C noch Wachstum auf (Abb. 17, 18). Die gleichzeitige Auswertung der aus den Neutralisationsmedien parallel zu den Direktausstrichen hergestellten Verdünnungsreihen bestätigte die Ergebnisse der Direktausstriche insofern, als bei maximal ermittelbarer Sporenreduktion auf TSA-Platten (kein Bakterienwachstum nachweisbar; RF ~ 5) auch kein Wachstum in den Verdünnungsreihen nachweisbar war. Da sich ausschließlich Wachstum in den Neutralisationsmedien zeigte, war anzunehmen, dass offensichtlich nur einzelne Sporen überlebt hatten (nach Berechnung < 2 Sporen/ml) oder möglicherweise noch keimungsfähige Sporen am Keimträger hafteten.

Die Auftragung der Mischung aus *B. thuringiensis*-Sporen, Pferdeserum und Silikagel (Abb. 19 A, B) zeigte, ähnlich wie bei *B. subtilis* (Abb. 12 A, B), dass PES, in diesem Falle kombiniert mit Alcapur® N, genauso effizient wirkte wie im Falle der unbelasteten Sporensuspension (Abb. 18 A-D). Eine Desinfektionsmittelzehrung zugunsten der Sporenkeimung war nicht zu beobachten. Ebenso zeigte sich, dass ein größeres Auftragungsvolumen auf TSA-Platten nicht die Nachweissensitivität im Direktnachweis erhöhte (Abb. 18 C-F).

Wurde das Pufferadditiv Alcapur® im Verhältnis 2:1 mit Wofasteril® E 400 gemischt, so war im Gegensatz zu den Sporen von *B. subtilis* (Abb. 13 C, D) mit den *B. thuringiensis*-Sporen eine höhere Toleranz zu beobachten (Abb. 19 C, D). Die Mischung Alcapur® und Wofasteril® E 400 im Verhältnis 4:1 bei einer PES-Konzentration von 2,0 % führte erst nach 5 und 10 min zu einer Sporenreduktion von 2-2,5  $\log_{10}$ -Stufen (Abb. 19 E, F), ähnlich wie bei *B. anthracis*-Sporen (Abb. 15 G, H). Erwartungsgemäß bestätigte sich auch mit *B. thuringiensis*-Sporen die schon früh in der Studie mit *B. subtilis*-Sporen gewonnene Erfahrung, dass bei gleichbleibender PES-Konzentration, jedoch mit zunehmendem pH-Wert ( $\text{pH} > 8,5$ ), z. B. durch Zusatz des Pufferadditivs, die sporizide Wirkung der PES abnimmt.

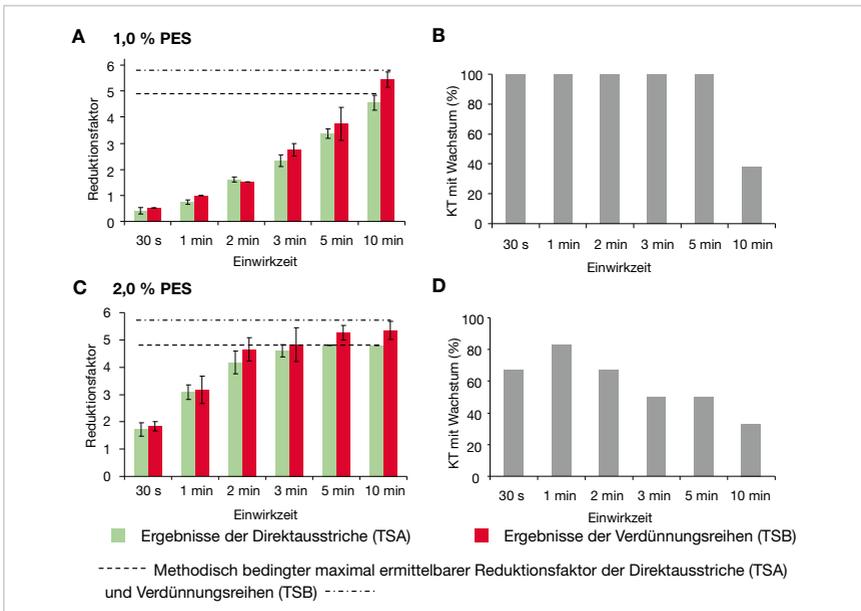
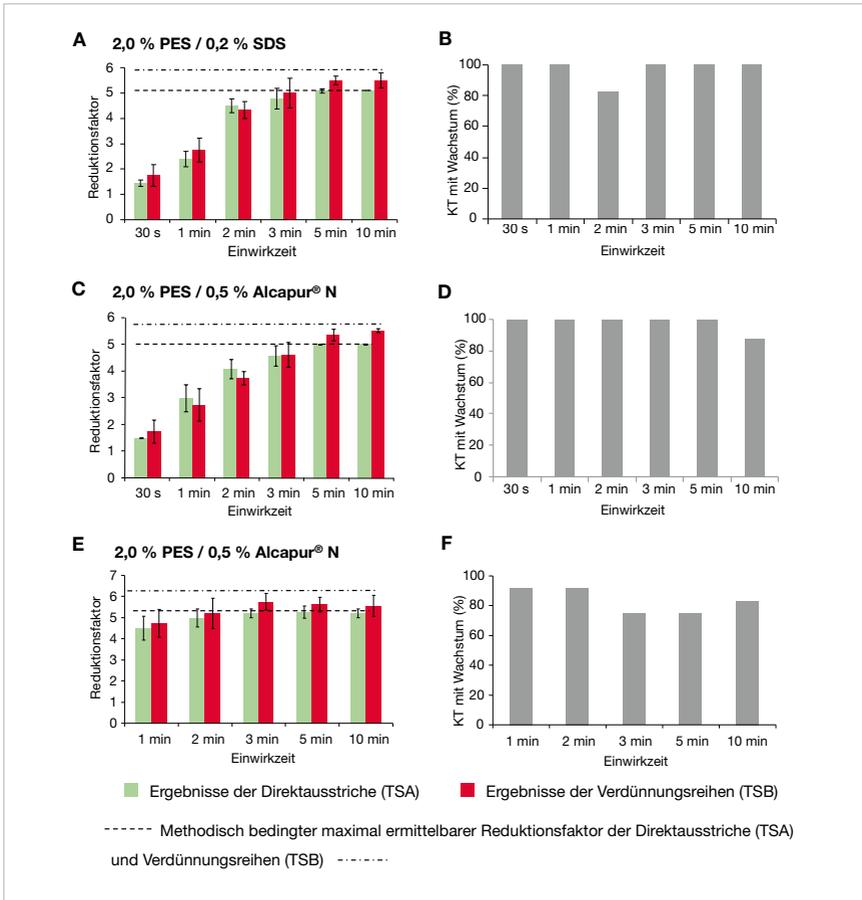
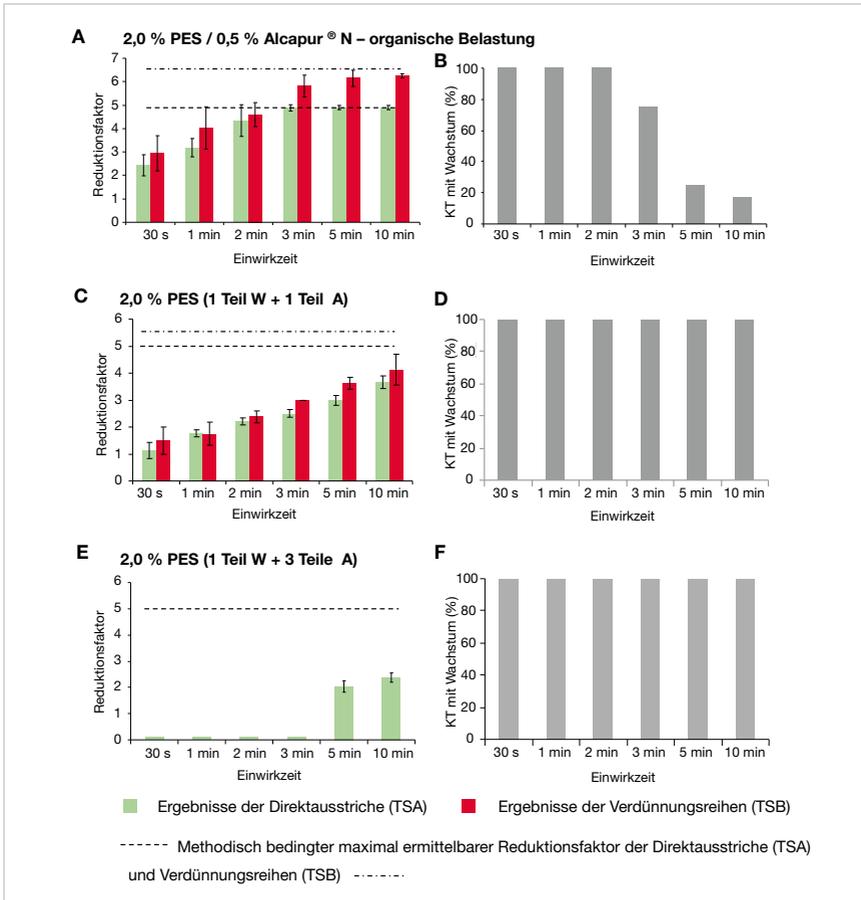


Abb. 17: Wirksamkeit von 1,0 % und 2,0 % PES im Prüfverfahren 2 (Überschichtung ohne Mechanik) gegen Sporen von *B. thuringiensis* DSM 350. Die Sporen wurden mit 100  $\mu\text{l}$  PES ohne Tensidzusatz überschichtet. Unter A und C sind die mittels Direktausstrichen (TSA) und Verdünnungsreihen (TSB) ermittelten Reduktionsfaktoren (RF/ml NM) dargestellt. Die Diagramme B und D zeigen den prozentualen Anteil der Keimträger, bei denen innerhalb einer 7-tägigen Inkubation im Neutralisationsmedium (NM) Wachstum von *B. thuringiensis* nachweisbar war. Die Ergebnisse basieren auf 2 bzw. 3 unabhängigen Versuchen mit je 4 Keimträgern pro PES-Konzentration und Einwirkzeit.



**Abb. 18: Wirksamkeit von 2,0 % PES in Kombination mit SDS oder Alcapur® N im Prüfverfahren 3 gegen Sporen von *B. thuringiensis* DSM 350.** Unter A, C und E sind die mittels Direktausstrichen (TSA) und Verdünnungsreihen (TSB) ermittelten Reduktionsfaktoren (RF/ml NM) dargestellt. Unter E wurden die Direktausstriche auf TSA mit je 1 ml (500 µl/Platte) Neutralisationsmedium (NM) und je 1 ml (500 µl/Platte) aus den Verdünnungsreihen angefertigt. Die Diagramme B, D und F zeigen den prozentualen Anteil der Keimträger, bei denen innerhalb einer 7-tägigen Inkubation im Neutralisationsmedium (NM) Wachstum von *B. thuringiensis* nachweisbar war. Die Ergebnisse basieren auf 2 bzw. 3 unabhängigen Versuchen mit je 4 Keimträgern pro PES-Konzentration und Einwirkzeit.



**Abb. 19:** Wirksamkeit von 2,0 % PES kombiniert mit Alcapur® N (pH 2,6) unter organischer Belastung (A, B), sowie 5,0 % Wofasteril® E 400 [W] (entsprechend 2,0 % PES) kombiniert mit Alcapur® [A] im Verhältnis 1:2, pH 5,1 (C, D) und 1:4, pH 9,3 (E, F) im Keimträgermodell 3 gegen Sporen von *B. thuringiensis* DSM 350. Unter A, C und E sind die mittels Direktausstrichen (TSA) und Verdünnungsreihen (TSB), nicht E, ermittelten Reduktionsfaktoren (RF/ml NM) dargestellt. Unter E wurden die RF-Werte für 30 s bis 3 min nicht quantitativ bestimmt. Die Diagramme B, D und F zeigen den prozentualen Anteil der Keimträger, bei denen innerhalb einer 7-tägigen Inkubation im Neutralisationsmedium (NM) Wachstum von *B. thuringiensis* nachweisbar war. Die Ergebnisse basieren auf 2 bzw. 3 unabhängigen Versuchen mit je 4 Keimträgern pro PES-Konzentration und Einwirkzeit.

Ähnlich wie die Sporen von *B. subtilis* ATCC 6633 ließen sich auch die Sporen des *B. thuringiensis*-Stammes DSM 350 als Surrogat in den Keimträgermodellen bzw. -Prüfverfahren problemlos bearbeiten. Die gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse unabhängiger Keimträgermessungen und die relativ hohe und konstante PES-Toleranz in den Sporenpräparationen bestätigte die Wahl dieser Sporen als Surrogat in dem Standardprüfverfahren (Prüfverfahren 3: Übersichtung mit Mechanik). Die leicht höhere Resistenz gegen PES im Vergleich zu den bisher untersuchten Sporen verschiedener *B. anthracis*-Stämme ist sicherlich nicht von Nachteil, da eine effiziente Reduktion der Surrogatsporen mit PES mindestens den gleichen Effekt mit dem pathogenen Agens haben sollte. Die Sporen wurden daher auch als Surrogat in den Praxisversuchen eingesetzt.

