

Abschlussbericht zum Teilvorhaben:

Erzeugung und Steuerung von Mikroplasma in engen Lumina

im Verbundprojekt:

Inaktivierende Mikroplasma zur Sterilisierung im Lumen von medizinischen Instrumenten (ENDOPLAS)



Zuwendungsempfänger	Leibniz-Institut für Plasmaforschung und Technologie e.V. (INP Greifswald e.V.) Felix-Hausdorff-Str. 2 17489 Greifswald
Förderkennzeichen	13N9320
Laufzeit des Vorhabens und Berichtzeitraum	1.12.2007-30.03.2011
Projektleiter	Dr. Jörg Ehlbeck

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	8
1.1 Aufbereitung von Medizinprodukten	8
1.2 Medizinprodukt Endoskop	9
1.3 Nicht-thermische Atmosphärendruckplasmen	10
2. Darstellung des Teilvorhabens	12
2.1 Zielstellung und Aufgaben	12
2.2 Ablaufplanung und Zusammenarbeit mit den Projektpartnern	15
2.3 Ablauf des Teilvorhabens	19
3. Dekontamination von Endoskopen mit Atmosphärendruckplasmen	21
3.1 verwendete Plasmaquellen für die Innendekontamination	21
3.1.1 koaxiale Anordnung (DBE)	22
3.1.2 BiFix - bifilare Helixanordnung	24
3.1.2.1 Aufbau und Funktionsweise	24
3.1.2.2 Diagnostik	29
3.1.2.2.1 Temperatur	30
3.1.2.2.2 Optische Emissionsspektroskopie (OES)	31
- VUV Emission (115 - 220 nm)	31
- UV Emission (220 – 400 nm)	34
3.1.2.2.3 Fourier-Transformed-Infrared- Spektroskopie (FTIR)	37
3.1.3 Mikrowellenplasma PLeXc	42

3.2 verwendete Plasmaquellen für die Außendekontamination	44
3.2.1 koaxiale Entladung	44
3.2.2 Mikrowellen-Entladung	46
3.3 Plasmawirkung auf Oberflächen	47
3.4 Vorbehandlungen von PTFE mittels Plasma zur Beschichtung	51
3.5 Demonstratoren	54
3.5.1 Schlauch-Treater (DBE)	54
3.5.2 Demonstrator 1 (BiFix)	58
3.5.3 Plasmoskop (BiFix)	59
3.5.4 Demonstrator Niederdruck (Mikrowellenplasma)	61
3.5.4 Demonstrator 2 (Mikrowellenplasma)	63
3.6 Mikrobiologie	65
3.6.1 Zielsetzung und allgemeine Bedingungen	65
3.6.2 Abgleich der Methoden	66
3.6.3 Verfahren zur Wiederfindung auf planaren Prüfkörpern	67
3.6.4 Beschreibung des Verfahrens zur Belegung in Lumen-Inneren	68
3.6.5 mathematisches Modell zum etablierten Durchflussverfahren	71
3.6.6 Ringversuche	76
3.6.7 mikrobiologische Untersuchungen zur DBE	81
3.6.8 mikrobiologische Untersuchungen zur BiFix	84
3.6.9 mikrobiologische Untersuchungen zum Demonstrator 1	87
3.6.10 mikrobiologische Untersuchungen zum Demonstrator 2	88
4. Zusammenfassung und Ausblick	94
5. Literatur	98

Abbildungsverzeichnis

2.1	Balkenplan zum Projektstart	18
3.1	3D-Modell einer planaren DBE-Anordnung	24
3.2	Skizze der bifilaren Helixanordnung	25
3.3	Plasmaausbildung	26
3.4	Frontalsicht auf bifilare Helixanordnung	26
3.5	Plasmazündung im PTFE-Schlauch	27
3.6	Plasmazündung im PTFE-Schlauch	27
3.7	Biegeradius der bifilaren Helixanordnung	28
3.8	Ausgetriebenes Plasma	28
3.9	Temperaturmessungen	31
3.10	VUV-Emission	32
3.11	VUV-Emission mit Gaszusätzen	34
3.12	UV-Emission	34
3.13	Integrierte Intensität für N ₂ und OH	37
3.14	Infrarotspektrum	38
3.15	Konzentration der vorhandenen Spezies	41
3.16	Mikrowellenplasma PLexc	42
3.17	Anordnungsmöglichkeiten des PLexc	43
3.18	Außenbehandlung von Endoskopen	45
3.19	Demonstrator zur Außenbehandlung	46
3.20	Außenbehandlung mit PLexc	46
3.21	Plasmawirkung auf Oberflächen	49
3.22	Darstellung der Durchbrennzeiten	50