Die Selektion von *B. thuringiensis* war außerdem, wie schon erwähnt (3.3), für die Durchführung von Praxisversuchen ein wichtiger Aspekt, da diese Spezies in der Risikogruppe 1 (kein Krankheitserreger) eingruppiert ist und daher unter BSL 1-Bedingungen gehandhabt werden kann.

#### **4.5 Anwendung des Standardprüfverfahrens (Überschichtung mit Mechanik) zur Ermittlung der Wirksamkeit von PES gegen Vaccinia-Virus und Adenovirus**

Sowohl im Falle des behüllten Vaccinia-Virus als auch des unbehüllten Adenovirus zeigte sich unter den Prüfbedingungen des Standardprüfverfahrens (Überschichtung mit Mechanik), dass die PES eine hochwirksame viruzide Substanz ist. Mit PES-Konzentrationen von 0,01 % für das Vaccinia-Virus und 0,1 % für das Adenovirus konnte schon nach 1 min die experimentell maximal erzielbare Reduktion erreicht werden, die, abhängig davon, ob als Neutralisationsmedium Natriumthiosulfat oder Zellkulturmedium verwendet wurde, entsprechend der Berechnung 5 oder bis zu 6  $\log_{10}$ -Stufen betrug (Tabellen 2 und 3). Auch 0,2 % SDS ohne PES reichte aus, um innerhalb von 2 min Vaccinia-Virus bis zur Nachweisgrenze zu reduzieren. Dagegen konnte mit 0,5 % Alcapur<sup>®</sup> N (entsprechend einem Gehalt von 0,2 % SLES) kaum Titerreduktion des Virus erreicht werden. Der Titer des unbehüllten Adenovirus ließ sich unter identischen Bedingungen weder mit SDS noch Alcapur<sup>®</sup> N effizient reduzieren (RF 1,0 bzw. 0,3). Ausgehend von diesen Befunden sollte eine sporizide PES-Konzentration von 2,0 % PES ausreichend sein, um auch PES-resistentere Viren als die hier untersuchten Arten auf PSA hinreichend zu reduzieren, was ggf. mit entsprechenden Viren bestätigt werden könnte.

PES/Tensid-Konz.	Neutralisation in Natriumthiosulfat		Neutralisation in Zellkulturmedium		
	PES/Tensid-Exposition		PES/Tensid-Exposition		
	1 min	2 min	1 min	1,5 min	2 min
1,0 % PES	>3,7	>3,7			
1,0 % PES/0,2 % SDS	>3,7	>3,7			
0,5 % PES	>3,7	>3,7			
0,5 % PES/0,2 % SDS	>3,7	>3,7			
0,1 % PES	>4,0	>4,0	>5,0		>5,0
0,05 % PES	>3,7		>5,1		
0,01 % PES	>3,7		>5,1		
0,005 % PES	1,6±0,3	>3,9	1,6±0,3	3,6±0,4	>4,7
0,001 % PES	0		0		
0,2 % SDS	2,6		2,8	3,4	>4,7
0,5 % Alcapur® N			0,3		0,4

Tab. 2: Wirksamkeit von PES gegen das behüllte Vaccinia-Virus als kontaminierendes Agens im Prüfverfahren 3 (Überschichtung mit Mechanik). Dargestellt sind die Reduktionsfaktoren in Abhängigkeit von der Expositionszeit und PES-/Tensid-Konzentration ( $\geq$  = methodisch bedingter maximal ermittelbarer Reduktionsfaktor, kann gleich oder größer sein als der ermittelte Wert). Neben PES wurde auch die Wirkung der Tenside (SDS und Alcapur® N) ohne PES untersucht. Die Neutralisation erfolgte sowohl mit 0,3 % Natriumthiosulfat als auch mit Zellkulturmedium (DMEM + Zusätze).

PES-/Tensid-Konz.	Neutralisation in Natriumthiosulfat		Neutralisation in Zellkulturmedium	
	PES-/Tensid-Exposition		PES-/Tensid-Exposition	
	1 min	2 min	1 min	2 min
0,1 % PES	≥ 4,5		≥ 6,0	≥ 6,0
0,1 % PES/0,2 % SDS			≥ 5,9	
0,1 % PES/0,5 % Alc. N			≥ 5,9	≥ 6,0
0,05 % PES	≥ 4,8		5,8	
0,05 % PES/0,2 % SDS			5,9	≥ 6,0
0,05 % PES/0,5 % Alc. N			5,8	≥ 5,8
0,03 % PES			3,7	
0,02 % PES			1,6	
0,01 % PES		2,7	0,5	
0,01 % PES/0,2 % SDS			1,6	4,7
0,01 % PES/0,5 % Alc. N			0,9	2,2
0,005 % PES	0,8	1,3	0,2	
0,001 % PES	0,5		0,1	
0,2 % SDS			1,0	
0,5 % Alcapur® N			0,3	

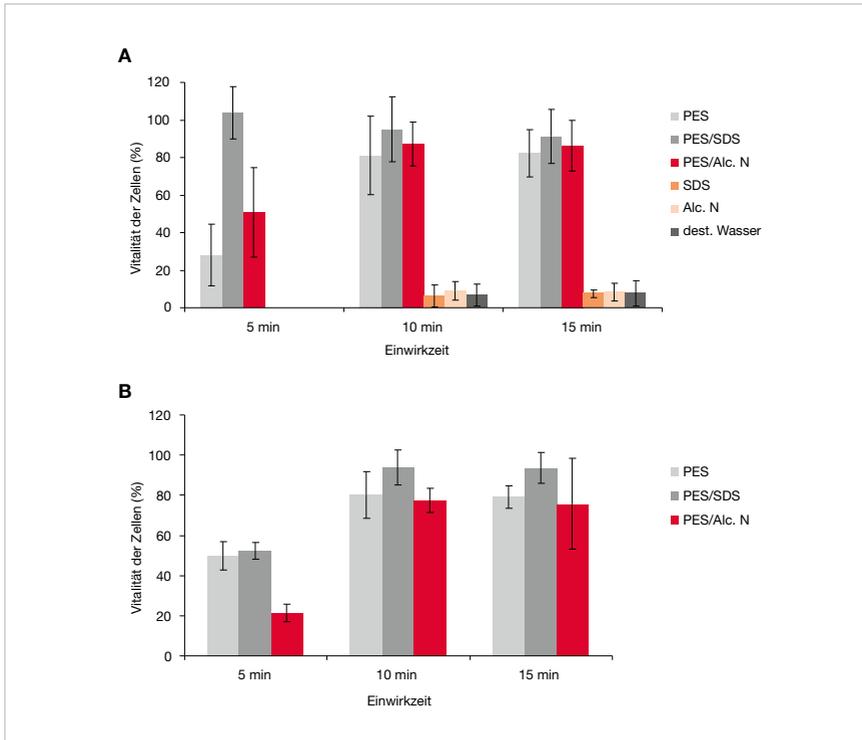
**Tab. 3:** Wirksamkeit von PES gegen das unbehüllte Adenovirus als kontaminierendes Agens im Prüfverfahren 3 (Überschichtung mit Mechanik). Dargestellt sind die Reduktionsfaktoren in Abhängigkeit von der Expositionszeit und PES-/Tensid-Konzentration ( $\geq$  = methodisch bedingter maximal ermittelbarer Reduktionsfaktor, kann gleich oder größer sein als der ermittelte Wert). Neben PES  $\pm$  SDS oder Alcapur® N (Alc. N) wurde auch die Wirkung der Tenside ohne PES untersucht. Die Neutralisation erfolgte sowohl mit 0,3 % Natriumthiosulfat als auch mit Zellkulturmedium (EMEM + Zusätze).

## 4.6 Anwendung des Standardprüfverfahrens und Prüfverfahrens 2 (Überschichtung mit und ohne Mechanik) zur Ermittlung der Wirksamkeit von PES gegen Rizin

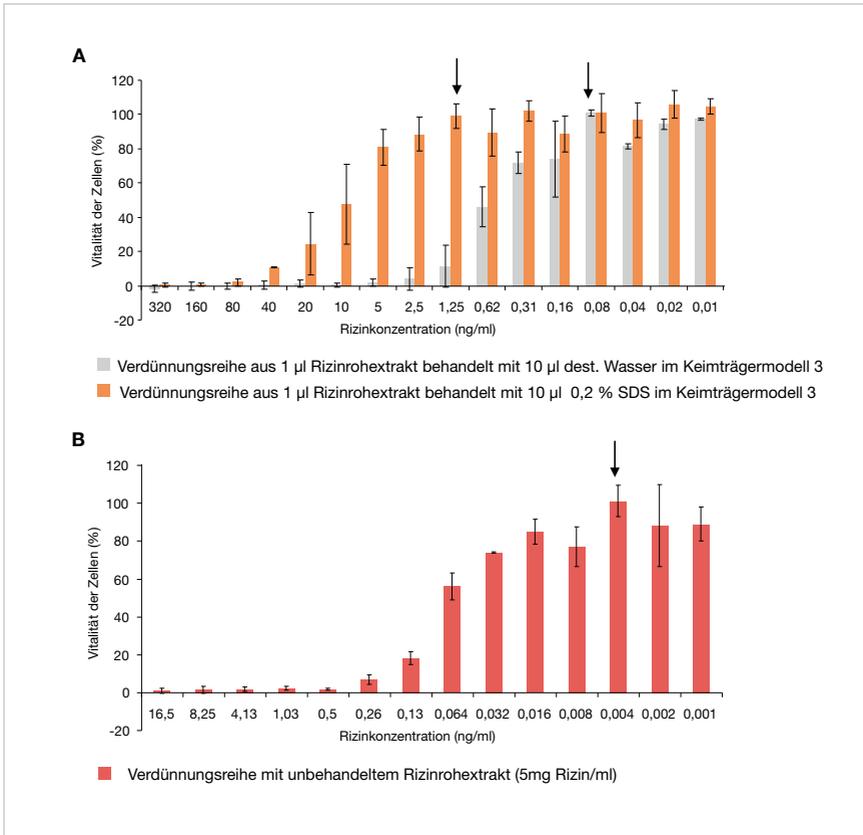
Das Proteintoxin Rizin, das in Form von Rizinrohextrakt in den Keimträgerversuchen eingesetzt wurde, erwies sich deutlich stabiler gegenüber den oxidierenden Eigenschaften von PES als die untersuchten Viren und zum Teil stabiler als die untersuchten *Bacillus*-Sporen. Mit 2,0 % PES ohne SDS-Zusatz konnte erst nach 10 bis 15 min Einwirkzeit eine deutliche Reduzierung der Rizinaktivität beobachtet werden (Anstieg der Zellvitalität), wenn 1 µl Rizinrohextrakt mit der Technik des Standardprüfverfahrens (Prüfmodell 3: Überschichtung mit Mechanik) mit 10 µl PES, jedoch ohne SDS, behandelt wurde (Abb. 20 A). Die Kombination 2,0 % PES mit 0,2 % SDS (PES/SDS) erhöhte den Inaktivierungseffekt insofern, als schon nach 5 min Einwirkzeit keine zytotoxische Rizinwirkung mehr nachweisbar war. Diese möglicherweise synergistische Wirkung von PES und SDS ließ sich nicht mit 2,0 % PES in Kombination mit 0,5 % Alcapur<sup>®</sup> N erzielen. Mit PES/Alcapur<sup>®</sup> N zeigte sich eine ähnliche Wirkung wie mit PES ohne Tensidzusätze.

Nach Einsatz der Tensidlösungen gegen 1 µl Rizinrohextrakt im Prüfmodell 3 konnte, ähnlich wie mit dest. Wasser, keine rizininaktivierende Wirkung beobachtet werden (Abb. 20 A). Nach Anfertigen von Verdünnungsreihen mit den Proben, in denen Rizinrohextrakt z. B. nur mit dest. Wasser und im Vergleich dazu mit 0,2 % SDS behandelt wurde, zeigte sich, dass das SDS-behandelte Rizin weniger zytotoxisch war (Abb. 21 A). Diesbezüglich enthielt die Verdünnungsstufe mit einer berechneten bzw. theoretischen Rizinkonzentration von 1,25 ng/ml keine zytotoxische Wirkung mehr, wenn 1 µl Rizinrohextrakt mit der Technik des Standardprüfverfahrens (Überschichtung mit Mechanik) für 10 min mit 10 µl 0,2 % SDS behandelt wurde, dagegen war die Zytotoxizität der Wasserkontrolle (1 µl Rizinrohextrakt behandelt mit 10 µl dest. Wasser) erst bei einer berechneten Rizinkonzentration von 0,08 ng/ml nicht mehr nachweisbar. Demnach kann davon ausgegangen werden, dass auch die reine 0,2 %ige SDS-Lösung eine Reduzierung der Rizinaktivität bewirken kann. Die Berechnung der Rizinkonzentration in diesen Proben basierte auf der im Keimträgerest eingesetzten Rizinmenge. Die Zytotoxizität des Rizinrohextraktes (ohne Auftragung

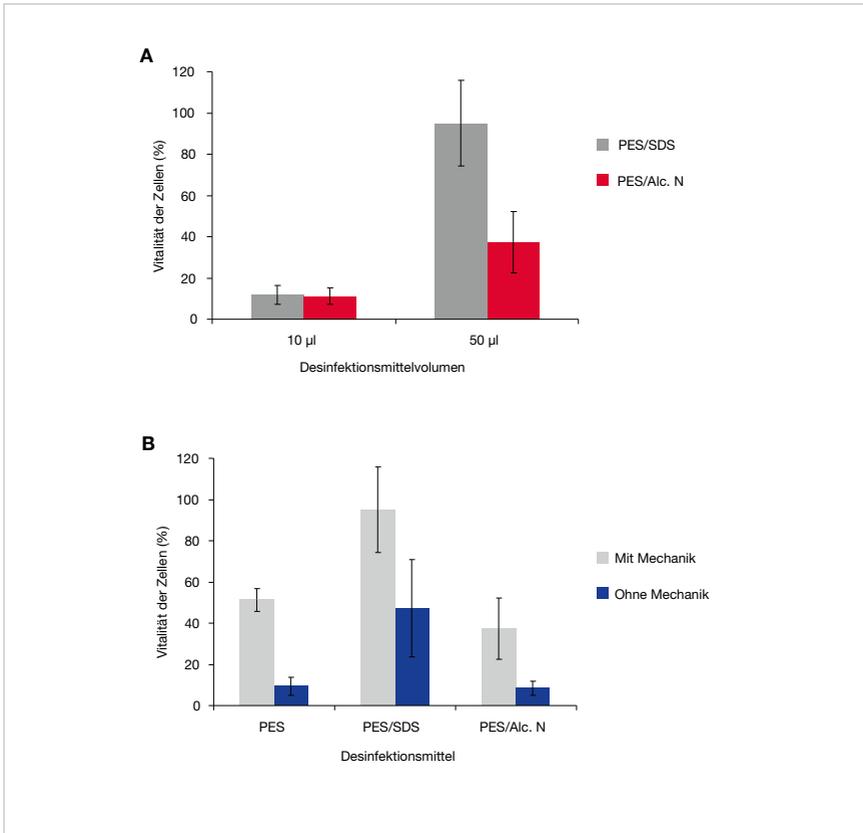
auf Keimträger) war bei einer Konzentration von ca. 0,004 ng Rizin/ml aufgehoben (Abb. 21 B). Dies zeigte, dass durch die Arbeitsschritte (Abb. 6) von der Keimträgerbehandlung bis zur Aufkonzentrierung mit einem Rizin- oder Rizinaktivitätsverlust um den Faktor 20 zu rechnen ist oder vielleicht auch ein Teil des Rizins am Trägermaterial gebunden bleibt.



**Abb. 20:** Wirksamkeit von 10  $\mu$ l 2,0 % PES ohne und mit 0,2 % SDS oder 0,5 % Alcapur<sup>®</sup> N gegen 1  $\mu$ l Rizinrohextrakt (5  $\mu$ g Rizin) im Prüfverfahren 3 (Überschichtung mit Mechanik) (A) und im Prüfverfahren 2 (Überschichtung ohne Mechanik) (B). Die Vitalität der Zellen in Prozent repräsentiert das Maß der Inaktivierung des Toxins durch das Desinfektionsmittel in Abhängigkeit von der Einwirkzeit ermittelt mit dem Zytotoxizitätsassay. Die Extinktionswerte der unbehandelten Vero-Zellen (Zellkontrollen) entsprachen 100 % Zellvitalität. Die Ergebnisse in Abbildung A basieren auf mindestens 2 unabhängigen Versuchen mit 1-2 Keimträgern pro Versuch. Die Ergebnisse in Abbildung B basieren auf einem bzw. 2 unabhängigen Versuch(en) mit je einem Keimträger pro Einwirkzeit.



**Abb. 21: Vitalität der Zellen in Abhängigkeit vom Rizingehalt in den Verdünnungen, hergestellt aus I.) Rizinohextrakt nach 10 min Exposition mit dest. Wasser und II.) nach 10 min Exposition mit 0,2 % SDS im Prüfverfahren 3 (Überschichtung mit Mechanik) (A). Die Rizinkonzentration der Verdünnungen wurde aus der im Keimträgertest eingesetzten Rizinmenge berechnet. Die Abbildung B zeigt im Vergleich dazu die Vitalität der Zellen in Abhängigkeit von der Rizinkonzentration des unbehandelten, jeweils 1:2 verdünnten Rizinohextraktes. Die Pfeile kennzeichnen die Rizinkonzentration, bei der die zytotoxische Wirkung aufgehoben scheint. Die Extinktionswerte der unbehandelten Vero-Zellen (Zellkontrollen) entsprachen 100 % Zellvitalität. Die Ergebnisse basieren auf 2 unabhängigen Versuchen.**



**Abb. 22:** Wirksamkeit von 10 µl und 50 µl 2,0 % PES mit 0,2 % SDS bzw. 0,5 % Alcapur® N gegen 3x2 µl Rizinrohextrakt (30 µg Rizin) nach 10 min Exposition im Prüfverfahren 3 (Überschichtung mit Mechanik) (A). Unter B ist die Wirksamkeit von 50 µl 2,0 % PES ± Tenside gegen 3x2 µl Rizinrohextrakt nach 10 min Exposition in den Prüfverfahren 3 und 2 (Überschichtung mit und ohne Mechanik) dargestellt. Die Vitalität der Zellen in Prozent repräsentiert das Maß der Inaktivierung des Toxins in Abhängigkeit vom Desinfektionsmittelvolumen (A) bzw. der Überschichtungstechnik (B), ermittelt mit dem Zytotoxizitätstest. Die Extinktionswerte der unbehandelten Vero-Zellen (Zellkontrollen) entsprachen 100 % Zellvitalität. Die Ergebnisse basieren auf 2 unabhängigen Versuchen mit je einem Keimträger pro Versuchsansatz.

Im Vergleich zu den Ergebnissen, die mit der Technik des Standardprüfverfahrens (Prüfmodell 3: Überschichten mit Mechanik) erhalten wurden (Abb. 15 A), zeigte sich, dass unter Anwendung von Prüfverfahren 2, d. h. nach Auftragung von 1 µl Rizinrohextrakt und Überschichtung mit 10 µl PES-Lösung ohne Mechanik, auch mit PES/SDS erst nach 10 min ein deutlicher Rizinaktivitätsverlust im Zytotoxizitätstest, ähnlich wie mit PES oder PES/Alcapur<sup>®</sup> N, nachweisbar war (Abb. 20 B).

Wurde mehr Rizinrohextrakt auf die Keimträger aufgetragen (3 x 2 µl), dann waren 10 µl 2,0 % PES kombiniert mit SDS oder Alcapur<sup>®</sup> N trotz mechanischer Überschichtung unwirksam (Abb. 22 A). Durch Erhöhung des PES/SDS-Volumens auf 50 µl konnte eine deutliche Abnahme der Zytotoxizität beobachtet werden, weniger jedoch mit 50 µl PES/Alcapur<sup>®</sup> N oder reiner PES-Lösung (Abb. 17 B). Die Versuche mit der Technik „Überschichtung ohne Mechanik“ (Prüfmodell 2) zeigten, dass PES/SDS deutlich weniger effektiv war als unter Anwendung der Technik „Überschichtung mit Mechanik“ (Prüfverfahren 3), jedoch nach wie vor wirksamer als PES oder PES/Alcapur<sup>®</sup> N, die sich als nahezu wirkungslos erwiesen (Abb. 22 B).

Ausgehend von diesen Befunden ist anzunehmen, dass die Akkumulation der Rizinmoleküle in Form der Spots offensichtlich einen gewissen (zeitlich limitierten) Oxidationsschutz für Moleküle innerhalb der Spots bietet, so dass PES bzw. PES/SDS ohne mechanische Verteilung und dadurch ohne Zerstörung des Rizinspots langsamer wirkt als unter mechanischer Verteilung. Die mechanische Verteilung führte zu einer Vermischung von PES und Rizinrohextrakt und wahrscheinlich infolgedessen zur Zerstörung größerer Proteinaggregate. Dieser Wirkeffekt konnte bisher mit *Bacillus*-Sporen nicht beobachtet werden, zeigt aber, dass es sinnvoll sein kann, beide Überschichtungsverfahren, d. h. das Prüfverfahren 3 als Standardprüfverfahren (Überschichtung mit Mechanik) in Kombination mit dem Prüfverfahren 2 (Überschichtung ohne Mechanik) zur Testung von Desinfektionsmitteln auf PSA-Oberflächen einzusetzen. Die Befunde weisen darauf hin, dass für kontaminierende Agenzien auch eine volumenabhängige Wirkung der PES ± Tenside vorhanden sein kann und berücksichtigt werden sollte.

Prinzipiell konnte gezeigt werden, dass PES auch gegen Rizin bzw. Rizinrohextrakt wirkte und die Kombination 2,0 % PES/0,2 % SDS nach einer Einwirkzeit von 5-10 min zu einer hohen Rizininaktivierung führte, insbesondere dann, wenn die Technik des Standardprüfverfahrens (Überschichtung mit Mechanik) mit ausreichend PES-Volumen eingesetzt wurde.

## 4.7 Übertragung der sporiziden Modellbedingungen in die Praxis

Die mit dem Standardprüfverfahren (Modell 3) und dem Prüfverfahren 2 ermittelten Parameter, die zu einer hohen bis zur experimentell bedingten maximal erreichbaren Sporenreduktion ( $>5 \log_{10}$ -Stufen) führten, wurden mit einer Schaufensterpuppe oder Personen in PSA auf ihre Übertragbarkeit in die Praxis überprüft. Diesbezüglich wurde die PSA-Oberfläche mit Sporen von *B. thuringiensis* DSM 350 kontaminiert und zur Dekontamination 2,0 % PES in Kombination mit der kommerziell erhältlichen Tensidlösung Alcapur® N (0,5 %) eingesetzt.

### 4.7.1 Praxisversuche am Puppenmodell

Am Puppenmodell wurden, wie unter 3.7.1 dargestellt, verschiedene Schutzanzugtypen aus unterschiedlichen Materialien getestet. Nach Sporenkontamination erfolgte die Dekontamination durch Begießen bzw. Duschen mittels Gießkanne mit und ohne Mechanik. Neben PES kombiniert mit Alcapur® N wurde die Tensidlösung auch ohne PES sowohl ohne als auch mit Mechanik eingesetzt. In diesen Untersuchungen sollte geprüft werden, ob möglicherweise die Tensidlösung alleine schon eine hohe Sporenabreicherung von der PSA-Oberfläche bewirkt, indem der Duscheffekt die Sporen vom Anzug abschwemmt, ohne sie abzutöten. Die Ergebnisse (Tabelle 4) zeigten, dass das Begießen des Tychem® F-Anzugs mit reiner Tensidlösung ohne Mechanik offensichtlich nur wenig zur Sporenreduktion beiträgt, da nach dekadischer Verdünnung der Neutralisationsmedien teils noch Wachstum bis zu einer Verdünnung von  $\geq 10^{-6}$  ( $10^{-4} \geq 10^{-6}$ ) in den Tupfer- und Stoffproben der kontaminierten Bereiche (jeweils die obersten markierten Kreisflächen) nachweisbar war. In Tabelle 4 sind jeweils die höchsten sowie niedrigsten Verdünnungsstufen mit Bakterienwachstum der insgesamt 6 Proben pro Probennahmestelle (3 Tupfer- und 3 Stoffproben) angegeben. Auch die Proben der markierten, nicht kontaminierten Kreisflächen waren positiv, bis zu einer Verdünnung von  $10^{-4}$  im zweiten Kreis und meist bis zu  $10^{-1}$  im dritten (untersten) Kreis, so dass Sporen durch die Tensidlösung von der Auftragsstelle abgeschwemmt worden waren.

Dekon. -Mittel		0,2 % Tensid		
Stoff- bzw. Anzugtyp		Tychem® C		Tychem® F
Dekon. -Technik		Begießen ohne Mechanik		Begießen mit Mechanik
Nr.	Probennahmestelle			
<b>Vorderseite</b>				
1	Oberkörper rechts		$10^{-5}$ - $10^0$ (1)	
2	Oberkörper links			$10^{-3}$ - $10^0$ (1)
3	Oberkörper Mitte	$10^{-3}$ - $10^{-1}$ (1)		
4	Oberarm rechts	$10^{-4}$ - $10^{-1}$ (1)	$\geq 10^{-6}$ - $10^{-2}$ (1)	
5	Oberarm links	$10^{-3}$ - $10^0$ (1)		$10^{-3}$ - $10^{-1}$ (1)
6	Achselbereich rechts		$\geq 10^{-6}$ - $10^{-2}$ (1)	
7	Achselbereich links			$10^{-4}$ - $10^{-1}$ (1)
8	Oberschenkel rechts	$10^{-5}$ - $10^{-1}$ (1)	$\geq 10^{-6}$ - $10^{-3}$ (1)	
9	Oberschenkel links			$10^{-4}$ - $10^0$ (1)
10	Unterschenkel rechts		$\geq 10^{-6}$ - $10^{-3}$ (5)	
11	Unterschenkel links			$10^{-3}$ - $10^{-1}$ (5)
12	Oberschenkel innen rechts		$10^{-5}$ - $10^{-2}$ (1)	
13	Oberschenkel innen links			$10^{-4}$ - $10^{-1}$ (1)
14	Sichtschutz			
15	Handschuh rechts			
16	Handschuh links			
17	Stiefel rechts			
18	Stiefel links			
<b>Rückenseite</b>				
19	Rücken rechts		$\geq 10^{-6}$ - $10^{-2}$ (1)	
20	Rücken links			$10^{-2}$ - $10^{-1}$ (1)
21	Rücken Mitte	$10^{-5}$ - $10^{-2}$ (1)		
22	Oberschenkel rechts			
23	Oberschenkel links	$10^{-5}$ - $10^{-1}$ (1)		
24	Unterschenkel rechts		$10^{-5}$ - $10^{-1}$ (1)	$10^{-3}$ - $10^{-2}$ (1)
25	Unterschenkel links			
26	Hinterkopf Mitte			

Tab. 4: Praxisversuche am Puppenmodell (Schaufensterpuppe in PSA). Wirksamkeit von 0,2 % Tensidlösung (0,5 % Alcapur® N) und 2,0 % PES kombiniert mit 0,2 % Tensid gegen Sporen von *B. thuringiensis* auf der PSA-Oberfläche.