3.23	Plasmajet für Nanopartikel-Beschichtungen	52
3.24	PlasmaFinishNiederdruckreaktor	52
3.25	REM-Aufnahme von Nanopartikeln	53
3.26	Schlauch-Treater	54
3.27	Experimenteller Aufbau	54
3.28	DBE-Variante für 3 Schläuche	55
3.29	Parallele Behandlung von 6 Schläuchen	56
3.30	Plasmabehandlung eines Arbeitskanals	57
3.31	CAD Zeichnung des Demonstrators 1	58
3.32	Fotographische Aufnahmen des Demonstrators 1	59
3.33	Beispiel für Schlauch mit bifilarer Anordnung	60
3.34	Querschnitt durch einen Endoskopschaft	60
3.35	Demonstrator für ein „Plasmoskop“	61
3.36	Demonstrator Niederdruck	62
3.37	Demonstrator 2	63
3.38	Fließbild zur Innenbelegung	70
3.39	Simulation der zeitabhängigen Charakteristik	73
3.40	Mittlere absolute Anzahl der KBE	74
3.41	Berechnete Anzahl der KBE	75
3.42	Zusammenfassung der Ringversuche	78
3.43	Ergebnis der Ringversuche 1 bis 3	79
3.44	Ergebnis der Ringversuche 4 bis 6	80
3.45	Folienbehandlung in der Vakuumkammer	82

3.46	Mikrobiologie der bifilaren Anordnung	83
3.47	Ergebnis der Schlauchversuche	85
3.48	Plasmabehandlung auf Agarplatten	86
3.49	Mikrobiologie für den Demonstrator 1	88
3.50	Positionierung der Proben im Demonstrator 2	89
3.51	Mikrobiologie für den Demonstrator 2	90
3.52	weitere Mikrobiologie für den Demonstrator 2	91
Tabelle 3.1	molekulare Übergänge	35
Tabelle 3.2	Parameter zur Innenbelegung	71
Tabelle 3.3	Abfolge der Arbeitsschritte	77

1. Einleitung

Aufbauend auf Ergebnissen des früheren Projektes „PLASMOSE-Plasmagestützte Oberflächenmodifizierung mittels modularer selektiver Plasmaquellen“ beschäftigt sich das Projekt Endoplas mit dem Aufbau neuer und der Weiterentwicklung/ Optimierung bestehender Plasmaquellen zur Dekontamination von Lumen in Medizinprodukten. Wurde in PLASMOSE die Anwendbarkeit von Plasmaquellen und Beschichtungen an Medizinprodukten, im speziellen an Kathetern, untersucht, so beschäftigt sich das Projekt Endoplas mit engen Lumen von Medizinprodukten, wie zum Beispiel in flexiblen Endoskopen. Derartige Lumen stellen nach wie vor eine große Herausforderung sowohl für plasmagestützte Dekontaminationsverfahren als auch für herkömmliche Sterilisationsverfahren dar.

1.1 Aufbereitung von Medizinprodukten

Die Aufbereitung von Medizinprodukten umfasst die Reinigung und Desinfektion bzw. Sterilisation von Gegenständen, die aus diagnostischen oder therapeutischen Gründen zur Versorgung der Patienten eingesetzt werden. Medizinprodukte sind dabei definiert als Instrumente, Apparate, Stoffe und andere Gegenstände, die zur Erkennung, Verhütung und Behandlung von Krankheiten und Verletzungen dienen. Stetig steigende Kosten sowie wachsende Anforderungen an die Qualität der medizinischen Behandlung lassen der Aufbereitung und Wiederverwendung von Medizinprodukten eine besondere Bedeutung zukommen [1, 2, 3]. Sie hat sich zusehends zu einem eigenständigen Wirtschaftszweig entwickelt. In der verbindlichen Richtlinie des Robert Koch-Institutes (August 2001) heißt es: "Mit der Aufbereitung ist eine hohe Verantwortung verbunden.

Sie muss nach den anerkannten Regeln der Technik erfolgen und den Stand von Wissenschaft und Technik berücksichtigen." [4] Viele Medizinprodukte sind aufgrund ihres Aufbaus und/oder Funktion als kritisch hinsichtlich ihrer hygienischen Aufbereitung einzustufen. Diese Produkte bedürfen einer mehrstufigen Spezialaufbereitung, die mit der Desinfektion und der Sterilisation der Güter zwei biologische Dekontaminationsschritte enthält. Die Desinfektion dient dem Schutz des mit der Wiederaufbereitung beschäftigten Personals sowie der Schaffung günstiger Voraussetzungen für den Sterilisationserfolg. Nach erfolgter Reinigung und Desinfektion werden die Medizinprodukte in einer rekontaminationssicheren Endverpackung sterilisiert.