Die Einwirkzeit inkl. Auftragung der Dekontaminationsmittel betrug in allen Versuchen 3 min. Von den 6 Einzelergebnissen je Probennahmestelle (3 Tupfer- und 3 Stoffproben) sind 1.) der Bereich der maximalen bis minimalen Verdünnungsstufe mit Wachstum von *B. thuringiensis* bzw. bis kein Wachstum

2,0 % PES / 0,2 % Tensid				
Tychem® C (Astro Protect)		Tychem® F		Blowersuit
Begießen		Begießen		Begießen
ohne Mechanik	mit Mechanik	ohne Mechanik	mit Mechanik	ohne Mechanik
negativ (1)	negativ (1)	negativ (3)	negativ (3)	negativ (1)
negativ (1)	negativ (1)	negativ (4)	negativ (2)	1 x 10 <sup>0</sup> , negativ (1)
10 <sup>-1</sup> - negativ (1)	negativ (1)	1 x 10 <sup>-1</sup> , negativ (3)	1 x 10 <sup>0</sup> , negativ (3)	2 x 10 <sup>0</sup> , negativ (1)
negativ (1)	negativ (1)	negativ (4)	negativ (2)	1 x 10 <sup>0</sup> , negativ (1)
10 <sup>-5</sup> - negativ (1)	negativ (1)	1 x 10 <sup>-1</sup> , negativ (1)	negativ (2)	1 x 10 <sup>0</sup> , negativ (1)
negativ (1)	negativ (1)	≥10 <sup>-6</sup> - negativ (3)	negativ (2)	negativ (1)
10 <sup>-1</sup> - negativ (1)	negativ (1)	10 <sup>-3</sup> - negativ	negativ (2)	1 x 10 <sup>-1</sup> , negativ (1)
		negativ (1)		
			negativ (1)	
	negativ (1)	1 x 10 <sup>-1</sup> , negativ (2)	2 x 10 <sup>-1</sup> , negativ (2)	negativ (1)
negativ (1)	negativ (1)	≥10 <sup>-6</sup> - negativ (3)	2 x 10 <sup>-2</sup> , negativ (2)	10 <sup>-4</sup> - negativ (1)
10 <sup>0</sup> - negativ (1)				
negativ (1)	negativ (1)			1 x 10 <sup>-1</sup> , negativ (1)
2 x 10 <sup>-1</sup> (1)	negativ (1)		negativ (1)	2 x ≥ 10 <sup>-4</sup>
10 <sup>-1</sup> , negativ (1)	negativ (1)		negativ (1)	10 <sup>-1</sup> , 10 <sup>0</sup> (1)
		negativ (1)		negativ (1)
		negativ (1)		negativ (1)
1 x 10 <sup>-1/0</sup> , negativ (1)	negativ (1)	negativ (4)	negativ (1)	negativ (1)
1 x 10 <sup>-1/0</sup> , negativ (1)	1 x 10 <sup>-1/0</sup> , negativ (1)	negativ (3)	negativ (2)	negativ (1)
		negativ (1)		
10 <sup>-4</sup> - negativ (1)	negativ (1)	10 <sup>-5</sup> - negativ (3)	10 <sup>-2</sup> - negativ (1)	1 x 10 <sup>-1</sup> , negativ (1)
2 x 10 <sup>-1</sup> , negativ (1)	negativ (1)	1 x 10 <sup>-5/0</sup> , negativ (2)	10 <sup>-1</sup> - negativ (1)	2 x ≥ 10 <sup>-4</sup> , negativ (1)
		negativ (1)	negativ (1)	
negativ (1)	negativ (1)			negativ (1)

(= negativ) angegeben, II.) die Anzahl der Verdünnungen mit Wachstum aufgeführt, während die restlichen Proben mit „negativ“ bewertet wurden. Die Bewertung „negativ“ und farblich unterlegt bedeutet, dass in allen 6 Proben der Probennahmestelle oder 2 Proben je Handschuh und Stiefel (hier wurden nur die kontaminierten Stellen beprobt) kein Wachstum nachweisbar war. Die Klammern enthalten die Anzahl der Versuche, in denen die einzelnen Probennahmestellen getestet wurden.

Wurde die Tensidlösung während des Auftrags zusätzlich mit dem Pinsel verwischt (mit Mechanik), konnte in den Proben der kontaminierten Flächen (Tupfer- und Stoffproben) im Vergleich zum Begießen ohne Mechanik eine Sporenabreicherung von bis zu 3  $\log_{10}$ -Stufen erreicht werden. In den Proben der markierten Flächen unterhalb der kontaminierten Kreisfläche verhielt es sich ähnlich wie in dem Versuch ohne Mechanik. In den Proben der zusätzlich unter diesen Dekontaminationsbedingungen markierten Kreise, an unterschiedlichen Stellen der PSA, war Wachstum bis zur ersten Verdünnungsstufe nachweisbar. Sicherlich wurde ein großer Teil der Sporen durch die Wischtechnik und das fortlaufende Begießen mit der Tensidlösung von der Anzugoberfläche abgewaschen, doch wie die Ergebnisse zeigen, wurden durch den Wischprozess auch die Sporen auf der gesamten Anzugoberfläche verteilt. Aufgrund dieser Befunde wurde die Dekontaminationsmaßnahme mit reiner Tensidlösung als unzureichend bewertet. Übertragen auf die Praxis, z. B. in biologischen Gefahrenlagen mit Kontaminationsverdacht, stellen derart behandelte Schutzanzüge ein Infektionsrisiko für Träger und Helfer dar.

Das Begießen der Anzugoberfläche mit 2,0 % PES kombiniert mit Alcapur® N ohne Mechanik führte zu einer vollständigen Abreicherung der Sporen an vielen kontaminierten Stellen (Sporenreduktion:  $\geq 6 \log_{10}$ -Stufen). Auch in den darunterliegenden Beprobungsstellen waren dann keine keimungsfähigen Sporen nachweisbar (Bewertung: negativ). Die Ergebnisse zeigten auch, dass ohne mechanische Verteilung des Desinfektionsmittels schwer zugängliche Stellen wie z. B. die Achselbereiche unter den mehr oder weniger statischen Bedingungen des Puppenmodells nicht effizient dekontaminiert wurden, ebenso manche Stellen mit ausgeprägten Stofffalten. Erwartungsgemäß wurden mit mechanischer Verteilung der PES-Lösung bessere Ergebnisse erzielt. Mit mechanischer Verteilung bedeutete auch, dass die Anzugoberfläche zum Teil nur mit einer dünnen PES/Tensid-Schicht bedeckt war, ähnlich wie auf der Keimträgeroberfläche nach Übersichten mit Mechanik (Methodik des Standardprüfverfahrens). Dies reichte aus, um auch im praxisnahen Puppenmodell nach Einwirkung der PES-Lösung für 3 min eine hohe Sporenreduktion und somit einen guten Dekontaminationseffekt zu erzielen mit häufig negativem Befund der Proben. Auch im praxisnahen Puppenmodell konnte somit nach einer Dekontaminationszeit von 3 min an vielen Stellen die experimentell maximal erreichbare Sporenreduktion erhalten werden mit bis zu  $\geq 6 \log_{10}$ -Stufen (ausgehend davon, dass die Sporensots nicht abgeschwemmt oder die Sporen nicht durch Wischen verteilt wurden). Die praxisnahen Versuche am

Puppenmodell bestätigten die Ergebnisse der Keimträgertestung entsprechend dem Standardprüfverfahren (Überschichtung mit Mechanik) und dem Prüfverfahren 2 (Überschichtung ohne Mechanik).

#### **4.7.2 Praxisversuche mit Probanden in PSA**

In den Praxisversuchen auf dem Gelände der Berliner Feuerwehr in Weißensee wurden die Dekontaminationsverfahren „Begießen ohne und mit Mechanik“ sowie „Besprühen mit und ohne Mechanik“ mit den verschiedenen Schutzanzugtypen unter unterschiedlichen Wetterbedingungen getestet. Durch die große Unterstützung erfahrener Feuerwehrangehöriger und ihrer Kollegen, die sich als Anzugträger zur Verfügung stellten (Probanden) und oft länger als geplant in den Anzügen ausharren mussten, wenn durch die Wetterlage die Sporensuspension nur langsam antrocknete, war es eine effiziente und angenehme Zusammenarbeit mit Erfahrungsaustausch und Lerneffekten im Ein- und Auskleiden sowie Abkleben der Anzüge an sensitiven Stellen, wie z. B. den Übergängen Schutzmaske und Anzug oder Handschuhe und Anzug. Die Arbeiten zeigten u. a. auch, wie wichtig es ist, verlässliche Geräte zur Dekontamination zur Verfügung zu haben.

In Tabelle 5 sind die Ergebnisse dieser Feldversuche zusammengefasst. Auch hier zeigte sich, wie auch im Puppenmodell, dass schon nach Besprühen oder Begießen der Anzugoberflächen, ohne zusätzliche mechanische Verteilung der PES-Lösung, eine hohe Sporenreduktion an den kontaminierten Stellen stattgefunden hatte und in den beiden darunterliegenden markierten Flächen in der Regel keine keimungsfähigen Sporen nachweisbar waren. Die Technik „Begießen ohne Mechanik“ lieferte in dem Versuch mit dem grauen Tychem® F-Anzug sehr gute Ergebnisse, so dass lediglich an zwei Stellen noch keimungsfähige Sporen nachweisbar waren.

Dekon. - Mittel		2,0 % PES / 0,2 % Tensid		
Stoff- bzw. Anzugtyp		Tychem® F (grau)		Pro Chem III (Tychem® F)
Dekon. - Technik		Besprühen (4 min)	Begießen (4 min) ohne Mechanik	Besprühen (4 min)
Nr.	Probennahmestelle			
<b>Vorderseite</b>				
1	Oberkörper rechts	negativ	negativ	$10^{-0}$ , $2 \times 10^{-1}$
2	Oberkörper links	$\geq 10^{-3}$ , $2 \times 10^0$	negativ	negativ
3	Oberarm rechts	$10^{-2}$ , $2 \times$ negativ	negativ	negativ
4	Oberarm links	$10^{-2}$ , $2 \times$ negativ	negativ	negativ
5	Achselbereich rechts	negativ	negativ	$\geq 10^{-4}$ , $2 \times 10^{-1}$
6	Achselbereich links	$2 \times$ negativ, $10^{-1}$	negativ	$10^{-1}$ , $2 \times$ negativ
7	Oberschenkel rechts	$10^{-1}$ , $2 \times$ negativ	negativ	$10^{-3}$ , $2 \times$ negativ
8	Oberschenkel links	$10^{-1}$ , $2 \times$ negativ	negativ	negativ
9	Oberschenkel innen rechts	$10^{-1}$ , $2 \times$ negativ	$\geq 10^{-3}$ , $2 \times$ negativ	$10^{-1}$ , $2 \times$ negativ
10	Sichtschutz			$10^{-4}$ , $10^{-2}$ , $10^{-1}$
11	Handschuh rechts	1 x negativ	1 x negativ	$1 \times 10^{-0}$
12	Handschuh links	1 x negativ	1 x negativ	1 x negativ
13	Stiefel rechts	1 x negativ	$1 \times 10^{-1}$	$1 \times 10^{-1}$
14	Stiefel links	1 x negativ	1 x negativ	1 x negativ
<b>Rückenseite</b>				
15	Rücken rechts	1 x negativ	negativ	$\geq 10^{-4}$ , $10^{-3}$ , $10^0$
16	Rücken links	1 x negativ	negativ	negativ
19	Oberschenkel rechts	$\geq 10^{-3}$ , negativ, $10^0$	negativ	negativ
20	Unterschenkel rechts	$2 \times \geq 10^{-3}$ , $10^{-1}$	negativ	negativ
22	Unterschenkel links			
24	Hinterkopf Mitte			$10^{-1}$ , $10^0$ , $10^{-1}$
Wetterbedingungen		12°C, sonnig		6°C, bedeckt, windig

Tab. 5: Praxisversuche mit Probanden in PSA. Wirksamkeit von 2,0 % PES kombiniert mit 0,2 % Tensid (0,5 % Alcapur® N) gegen Sporen von *B. thuringiensis* auf der PSA-Oberfläche.

Die angegebenen Werte beziehen sich auf die 3 Tupferproben pro Probennahmestelle (Stoffproben wurden nicht ausgeschnitten), beginnend mit dem Ergebnis des oberen kontaminierten Kreises. Die Bewertung „negativ“ (farblich unterlegt) bedeutet, dass in allen 3 Proben eines Bereiches bzw. 1 Probe

2,0 % PES / 0,2 % Tensid				
Pro Chem III (Tychem® F)	Tychem® F	Pro Chem III	Tychem® F	Vautex Elite
Begießen (4 min) ohne Mechanik	Besprühen (5 min) ohne Mechanik	Besprühen (5 min) mit Mechanik		
$\geq 10^{-4}$ , $2 \times 10^{-1}$	negativ	negativ	negativ	negativ
$3 \times 10^{-2}$	negativ	negativ	negativ	negativ
$10^{-1}$ , $2 \times$ negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
$10^{-1}$ , $2 \times$ negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
$10^{-2}$ , $2 \times$ negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
$10^{-1}$ , $2 \times$ negativ	negativ	$2 \times$ negativ, $10^{-1}$	negativ	negativ
$10^{-1}$ , $2 \times$ negativ	$10^{-3}$ , $10^{-2}$ , $10^{-3}$	$10^{-1}$ , $2 \times$ negativ	negativ	negativ
negativ, $2 \times 10^{-1}$			negativ	negativ
negativ		negativ		negativ
$1 \times 10^{-2}$	$1 \times$ negativ	$1 \times$ negativ	$1 \times 10^{-1}$	$1 \times 10^{-1}$
$1 \times 10^{-2}$	$1 \times$ negativ	$1 \times$ negativ		$1 \times$ negativ
$1 \times 10^{-1}$	$1 \times$ negativ	$1 \times$ negativ	$1 \times 10^0$	$1 \times$ negativ
$1 \times$ negativ	$1 \times$ negativ	$1 \times$ negativ		$1 \times$ negativ
$10^{-1}$ , $2 \times$ negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
$10^{-1}$ , $2 \times$ negativ	$10^{-1}$ , $2 \times$ negativ	negativ	negativ	negativ
$10^{-2}$ , $10^{-1}$ , $10^0$	negativ	negativ	negativ	negativ
	negativ	negativ	negativ	negativ
$10^{-1}$ , $2 \times$ negativ		negativ	negativ	negativ
$6^\circ\text{C}$ , <i>bedeckt, windig</i>	$18^\circ\text{C}$ , <i>bedeckt bis sonnig</i>		$8^\circ\text{C}$ , <i>Regen, leicht windig</i>	

je Handschuh und Stiefel (hier wurde nur die kontaminierte Stelle beprobt) kein Wachstum nachweisbar. Die Tychem® F-Anzüge wurden mit schwarzen (Butyl-), die Pro Chem III-Anzüge mit grünen (Vinyl-) Schutzhandschuhen kombiniert. Die Ergebnisse basieren auf Einzelversuchen. (negativ = kein Wachstum in der Probe;  $\geq 10^{-4}$  = mindestens bis zu der Verdünnungsstufe  $10^{-4}$  war Wachstum nachweisbar)

Dass mit der gleichen Technik auf dem Pro Chem III-Anzug noch an vielen Auftragsstellen geringe Sporenmengen nachweisbar waren, war darauf zurückzuführen, dass in diesem Versuch ein defekter Gießstutzen kein gleichmäßiges Begießen des Anzugs in der vorgegebenen Zeit ermöglichte (ca. 1 min), so dass dadurch offensichtlich einige Stellen unzureichend oder zu kurz benetzt wurden. Trotzdem wurde nach insgesamt 4 min die Dekontamination durch anschließendes Duschen beendet. Eine ähnliche Situation ergab sich beim Besprühen des Pro Chem III-Anzuges ohne Mechanik. Dadurch, dass der Sprühdruck während des Besprühens nachließ, wurden auch hier offensichtlich viele Stellen nicht ausreichend oder zu kurz benetzt. Auch in diesem Versuch betrug die gesamte Dekontaminationsdauer (Benetzungs- und Einwirkzeit) 4 min. Diese Erfahrungen trugen dazu bei, dass in den weiteren Versuchen ganz auf die Duschtechnik mittels Gießkanne verzichtet wurde und nur noch die 5 Liter-Drucksprühergeräte zum Einsatz kamen, von denen zwei bereitstanden (Arbeits- und Ersatzgerät), die jedes Mal vor Gebrauch auf Druckhaltung und Sprühwirkung hin überprüft wurden. Um die Dekontaminationseffizienz mit der Sprühtechnik zu erhöhen, wurde in den nachfolgenden Versuchen der Anzug nicht nur durch einmaliges Besprühen benetzt und dann die Einwirkzeit auf 3 min begrenzt, sondern es erfolgte ein gleichmäßiges Besprühen über die Dauer von 5 min (ohne Mechanik) oder alternierend Sprühen, Wischen und Sprühen (mit Mechanik) über diese Zeit. Die damit erreichten Dekontaminationseffekte sind in Tabelle 5 dargestellt.

Die Verlängerung der Dekontaminationszeit war auch insofern wichtig, um unter Kommunikation mit dem Anzugsträger (Aufforderung zum Umdrehen, Arme hochheben etc.), im Idealfall durch einen Helfer, eine effiziente Dekontamination mit der nötigen Ruhe (soweit möglich in B-Gefahrenlagen) und Sorgfalt durchführen zu können.

In diesen Versuchen wurde neben den Schutzanzügen aus Tychem® F-Material auch der Vautex Elite-Schutzanzug verwendet. Die Dekontamination des Vautex Elite-Anzuges erfolgte im Eingangsbereich des Duschzeltes mit Position des „Dekontaminators“ außen vor dem Zelteingang und hochgeklappter Eingangstür. Diese Technik wurde dem wichtigen Sicherheitsaspekt, der Verhinderung von Versprühungen während der Dekontamination, insofern gerecht, als dass diese Versprühungen lokalisierbar, d. h. auf das Zeltinnere begrenzt waren und somit keine vitalen Sporen in die Umgebung versprüht. Trotz des schwachen Druckes des Sprühergerätes waren während der Dekontamination in der

offenen Wanne (Abb. 9) Versprühungen bis zu ca. 1 m zu beobachten, was im Freien durch einen Dreiseitenschutz begrenzt wäre. Auf Schutzhandschuhen (aus Vinyl und Butyl) und teils auch auf Stiefeln waren nach der Dekontamination häufig noch die Stellen der Sporenauftragung gut sichtbar, so dass dort noch ausreichend Sporenmateriale vermutet wurde. Trotzdem waren nach Abnahme der Tupferproben und teilweise auch von Stoffproben keine keimungsfähigen Sporen mehr nachweisbar. Im Falle der Praxisversuche mit Personen in PSA wurden in der Regel nur Tupferproben genommen und keine Stoffproben ausgeschnitten, so dass die Probanden mittels Helfer aus den intakten Anzügen aussteigen konnten.

Schließlich konnte auch mit diesen Praxisversuchen die Effizienz des Standardprüfverfahrens bestätigt werden. Mit der Kombination 2,0 % PES/0,2 % Tensid konnte durch Besprühen mit Mechanik innerhalb 5 min eine hohe Sporenabreicherung auf der PSA-Oberfläche erreicht werden. Die unterschiedlichen Wetterbedingungen, unter denen die Versuche durchgeführt wurden (Tabelle 5), schienen die Wirksamkeit der PES nicht zu beeinflussen.

## 4.8 Bewertung der Modellsysteme im Hinblick auf die Wirksamkeit unter praxisnahen Bedingungen und den praktischen Nutzen

Die Keimträgermodelle 2 und 3 (Überschichtung ohne und mit Mechanik), in denen die kontaminierte PSA-Oberfläche mit der tensidhaltigen PES-Lösung ohne oder mit mechanischer Verteilung überschichtet wird, repräsentieren bezogen auf die Praxis die Dekontamination der Anzüge durch Benetzen der gesamten Fläche mittels Gieß- oder Sprühtechnik ohne (Prüfmodell 2) oder mit zusätzlichem Verteilen der PES-Lösung mit weicher Bürste (Prüfmodell 3). Im Keimträgereinstellung wurde insbesondere das Modell 3 als ein sehr realitätsnahes Testverfahren favorisiert und nicht nur mit *Bacillus*-Sporen, sondern auch mit Viren und Rizin als Kontaminationen und Peressigsäure ± Tenside als Desinfektionsmittel erfolgreich getestet. Aufgrund der realitätsnahen Bedingungen, der guten Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und der offensichtlichen Robustheit des Prüfsystems wurde das Prüfmodell als Standardprüfverfahren ausgewählt, das, in Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Desinfektionsmittels (± Tenside), auch in Kombination mit dem Prüfmodell bzw. Prüfverfahren 2 (Überschichtung ohne Mechanik) eingesetzt werden kann. Die Prüfverfahren bieten eine Reihe von Variationsmöglichkeiten, d. h. unterschiedliche PSA-Materialien und unterschiedliche kontaminierende Agenzien können getestet werden.

Im Vordergrund der Untersuchungen stand die Testung der sporiziden Wirkung der PES bei Verdacht auf Kontamination der PSA-Oberfläche mit Sporen von *Bacillus anthracis*. Um diese Fragestellung im Prüfmodell auch außerhalb des BSL 3-Labors untersuchen zu können, erwiesen sich die Sporen von *B. thuringiensis* DSM 350 als ein geeignetes Surrogat und schließlich 2,0 % PES in Kombination mit 0,2 % Tensid als ein wirkungsvolles Desinfektionsmittel.

Die in der Keimträgereinstellung ermittelte effiziente Dekontaminationszeit von 3-5 min mit einer Sporenreduktion von 4,5 → 5  $\log_{10}$ -Stufen im Falle der *B. thuringiensis*-Sporen (inkl. Desinfektionsmittelauftragung) bestätigte sich im Puppenmodell und im Feldversuch mit Personen in PSA. Unter Anwendung der Sprühtechnik mit relativ niedrigem Druck erwies sich eine Dekontaminationszeit von 5 min mit ständigem Benetzen der PSA ohne Mechanik (Besprühen ohne

Wischen) oder alternierend Besprühen, Wischen und Besprühen als sehr effektiv. Diese Vorgehensweise wurde im Keimträgermodell nicht näher untersucht, sollte aber eher den Dekontaminationserfolg verbessern als verschlechtern.

In den Praxisversuchen wurde die PES-Wirkung sofort nach der Dekontamination durch das Begießen oder Duschen mit Wasser gestoppt oder zumindest PES so stark verdünnt, dass eine Nachwirkung vernachlässigbar war. Im B-Einsatz könnte das Abduschen verzögert erfolgen (nach 2-3 min), so dass durch den kurzzeitigen Nachwirkungseffekt zusätzlich eine Sicherheitsmarge geschaffen wird. Ein kurzes Abspülen der PSA mit Wasser würde auf jeden Fall verhindern, dass der Träger beim Ausziehen evtl. versehentlich mit der 2 %igen PES-Lösung in Berührung kommt.

Aus der Summe der Experimente zur sporiziden und viruziden Wirkung der Peressigsäure im Keimträger-Prüfverfahren und unter praxisnahen Bedingungen (grau hinterlegt) wurden somit folgende Parameter als wirksam ermittelt:

	Untersuchtes Agens			
	Bacillus-Sporen	Viren		Rizin*
	<i>B. thuringiensis</i>	Vaccinia-	Adeno-	Rizinrohextrakt
PES ohne Tenside	2 %	0,1 %		2 %
Einwirkzeit	5 min	1 min		15 min
Technik (Überschichtung)	- Mechanik	+ Mechanik		+ Mechanik
Reduktionsfaktor	≥5	≥5	≥6	~ 4
PES/SDS	2 % / 0,2 %	0,1 % / 0,2 %		2 % / 0,2 %
Einwirkzeit	5 min	1 min		10 min
Technik (Überschichtung)	+ Mechanik	+ Mechanik		+ Mechanik
Reduktionsfaktor	≥5	-	≥6	~ 4
PES/Alcapur® N	2 % / 0,5 %	0,1 % / 0,5 %		2 % / 0,5 %
Einwirkzeit	5 min	1 min		15 min
Technik (Überschichtung)	+ Mechanik	+ Mechanik		+ Mechanik
Reduktionsfaktor	≥5	-	≥6	~ 4

\* Für Rizin bzw. Rizinrohextrakt wurde mit den getesteten Verfahren eine deutliche Reduktion der Aktivität erzielt. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die Inaktivierungsverfahren für Toxine zu optimieren.

Ein wichtiger praxisrelevanter Aspekt wäre, die gegen *Bacillus*-Sporen wirksamen Parameter (grau hinterlegt) auch bei Verdacht auf eine Viruskontamination anzuwenden. Dies würde die Sicherheit erhöhen, dass auch PES-resistentere Viren als die hier untersuchten Virusstämme hinreichend reduziert werden.

## **4.9 Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse sowie Erfahrungen für den Bevölkerungsschutz**

Die Keimträgermodelle, insbesondere die Prüfmodelle 2 und 3 (detaillierte SOPs vorhanden) sollen als Verfahren zur Testung der sporiziden Wirkung von flüssigen und gasförmigen Desinfektionsmitteln bzw. chemischen Substanzen auf PSA-Oberflächen etabliert und veröffentlicht werden. Sie können mit Surrogatsporen durchgeführt werden, doch sollten diese Sporen auf ihre chemische Toleranz hin untersucht werden. Die verwendeten Testsporen müssen hinsichtlich ihrer Resistenz gegenüber dem zu prüfenden Desinfektionsmittel tatsächlichen Zielagenzien entsprechen.