1.2 Medizinprodukt Endoskop

Vor dem Hintergrund der medizinischen Entwicklungen der vergangenen Jahre, insbesondere der minimal invasiven Techniken wie zum Beispiel der Endoskopie, haben sich die Anforderungen und Aufgaben hinsichtlich solcher Instrumente stark erhöht. Eine wesentliche Aufgabe ist die Wiederaufbereitung dieser Medizinprodukte. Hier treten derzeit Grenzen durch die Verwendung thermolabiler Materialien auf. Herkömmliche Reinigungs- und Desinfektionsmethoden und –verfahren sind daher oft nicht geeignet, die Medizinprodukte sicher aufzubereiten. Hierin ist die intensive Suche nach und der erhöhte Bedarf an materialschonenden Verfahren zur biologischen Dekontamination und Sterilisation unter Vermeidung chemischer Rückstände in und auf den Produkten zu finden.

Ein lange bekanntes Problem ist die zuverlässige Reinigung flexibler Endoskope. [5-8] Dies äußert sich auch in einer speziellen Richtlinie zur Aufbereitung flexibler Endoskope

des Robert-Koch-Instituts. [4, 9] Eine zusätzliche Bedeutung kommt den TSE-Erregern zu, die bei möglichem schneidendem Kontakt mit Risikogewebe (Biopsien) zu berücksichtigen sind. [10, 11] Thermische Verfahren zur Desinfektion und Sterilisation sind für eine größer werdende Zahl der Instrumente, dazu zählen insbesondere auch die Endoskope, nicht anwendbar. [12] Chemische Verfahren führen zu einer beschleunigten Alterung oder anderen Veränderungen der eingesetzten Kunststoffe und setzen z. T. umwelt- oder gesundheitsschädigende Stoffe (z.B. Ethylenoxid, Formaldehyd, H₂O₂, Peressigsäure) ein. Weiterhin sind die meisten dieser Verfahren nicht in einem für Endoskope ausreichendem Maße spaltgängig. [13, 14]

1.3 Nicht-thermische Atmosphärendruckplasmen

Plasmatechnische Verfahren stellen einen interessanten Ansatz zur Lösung der Aufbereitungsproblematik von thermolabilen Medizinprodukten, wie weltweite Forschungsarbeiten bestätigen, dar. [15-17] Neben einer Inaktivierung von Mikroorganismen kann durch physikalische Plasmen ein Abtrag von organischem Material erfolgen [18] und die Möglichkeit einer Gewebebehandlung ist gegeben. [19]

Die Miniaturisierung von nicht-thermischen Plasmen bis in den Sub-Millimeter-Bereich ist darüber hinaus ebenfalls Gegenstand vielfältiger Forschungsarbeiten. Unterschiedliche Ansätze an offenen Konfigurationen, wie z.B. dem Plasmajet oder der Plasma-Needle [20-25, 42] wurden bereits umgesetzt. Die kontrollierte Generierung von Plasmen im Inneren enger und endständiger Lumina ist hingegen immer noch wenig erforscht und in der Literatur berücksichtigt. Ein Einbringen von Plasma in enge Lumen und deren antimikrobielle Wirkung wurde bei [26, 27] gezeigt. Das tiefergehende

physikalische Verständnis der Plasmagenerierung und -ausbildung sowie eine Übertragbarkeit der Ergebnisse auf Produkte mit spezifischen Eigenschaften wie die flexibler Endoskope blieben offen. Erste Antworten wurden im Verlauf des Projektes Endoplas gegeben.