Aus den Erfahrungen und Ergebnissen der Praxisversuche können Vorschriften (SOPs) zur Dekontamination der PSA nach Einsatz in biologischen Gefahrenlagen erstellt werden. Ausgehend von einer Dekontamination mit 2,0 % PES als Grundsubstanz könnten die Expositionszeiten flexibel gestaltet und damit dem Gefahrstoff angepasst werden. Somit könnte bei Verdacht auf Rizinkontamination der PSA die Dekontaminationszeit der PES/Tensid-Lösung auf 15 min verlängert werden. Bei Verdacht auf Kontamination mit mikrobiologischen Agenzien sollte immer ein Protokoll verwendet werden, das eine hohe Sporenreduktion garantiert (Dekontaminationszeit mindestens 5 min). Dieser Zeitrahmen sollte ausreichen, um viele andere pathogene Mikroorganismen mit unbekannter PES-Toleranz zu inaktivieren. Die Protokolle sollen der Feuerwehr, dem Bevölkerungsschutz und anderen relevanten Institutionen zur Verfügung gestellt werden.

# Danksagung

Bedanken möchten wir uns ganz herzlich bei Frau Sabine Howaldt und Frau Renate Heinrich, ZBS 2, RKI, für die exzellente technische Assistenz.

Unser herzlicher Dank gilt Frau Silke Becker und Frau Petra Lochau, ZBS 2, RKI, für die Vorarbeiten, Herrn PD Dr. Andreas Nitsche, ZBS 1, für die Bereitstellung von Vaccinia-Virus, Frau Jung-Won Sim-Brandenburg, ZBS 1, RKI, und Frau Young-Mi Kassner, FG 14, RKI, für die Einführung in die virologischen Testverfahren, Frau Dr. Diana Pauly, ZBS 3, RKI, für die Einführung in den Zytotoxizitätsassay, Frau Nahid Derakshani und Frau Dr. Monika Hermann für die Betreuung vonseiten des BBK, Frau Dr. Bärbel Niederwöhrmeier, WIS, Munster, Herrn Reinhard Steffler, Feuerwehr Leipzig, Herrn Gerhard Uelpenich, BBK, Herrn Bernd Haupt, Feuerwehr- und Katastrophenschutzschule Rheinland-Pfalz, Herrn Markus Stemmler, Bezirksamt Reinickendorf und Herrn Dr. Klaus-Michael Wollin, Landesgesundheitsamt Niedersachsen, für die fachliche Unterstützung und Beratung sowie Herrn Hans-Rainer Steffens, DuPont, für die Unterstützung beim Testaufbau.

Nicht zuletzt möchten wir uns ganz herzlich bei der Berliner Feuerwehr bedanken: bei Herrn Frieder Kircher, Direktionsleiter Nord für die Genehmigung der Arbeiten am Standort Weißensee, bei Herrn Michael Termeer und insbesondere bei Herrn Wolfgang Maziejewsky und den Mitarbeitern am Standort Weißensee für die große technische und personelle Unterstützung und gute Zusammenarbeit.

# **Anhang**

**Literaturverzeichnis**

**Abkürzungsverzeichnis**

**Bisherige Publikationen**



# Literatur

AOAC OFFICIAL METHOD 966.04. *Sporicidal Activity of Disinfectants*. AOAC International 2006

ASTM METHOD E 2414-05. *Standard Test Method for Quantitative Sporicidal Three-Step Method (TSM) to Determine Sporicidal Efficacy of Liquids, Liquid Sprays, and Vapor or Gases on Contaminated Carrier Surfaces*. ASTM International 2005. West Conshohocken, PA

BONIN O: *In Quantitativ-virologische Methoden*. Stuttgart: Georg Thieme-Verlag. 1973; 183-186

BRADBERRY SM, DICKERS KJ, RICE P, GRIFFITHS GD, VALE JA: *Ricin poisoning*. *Toxicol.* 2003; Rev. 22: 65-70

CANTER DA, GUNNING D, RODGERS P, O'CONNOR L, TRAUNERO C, KEMPTER CJ: *Remediation of Bacillus anthracis contamination in the U.S. Department of Justice mail facility*. *Biosecur.Bioterror.* 2005; 3: 119-127

DEWAN P, FRY AM, LASERSON K, TIERNEY BC, QUINN CP, HAYSLETT JA, BROYLES LN ET AL: *Inhalational anthrax outbreak among postal workers, Washington, D.C., 2001*. *Emerg.Infect.Dis.* 2002; 8: 1066-1072

EN 14347: *Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Sporizide Wirkung (Basistest) – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 1)*, 2005

ENSERINK M: *Infectious diseases: Avian flu outbreak set off alarm bells*. *Science.* 2003; 300: 718

GEBEL J, WERNER HP, KIRSCH-ALTENA A, BASEMIR K: *Standardmethoden der DGHM zur Prüfung chemischer Desinfektionsmittel*. Mhp Verlag, Wiesbaden, 2001

INGLESBY TV, O'TOOLE T, HENDERSON DA, BARTLETT JG, ASCHER MS, EITZEN E, FRIEDLANDER AM, GERBERDING J, HAUER J, HUGHES J, MCDADE J, OSTERHOLM MT, PARKER G, PERL TM, RUSSELL PK, TONAT K: *Working Group on Civilian Biodefense 2002. Anthrax as a biological weapon*. updated recommendations for management, 2002 ; JAMA 287: 2236-52

KAYSER FH, BIENZ KA, ECKERT J & ZINKERNAGEL RM: *Medizinische Mikrobiologie*. 9. überarbeitete und neugestaltete Auflage. Thieme Verlag, Stuttgart, 1998

KIM HU & GOEPFERT JM: *A sporulation medium for Bacillus anthracis*. J. Appl. Bact., 1974; 37: 265-267

KLEE SR, NATTERMANN H, BECKER S, URBAN-SCHRIEFER M, FRANZ T, JACOB D, APPEL B: *Evaluation of different methods to discriminate Bacillus anthracis from other bacteria of the Bacillus cereus group*. J. Appl. Microbiol., 2006; 100: 673-81

MAJCHER MR, BERNARD KA, SATTAR SA: *Identification by quantitative carrier test of surrogate spore-forming bacteria to assess sporicidal chemicals for use against Bacillus anthracis*. Appl. Environ. Microbiol., 2008; 74: 676-681

NATTERMANN H, BECKER S, JACOB D, KLEE SR, SCHWEBKE I, APPEL B: *[Efficient killing of anthrax spores using aqueous and alcoholic peracetic acid solutions]*. Bundesgesundheitsblatt. Gesundheitsforschung. Gesundheitsschutz, 2005; 48: 939-950

PAULY D, KIRCHNER S, STOERMANN B, SCHREIBER T, KAULFUSS S, SCHADE R, ZBINDEN R, AVONDET MA, DORNER MB, DORNER BG: *Simultaneous quantification of five bacterial and plant toxins from complex matrices using a multiplexed fluorescent magnetic suspension assay*. Analyst, 2009; 134: 2028-2039

RABENAU HF & SCHWEBKE I: *Leitlinie der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten (DVV) e. V. und des Robert Koch-Instituts (RKI) zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren in der Humanmedizin* Bundesgesundheitsbl. Gesundheitsforsch. Gesundheitsschutz, 2008; 51: 937-945

*Richtlinie des Bundesgesundheitsamtes zur Prüfung der Wirksamkeit von Flächendesinfektionsmitteln für die Desinfektion bei Tuberkulose.* Bundesgesundheitsblatt, 1994; 6: 274-278

SAGRIPANTI JL, CARRERA M, INSALACO J, ZIEMSKI M, ROGERS J, ZANDOMENI R: *Virulent spores of Bacillus anthracis and other Bacillus species deposited on solid surfaces have similar sensitivity to chemical decontaminants.* J. Appl. Microbiol., 2007; 102: 11-21

SAGRIPANTI JL & BONIFACINO A: *Comparative sporicidal effect of liquid chemical germicides on the three medical devices contaminated with spores of Bacillus subtilis.* Am. J. Infect. Control, 1996; 24: 364-371

SAGRIPANTI JL & BONIFACINO A: *Comparative sporicidal effect of liquid chemical agents:* Appl. Environ. Microbiol., 1996; 62: 545-551

SAGRIPANTI JL & BONIFACINO A: *Bacterial spores survive treatment with commercial sterilants and disinfectants.* Appl. Environ. Microbiol., 1999; 65: 4255-4260

SPICHER G & PETERS J: *Wirksamkeit von Formaldehyd, Glutarialdehyd, Peressigsäure, Chloramin T (N-Chlor-4-toluolsulfonsäureamid), m-Kresol, Ethanol und Benzyl dimethyldodecylammoniumbromid gegen Bakterien, die sich in geronnenem Blut befinden (Modellversuche zur chemischen Instrumenten-Desinfektion).* – *Efficacy of Formaldehyde, Glutarialdehyde, Peracetic Acid, Chloramine T (N-Chloro-4-toluene-sulphonamide), m-Cresol, Ethanol, and Benzyl dimethyldodecylammoniumbromide on Bacteria in Coagulated Blood (Model Experiments for Chemical Disinfection of Instruments).* Zbl. Hyg, 1991; 191: 457-477

SPICHER G & PETERS J: *Abhängigkeit der mikrobiologischen Befunde der Wirksamkeitsprüfung von Flächendesinfektionsmitteln von den Prüfungsbedingungen.* – *Dependence of microbiological results on the test conditions in efficacy testing of surface disinfectants.* Hyg. Med, 1997; 22: 123-140

SPOTTS WHITNEY EA, BEATTY ME, TAYLOR TH JR, WEYANT R, SOBEL J, ARDUINO MJ, ASHFORD DA: *Inactivation of Bacillus anthracis spores.* Emerg. Infect. Dis., 2003; 9: 623-627

STEFFLER R, BERGHOLZ A, DERSCH R, FRIEDRICH D, SCHILD A: *Peressigsäure – Ein Desinfektionsmittel für den Katastrophenschutz im außergewöhnlichen Seuchenfall*. Bevölkerungsschutz, 2003; 1: 24-27

STEFFLER R, GRUNOW R, LEMMER K, NATTERMANN H: *Desinfektion und Dekontamination bei B-Lagen durch operative Kräfte der Gefahrenabwehr. Biologische Gefahren I*, Handbuch zum Bevölkerungsschutz, 3. Auflage, 2007, Kap. 6.8, 621-655

WEBBY RJ & WEBSTER RG: *Are we ready for pandemic influenza?* Science, 2003; 302: 1519-1522

WORLD HEALTH ORGANIZATION: *The World Health Organization guidelines on sterilization and disinfection methods against HIV*. WHO AIDS SERIES 2, 2nd ed. WORLD HEALTH ORGANIZATION, Geneva, 1989

# Abkürzungsverzeichnis

<b>A</b>	Alcapur <sup>®</sup> (nicht identisch mit Alcapur <sup>®</sup> N)	<b>PSA</b>	Persönliche Schutzausrüstung
<b>B.</b>	<i>Bacillus</i>	<b>PES</b>	Peressigsäure
<b>CMC</b>	Carboxymethylcellulose	<b>PES/SDS</b>	PES kombiniert mit SDS
<b>Dest. Wasser</b>	Steriles bidestilliertes Wasser	<b>PES/Alcapur<sup>®</sup> N</b>	PES kombiniert mit Alcapur <sup>®</sup> N
<b>DGHM/VAH</b>	Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie/ Verbund für Angewandte Hygiene	<b>RF</b>	Reduktionsfaktor
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle's Medium	<b>RG</b>	Risikogruppe
<b>DVG</b>	Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft	<b>RKI</b>	Robert Koch-Institut
<b>EMEM</b>	Eagle's Minimum Essential Medium	<b>rpm</b>	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
<b>FG</b>	Fachgebiet	<b>S</b>	Sicherheitslabor
<b>KBE/ml</b>	Koloniebildende Einheiten pro Milliliter	<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat (Sodium Dodecyl Sulfate)
<b>KT</b>	Keimträger (Carrier)	<b>SLES</b>	Natriumlaurylethersulfat (Sodium Laureth Sulfate)
<b>MTT</b>	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid	<b>SOP</b>	Standard Operation Procedure
<b>NM</b>	Neutralisationsmedium	<b>TSA</b>	Trypton-Soja-Agar
		<b>TSB</b>	Trypton-Soja-Bouillon
		<b>W</b>	Wofasteril <sup>®</sup> E 400
		<b>ZBS</b>	Zentrum für biologische Sicherheit

## Bisherige Publikationen

Auf den folgenden Seiten finden Sie eine komplette Liste aller bisher erschienenen und teilweise bereits vergriffenen Bände der Veröffentlichungen, die vom Bundesamt für Zivilschutz, dem Bundesverwaltungsamt und dem Bundesamt für Bevölkerungsschutz und Katastrophenhilfe, als jeweils zuständige Behörde für den Zivil- und Bevölkerungsschutz, herausgegeben wurden.

In der Liste „*Zivilschutz-Forschung, Alte Folge*“ wurden Forschungsergebnisse und andere Beiträge zum Zivilschutz bis 1988 veröffentlicht. Die Liste „*Zivilschutz-Forschung, Neue Folge*“ enthält die Veröffentlichungen zwischen 1990 und 2006. Seit 2007 werden Forschungsergebnisse des Bundesamtes für Bevölkerungsschutz und Katastrophenhilfe in der Schriftenreihe „*Forschung im Bevölkerungsschutz*“ veröffentlicht. Seit 2009 veröffentlicht die Schutzkommission beim Bundesministerium des Innern von ihr erstellte Empfehlungen, Aufsätze u. ä. in der eigenen Reihe „*Schriften der Schutzkommission*“. Der Download dieser Bände ist unter **[www.schutzkommission.de](http://www.schutzkommission.de)** möglich, die Printversion über das Bundesamt für Bevölkerungsschutz und Katastrophenhilfe beziehbar.

Je nach Art und Umfang der Forschungsergebnisse findet lediglich eine *Internetveröffentlichung* statt. Zu speziellen, besonders interessanten Themen des Bevölkerungsschutzes werden gesonderte Publikationen herausgegeben, die Sie in der Liste Sonderveröffentlichungen finden können.

Unter **[www.bbk.bund.de/Publikationen](http://www.bbk.bund.de/Publikationen)** finden Sie, zusätzlich zu den Internetveröffentlichungen, die meisten Bände als PDF zum Download und Hinweise zur Verfügbarkeit der Printversion. Die Printversion können Sie im Internet oder über die Adresse

**Bundesamt für Bevölkerungsschutz und Katastrophenhilfe,  
Postfach 18 67, 53008 Bonn**  
bestellen.

## Forschung im Bevölkerungsschutz

---

- 1 Netzwerk Psychosoziale Notfallversorgung – Umsetzungsrahmenpläne  
Band 1: Entwicklung | Datenbank | Task-Force | Finanzierung**  
*I. Beerlage, T. Hering, S. Springer, D. Arndt, L. Nörenberg/2008*  
ISBN-10: 3-939347-02-7 bzw. ISBN-13: 978-3-939347-02-6

---
- 2 Netzwerk Psychosoziale Notfallversorgung – Umsetzungsrahmenpläne  
Band 2: Qualität in Aus- und Fortbildung**  
*I. Beerlage, S. Springer, T. Hering, L. Nörenberg, D. Arndt/2008*  
ISBN-10: 3-939347-03-5 bzw. ISBN-13: 978-3-939347-03-3

---
- 3 Netzwerk Psychosoziale Notfallversorgung – Umsetzungsrahmenpläne  
Band 3: Belastungen und Belastungsfolgen in der Bundespolizei**  
*I. Beerlage, D. Arndt, T. Hering, L. Nörenberg, S. Springer/2009*  
ISBN-10: 3-939347-04-3 bzw. ISBN-13: 978-3-939347-04-0

---
- 4 Vulnerabilität Kritischer Infrastrukturen**  
*S. Lenz (Dipl.-Geogr., M.Sc.)/2009*  
ISBN-13: 978-3-939347-11-8

---
- 5 Empfehlungen für die Probenahme zur Gefahrenabwehr im Bevölkerungsschutz**  
*U. Bachmann, W. Biederbick, N. Derakshani, M. Drobig, J. Eisheh, M. König, R. Maier,  
J. Mentfewitz, B. Niederwöhrmeier, H. Prast, D. Sebastian, G. Uelpenich, M. Vidmayer,  
S. Wilbert, M. Wolf/2010*  
ISBN-13: 978-3-939347-15-6

---
- 7 Städtebauliche Gefährdungsanalyse**  
*C. Mayrhofer/2010*  
ISBN-13: 978-3-939347-08-8

---
- 9 Dekontamination von Verletzten im Krankenhaus bei ABC-Gefahrenlagen**  
*F. Martens/2009*  
ISBN-13: 978-3-939347-20-0

---
- 10 Entwicklung eines zeitgemäßen ABC-Selbsthilfe-Sets für den Katastrophenschutz**  
*M. Müller, K. Schmiechen/2009*  
ISBN-13: 978-3-939347-22-4

---
- 11 Bevölkerungsverhalten und Möglichkeiten des Krisenmanagements und Katastrophenmanagements in multikulturellen Gesellschaften**  
*E. Geenen/2010*  
ISBN-13: 978-3-939347-26-2

- 
- 12 Vulnerabilität der Kritischen Infrastruktur  
Wasserversorgung gegenüber Naturkatastrophen**  
*A. Braubach/2010*  
ISBN-13: 978-3-939347-30-9
- 
- 13 Indikatoren zur Abschätzung von Vulnerabilität und Bewältigungspotenzialen  
am Beispiel von wasserbezogenen Naturgefahren in urbanen Räumen**  
*J. Birkmann, S. Krings, M. Vollmer, J. Wolfertz, T. Welle, W. Kühling, K. Meisel, M. Wurm,  
H. Taubenböck, M. Gähler, H. Zwenzner, A. Roth, S. Voigt & S. Dech/2011*  
ISBN-13: 978-3-939347-31-6
- 
- 14 Infrarot-Gefahrstoffkamera**  
*R. Harig, P. Rusch/2011*  
ISBN-13: 978-3-939347-32-3
- 
- 15 Empirische Untersuchung der Realisierbarkeit von Maßnahmen zur Erhöhung  
der Selbstschutzzfähigkeit der Bevölkerung**  
*Henning G. Goersch, Ute Werner*  
ISBN-13: 978-3-939347-36-1
- 
- 16 Humanbiomonitoring im Bevölkerungsschutz**  
*Michael Müller, Katharina Schmiechen*  
ISBN-13: 978-3-939347-39-2

## Schriften der Schutzkommission

---

- 1 Gefahren und Warnung**
1. Konsensus-Konferenz zum Prozedere beim Massenansturm von Verletzten und Erkrankten mit der Notwendigkeit überregionaler Unterstützung (Ü-MANV) |
  2. Gefahrenpotentiale von chemischen Kampfstoffen und toxischen Industriechemikalien – das Punktesystem |
  3. Warnung der Bevölkerung
- J. Weidinger, W. Weiss, P. Sefrin, J. Barbid, N. Engelhard, S. Grigoleit, H. John,  
J. Schulze, E. M. Geenen/2009*  
ISBN-13: 987-3-939347-11-9
- 
- 2 Qualitätssicherung in der Psychosozialen Notfallversorgung  
Band 2: Deutsche Kontroversen – Internationale Leitlinien**  
*I. Beerlage/2009*  
ISBN-13: 978-3-939347-21-7

- 
- 3 Empfehlungen zur Verbesserung des medizinischen Bevölkerungsschutzes**  
 1. Gesundheitlicher Bevölkerungsschutz in Deutschland | 2. Gutachten zu Stand und Handlungsbedarf im medizinischen C-Schutz | 3. Konzept zur katastrophenmedizinischen Ausbildung im studentischen Unterricht an deutschen Hochschulen  
 ISBN-13: 978-3-939347-27-9
- 
- 4 4. Gefahrenbericht**  
*Schutzkommission beim Bundesminister des Innern/2011*  
 ISBN-13: 978-3-939347-35-4
- 
- 5 Synopse zu ausgewählten Gefahrenberichten aus Deutschland, Europa und international**  
 Eine Analyse im Rahmen des 4. Gefahrenberichts der Schutzkommission beim Bundesministerium des Innern/2012  
 ISBN-13: 978-3-939347-40-8

## Zivilschutzforschung, Neue Folge

ISSN 0343-5164

- 
- 59 3. Gefahrenbericht**  
*Schutzkommission beim Bundesminister des Innern/2006*
- 
- 58 Infrarot-Fernerkundungssystem für die chemische Gefahrenabwehr**  
*R. Harig, G. Matz, P. Rusch/2006*
- 
- 57 Entwicklung von Standards und Empfehlungen für ein Netzwerk zur bundesweiten Strukturierung und Organisation psychosozialer Notfallversorgung**  
*I. Beerlage, T. Hering, L. Nörenberg et al./2006*
- 
- 56 Aufbau und Ablauf der Dekontamination und Notfallversorgung Verletzter bei Zwischenfällen mit chemischen Gefahrstoffen**  
*B. Domres, A. Manger, S. Brockmann, R. Wenke/2005/Druckversion vergriffen*
- 
- 55 51. und 52. Jahrestagung der Schutzkommission beim Bundesminister des Innern**  
*Vorträge/2005*
- 
- 54 Untersuchung zur Einbindung des Öffentlichen Gesundheitsdienstes in die katastrophenmedizinische Versorgung in der Bundesrepublik Deutschland**  
*E. Pfenninger, S. Himmelseher, S. König/2005/Druckversion vergriffen*

- 
- 53 Schwachstellenanalyse aus Anlass der Havarie der PALLAS**  
*L. Clausen/2003/Druckversion vergriffen*
- 
- 52 49. u. 50. Jahrestagung der Schutzkommission beim Bundesminister des Innern**  
*Vorträge/2003*
- 
- 51 Erstellung eines Schutzdatenatlases**  
*W. R. Dombrowsky, J. Horenczuk, W. Streitz/2003/Druckversion vergriffen*
- 
- 50 Entgiftung von Organophosphaten durch Phosphorylphosphatasen und Ethanolamin**  
*R. Zech/2001*
- 
- 49 Task-Force für Schnellanalytik bei großen Chemieunfällen und Bränden**  
*G. Matz, A. Schillings, P. Rechenbach/2003/Druckversion vergriffen*
- 
- 48 2. Gefahrenbericht**  
*Schutzkommission beim Bundesminister des Innern/2001*
- 
- 47 Organisation der Ernährungsnotfallvorsorge (ENV)**  
*J. Rasche, A. Schmidt, S. Schneider, S. Waldtmann/2001/Druckversion vergriffen*
- 
- 46 Methoden der Bergung Verschütteter aus zerstörten Gebäuden**  
*F. Gehbauer, S. Hirschberger, M. Markus/2001/Druckversion vergriffen*
- 
- 45 Technologische Möglichkeiten einer möglichst frühzeitigen Warnung der Bevölkerung – Kurzfassung**  
*Technological Options for an Early Alert of the Population – Short Version*  
*V. Held/2001/Druckversion vergriffen*
- 
- 44 Medizinische Versorgung beim Massenansturm Verletzter bei Chemikalienfreisetzung**  
*E. Pfenninger, D. Hauber/2001/Druckversion vergriffen*
- 
- 43 Empirisch-psychologische Analyse des menschlichen Fehlverhaltens in Gefahrensituationen und seine verursachenden und modifizierenden Bedingungen sowie von Möglichkeiten zur Reduktion des Fehlverhaltens**  
*D. Ungerer, U. Morgenroth/2001*
- 
- 42 45., 46. und 48. Jahrestagung der Schutzkommission beim Bundesminister des Innern**  
*Vorträge/2000/Druckversion vergriffen*

- 
- 41 Einfluß von Zytokinen und Lipidmediatoren auf die Kontrolle und Regulation spezifischer Infektabwehr bei Brandverletzung**  
*W. König, A. Drynda, B. König, R. Arnold, P. Wachtler, M. Köller/2001*
- 
- 40 Entwicklung von Dekontaminationsmitteln und -verfahren bei Austritt von Industriechemikalien**  
*F. Schuppe/2001/Druckversion vergriffen*
- 
- 39 Optimierung des Schutzes vor luftgetragenen Schadstoffen in Wohngebäuden**  
*TÜV Energie und Umwelt GmbH/2001/Druckversion vergriffen*
- 
- 38 Rechnergestütztes Beratungssystem für das Krisenmanagement bei chemischen Unfällen (DISMA®)**  
*W. Kaiser, M. Schindler/1999/Druckversion vergriffen*
- 
- 36 Biologische Indikatoren für die Beurteilung multifaktorieller Beanspruchung. Experimentelle, klinische und systemtechnische Untersuchung**  
*M. Weiss, B. Fischer, U. Plappert, T. M. Fliedner/1998*
- 
- 35 Praxisanforderung an Atem- und Körperschutzausstattung zur Bekämpfung von Chemieunfällen**  
*K. Amman, A.-N. Kausch, A. Pasternack, J. Schlobohm, G. Bresser, P. Eulenburg/2003/ Druckversion vergriffen*
- 
- 34 Untersuchung der Wirksamkeit von Selbstschutzausstattung bei Chemieunfällen**  
*S. Bulheller, W. Heudorfer/2003/Druckversion vergriffen*
- 
- 33 Laserspektrometrischer Nachweis von Strontiumnukliden im Niederschlag**  
*J. Bernhardt, J. Haus, G. Hermann, G. Lasnitschka, G. Mahr, A. Scharmann/1998*
- 
- 32 Kriterien für Evakuierungsempfehlungen bei Chemikalienfreisetzungen**  
*G. Müller/1998/Druckversion vergriffen*
- 
- 31 Beiträge zur Isolierung und Identifizierung von Clostridium sp. und Bacillus sp. sowie zum Nachweis deren Toxine**  
*G. Schallehn, H. Brandis/1998/Druckversion vergriffen*
- 
- 30 Untersuchung der Praxisanforderungen an die Analytik bei der Bekämpfung großer Chemieunfälle**  
*G. Matz/1998/Druckversion vergriffen*
- 
- 29 Erfahrungen aus Abwehrmaßnahmen bei chemischen Unfällen**  
*D. Hesel, H. Kopp, U. Roller/1997*

- 
- 28 Wirkungen von Organophosphaten**  
*R. Zech/1997*
- 
- 27 Staatliche Risikokommunikation bei Katastrophen**  
Informationspolitik und Akzeptanz  
*G. Ruhrmann, M. Kohring/1996*
- 
- 26 43. und 44. Jahrestagung der Schutzkommission beim Bundesminister des Innern**  
*Vorträge/1997/Druckversion vergriffen*
- 
- 25 Abschätzung der gesundheitlichen Folgen von Großbränden**  
Literaturstudie Teilbereich Toxikologie  
*K. Buff, H. Greim/1997/Druckversion vergriffen*
- 
- 24 42. Jahrestagung der Schutzkommission beim Bundesminister des Innern**  
*Vorträge/1996/Druckversion vergriffen*
- 
- 23 Das Verhalten von Umweltchemikalien in Boden und Grundwasser**  
*K. Haberer, U. Böttcher/1996/Druckversion vergriffen*
- 
- 22 Inkorporationsverminderung für radioaktive Stoffe im Katastrophenfall**  
*B. Gloebel, Ch. Graf/1996/Druckversion vergriffen*
- 
- 21 Arbeiten aus dem Fachausschuß III: Strahlenwirkungen – Diagnostik und Therapie**  
**I. Ganzkörpermessungen reiner  $\beta$ -Strahler**  
**II. Untersuchungen zur therapeutischen Beeinflussung des Strahlenschadens durch Biological Response Modifier**  
**III. Prophylaxe und Therapie von Strahlenschäden im Katastrophenfall**  
**IV. Interstitielle Pneumonie nach Ganzkörperbestrahlung**  
**V. Modellversuch zur Therapie von Strahlen- und Kombinationsschäden**  
*I. R. E. Grillmaier, M. Thieme*  
*II. P. G. Munder, M. Modolell, F. Link, R. Escher*  
*III. W. Pohlit, Bhavanath Jha, M. Jülch*  
*IV. K. Quabeck, D.W. Beelen, R. Ehrlich, U.W. Schaefer, F. Wendt*  
*V. O. Messerschmidt, A. Bitter, F. Eitel/1996*
- 
- 20 Arbeiten aus dem Fachausschuß V:**  
**I. Langzeitwirkungen phosphor-organischer Verbindungen**  
**II. Die zellvermittelte typübergreifende Immunantwort nach Infektion mit dem Influenzavirus**  
**III. Die Bedeutung vasculärer Reaktionen beim akuten Nierenversagen nach großen Weichteilverletzungen (Crush-Niere)**

I. D. Henschler

II. H. Becht

III. F. Hoffmann, F. Vetterlein, G. Schmidt/1996/Druckversion vergriffen

**19 Radioaktive Strahlungen**

**I. Nuklidspezifische Kontaminationserfassung**

**II. Datenaufbereitung für den Notfallschutz**

I. B. Kromer unter Mitarbeit von K.O. Münnich, W. Weiss u. M. Zähringer

II. G. Hehn/1996/Druckversion vergriffen

**18 Deutsche Regelsysteme:**

**Vernetzungen und Integrationsdefizite bei der Erstellung des öffentlichen Gutes  
Zivil- und Katastrophenschutz in Europa**

L. Clausen, W. R. Dombrowsky, R.L.F. Strangmeier/1996/Druckversion vergriffen

**17 41. Jahrestagung der Schutzkommission beim Bundesminister des Innern**

Vorträge/1996/Druckversion vergriffen

**16 Einfluß von Lipidmediatoren auf die Pathophysiologie der Verbrennungs-  
krankheit**

F. E. Müller, W. König, M. Köller/1993

**15 Beiträge zur dezentralen Trinkwasserversorgung in Notfällen. Teil II**

**1. Einfache organische Analysemethoden**

**2. Einfache Aufbereitungsverfahren**

K. Haberer, M. Drews/1993/Druckversion vergriffen

**14 Beiträge zu Strahlenschäden und Strahlenkrankheiten**

**I. Strahleninduzierte Veränderungen an Säugetierzellen als Basis für die  
somatischen Strahlenschäden**

**II. Hämoepoieseschaden, Therapieeffekte und Erholung**

**III. Präklinische Untersuchung zur Beschleunigung der Erholungsvorgänge in  
der Blutzellenbildung nach Strahleneinwirkung durch Beeinflussung von  
Regulationsmechanismen**

**IV. Radionuklid Transfer**

I. H. Schüßler

II. K.H. von Wangenheim, H.-P. Peterson, L. E. Feinendegen

III. T. M. Fliedner, W. Nothdurft

IV. G. B. Gerber/1993/Druckversion vergriffen

**13 Modifikation der Strahlenwirkung und ihre Folgen für die Leber**

H. Mönig, W. Oehlert, M. Oehlert, G. Konermann/1993

---

**12 Biologische Dosimetrie**

- I. Einleitung: Dosisabschätzung mit Hilfe der Biologischen Dosimetrie**
- II. Ermittlung der Strahlenexposition aus Messungen an Retikulozyten**
- III. Strahlenbedingte Änderung der Chemielumineszenz von Granulozyten als biologischer Dosisindikator**
- IV. Zellmembranänderungen als biologische Dosisindikatoren. Strahleninduzierte Membranänderung im subletalen Bereich, Immunbindungsreaktionen an Lymphozyten**

I. *H. Mönig, W. Pohlit, E. L. Sattler*

II. *H. J. Egner et al.*

III. *H. Mönig, G. Konermann*

IV. *P. Bidon et al./1993/Druckversion vergriffen*

---

**11 Beiträge zur Katastrophenmedizin**

*H. Finger, K. Schmidt, H. W. Jaroni, R. Prinzing, L. Schweiberer, C. Waydhas, D. Nast-Kolb, M. Jochum, K.-H. Duswald, H. Fritz, M. Siebeck, H. Weis/1993/Druckversion vergriffen*

---

**10 Bürgerkonzeptionierter Zivil- und Katastrophenschutz –**

Das Konzept einer Planungszelle Zivil- und Katastrophenschutz  
*W.R. Dombrowsky/1992/Druckversion vergriffen*

- 
- 9 39. und 40. Jahrestagung der Schutzkommission beim Bundesminister des Innern**  
*Vorträge/1993/Druckversion vergriffen*

- 
- 8 Beiträge zur dezentralen Trinkwasserversorgung in Notfällen, Teil I**  
**Einfache anorganische und radiologische Methoden zur Wasseruntersuchung an Ort und Stelle**

*K. Haberer, U. Stürzer/1991/Druckversion vergriffen*

- 
- 7 Das Schädel-Hirn-Trauma**  
**Klinische und tierexperimentelle Untersuchungen zur Pathogenese und neuen Behandlungsansätzen im Rahmen der Katastrophenmedizin**

*E. Pfenninger, F. W. Ahnefeld/1991/Druckversion vergriffen*

- 
- 6 Neutronenschäden**  
**Untersuchungen zur Pathophysiologie, Diagnostik, Prophylaxe und Therapie**

*O. Messerschmidt, A. Bitter/1991/Druckversion vergriffen*

- 
- 5 Strahlenexposition durch Ingestion von radioaktiv kontaminiertem Trinkwasser**  
*R. E. Grillmaier, F. Kettenbaum/1991/Druckversion vergriffen*

- 
- 4 Computereinsatz im Zivil- und Katastrophenschutz – Möglichkeiten und Grenzen**  
*W. R. Dombrowsky/1991/Druckversion vergriffen*
- 
- 3 Der Nachweis schneller Neutronen in der Katastrophendosimetrie mit Hilfe von Ausweisen aus Plastikmaterial**  
*B. Lommler, E. Pitt, A. Scharmann, R. Simmer/1990/Druckversion vergriffen*
- 
- 2 Gammastrahlung aus radioaktivem Niederschlag/Berechnung von Schutzfaktoren**  
*G. Hehn/1990/Druckversion vergriffen*
- 
- 1 Zur Akzeptanz staatlicher Informationspolitik bei technischen Großunfällen und Katastrophen**  
*L. Clausen, W. R. Dombrowsky/1990/Druckversion vergriffen*

## Zivilschutzforschung, Alte Folge

- 
- 22 Organophosphate Biochemie – Toxikologie – Therapie**  
*G. Schmidt, R. Zech et al./1988/Druckversion vergriffen*
- 
- 21 Arbeiten aus dem Fachausschuß II: Radioaktive Niederschläge**  
*1988/Druckversion vergriffen*
- 
- 20 Beiträge zur Katastrophenmedizin**  
*1988/Druckversion vergriffen*
- 
- 19 Beiträge zur Wirkung von Kernwaffen**  
*A. Sittkus, G. Hehn, H. Mönig/1989/Druckversion vergriffen*
- 
- 18 Forschungen für den Zivil- und Katastrophenschutz 1975-1985, Festschrift für Paul Wilhelm Kolb**  
*1986/ISBN 3-7894-0097-1/Druckversion vergriffen*
- 
- 17 Chemischer Strahlenschutz**  
*H. Mönig, O. Messerschmidt, C. Streffer/1984/ISBN 3-7894-0096-3/ Druckversion vergriffen*
- 
- 16 Streß und Individuum**  
*M. Ackenheil, M. Albus, R. R. Engel, H. Hippus/1984/ISBN 3-7894-0092-0/ Druckversion vergriffen*

- 
- 15 Ulmer Vorträge, Festschrift für Franz Gross**  
*1983/ISBN 3-7894-0091-2/Druckversion vergriffen*
- 
- 14 Einführung in die Soziologie der Katastrophen**  
*L. Clausen, W. R. Dombrowsky/1983/ISBN 3-7894-0090-4/Druckversion vergriffen*
- 
- 13 30 Jahre Schutzkommission – Ausgewählte Vorträge**  
*1981/ISBN 3-7894-0084-1/Druckversion vergriffen*
- 
- 12 Untersuchungen zum Strahlenrisiko**  
*H. Schüssler, H. Pauly, B. Glöbel, H. Glöbel, H. Muth, E. Oberhausen/1981/  
ISBN 3-7894-0083-2/Druckversion vergriffen*
- 
- 11 Brandgefährdung von Wohngebieten durch Flächenbrände**  
*O. Carlowitz, T. Krone, R. Jeschar/1980/ISBN 3-7894-0079-3/Druckversion vergriffen*
- 
- 10 Wirkungen des Luftstoßes von nuklearen und konventionellen Explosionen**  
*G. Weigel/1980/ISBN 3-7894-0078-5/Druckversion vergriffen*
- 
- 9 Veränderung von Befinden und Leistung bei einem Bunkerbelegungsversuch**  
*J.F. Dirr, J. Kugler, M. C. Laub, K. Schröder/1979/ISBN 3-7894-0062-9/  
Druckversion vergriffen*
- 
- 8 Beiträge zur Neutronenwaffe**  
*A. Sittkus, H. Mönig/1978/ISBN 3-7894-0061-0/Druckversion vergriffen*
- 
- 7 Bestimmung der Wasserdurchlässigkeit von Kiesbeton aus dem Wassereindringverhalten**  
*J. Steinert/1977/ISBN 3-7894-0056-4/Druckversion vergriffen*
- 
- 6 Literaturübersicht zur Frage der Erholung nach Ganzkörperbestrahlung**  
*A. Kindt, E.-L. Sattler/1977/ISBN 3-7894-0058-0/Druckversion vergriffen*
- 
- 5 Kombinationsschäden als Folge nuklearer Explosionen**  
*O. Messerschmidt/1977/ISBN 3-7894-0055-6/Druckversion vergriffen*
- 
- 4 Untersuchungen zu Therapie und Prognose des Kreislaufschocks beim Menschen**  
*H. Schönborn/1976/ISBN 3-7894-0048-3/Druckversion vergriffen*
- 
- 3 Strahlenempfindlichkeit und die akute und chronische Strahlenschädigung der Leber**  
*R. Lesch/1976/ISBN 3-7894-0048-3/Druckversion vergriffen*

- 
- 2 Beiträge zur Frage der Erholung von Strahlenschäden**  
*H. Muth, H. Pauly/1975/ISBN 3-7894-0039-4/Druckversion vergriffen*
- 
- 1 Schutzkommission beim Bundesminister des Innern**  
**25 Jahre Forschung für den Zivil- und Katastrophenschutz**  
*1975/ISBN 3-7894-0038-6/Druckversion vergriffen*

## Sonderveröffentlichungen

---

**Notfall- und Katastrophenpharmazie I – Bevölkerungsschutz und Medizinische Notfallversorgung**  
*2009/ISBN 978-3-939347-18-7*

---

**Notfall- und Katastrophenpharmazie II – Pharmazeutisches Notfallmanagement**  
*2009/ISBN 978-3-939347-19-4*

---

**Katastrophenmedizin – Leitfaden für die ärztliche Versorgung im Katastrophenfall**  
*2006/ISBN 3-939347-01-9 bzw. 978-3-939347-01-9*

---

**Biologische Gefahren – Beiträge zum Bevölkerungsschutz, 2. Auflage**  
*2005/ISBN 3-00-016733-1/Druckversion vergriffen*

---

**Biologische Gefahren I – Handbuch zum Bevölkerungsschutz, 3. vollständig überarbeitete Auflage**  
*2007/ISBN 3-939347-06-X bzw. 978-3-939347-06-4*

---

**Biologische Gefahren II – Entscheidungshilfen zu medizinisch angemessenen Vorgehensweisen in der B-Gefahrenlage**  
*2007/ISBN 3-939347-07-8 bzw. 978-3-939347-07-1*

---

## Internetveröffentlichungen

---

[www.bbk.bund.de/Publikationen](http://www.bbk.bund.de/Publikationen)

---

**Entwicklung von Therapieschemata für die Behandlung des akuten Nierenversagens (Crush-Niere)**  
*F. Vetterlein, G. Hellige/2005*





ISBN-13: 978-3-939347-42-2