Das Leibniz-Institut für Plasmaforschung und Technologie e.V. (INP) besitzt eine umfassende Expertise bei der Erstellung sowie dem Betrieb von Plasmaquellen für die verschiedensten Anwendungen. Als Institut der Leibniz-Gemeinschaft liegt der Schwerpunkt in der anwendungsorientierten Grundlagenforschung. Im Institut werden u.a. Beschichtungen und Oberflächenmodifikationen vom Ultrahochvakuumbereich bis zu Normaldruckbedingungen sowohl an planaren und strukturierten Oberflächen als auch Pulvern für die unterschiedlichsten Anwendungen vorgenommen. Der Bereich der Anwendungen geht von Korrosionsschutzschichten bis hin zur Biomodifizierung von Substraten. Plasmainduzierte chemische Prozesse werden im Volumen und an Oberflächen untersucht. Neben der umfangreichen Erfahrung in der Erstellung und dem anwendungsnahen Einsatz der plasmatechnischen Anlagen besteht erhebliche Kompetenz auf dem Gebiet der Charakterisierung und Diagnostik der Plasmen. Diese schließt eine ganze Reihe von oberflächenanalytischen Verfahren ein. Die entsprechende Ausrüstung ist am INP vorhanden bzw. wurde dort entwickelt.

Darüber hinaus konnte das INP im Verlauf des Projektes seine Kompetenzen in Bereich der Mikrobiologie, der Wechselwirkungen von physikalischen Plasmen mit Flüssigkeiten und der Zellbiologie verstärken. Im August 2010 wurde am INP das Zentrum für Innovation und Kompetenz (ZIK) „plasmatis“ eingeweiht.

2. Darstellung des Teilvorhabens

2.1 Zielstellung und Aufgaben

Ziel des INP Greifswald war es, ein hygienisch sicheres und die Funktionalität erhaltendes Aufbereitungsverfahren für flexible Endoskope zu erarbeiten. Dabei bestand die Aufgabe des INP vorrangig darin:

1. Ein oder mehrere Verfahren zur Generierung von nicht-thermischen Plasmen in engen Lumina zu erarbeiten

sowie

2. die Diagnostik der erzeugten Plasmen zur Ermittlung seiner Eigenschaften und das Verständnis der Oberflächenwechselwirkungsprozesse vorzunehmen

als Voraussetzung für

3. die Optimierung der Plasmen für die antimikrobielle Behandlung und den plasmagestützten Auftrag von Lipid-Nanopartikeln.

Im Teilbereich 1 (Screening) beteiligte sich das INP an der Analyse und Auswahl der Endoskopmodelle unter dem Aspekt einer prinzipiellen Eignung des jeweiligen Produktes für die Plasmabehandlung. Die diversen unterschiedlichen Bauformen und Materialkombinationen erforderten einen detaillierten Blick auf die Probleme bzw. Anforderungen an eine plasmatechnische Lösung der Reinigungs- und Sterilisationsaufgabe.

Anschließend sollte eine Kategorisierung der Instrumente bzw. Modelle in Klassen bzgl. einer möglichen Plasmabehandlung vorgenommen werden. Für die klassenspezifischen Probleme wurden entsprechende Lösungsansätze erarbeitet. Dazu wurde eine Vorauswahl von Plasmaquellen getroffen, die in einfachen Laboraufbauten an unterschiedlichen Modellkörpern getestet wurden. Diese Versuche hatten eine Fokussierung auf die erfolgversprechendsten Konzepte zum Ziel und gaben ferner wichtige Aufschlüsse für die Erstellung der Prüfkörper im Teilbereich 2.

Darüber hinaus waren zur mikrobiologischen Testung der Keimreduktion in Lumina entsprechende Nachweismethoden im Rahmen dieser Phase zu erarbeiten.

In den Arbeiten des Teilbereiches 2 sollte zunächst die bereits bekannte gute Spaltgängigkeit von miniaturisierten, RF-angeregten Normaldruck-Strahlplasmen aufgrund ihrer hohen Strömungsgeschwindigkeit ausgenutzt werden. Danach wurden weitere Methoden zur Generierung eindimensional ausgedehnter Plasmen in engen, linear ausgedehnten Lumina untersucht (diffuse ausgedehnte Plasmagenerierung). Alternativ wurden auch Plasmen untersucht, die durch innere und äußere Felder kontrolliert durch die Lumina geführt werden können (geführter Plasmabetrieb). Parallel zu diesen Ansätzen wurde geprüft, an welchen Stellen alternative Plasmaverfahren vorteilhaft sein können. Die Bearbeitung dieser Teilaufgaben erfolgte an den Prüfkörpern, für die das INP Anforderungen erarbeitete und an die Projektpartner weiterreichte.

Zusammen mit dem Verbundpartner IMaB sollten die Methoden zum Schichtaufbau erarbeitet werden. Dazu waren zunächst Untersuchungen an planaren Testsubstraten

erforderlich. Außerdem waren geeignete Verfahren für die Außensterilisation der ausgewählten Instrumente zu finden.

Im Teilbereich 3 nahm das INP parallel zum Teilbereich 2 plasmadiagnostische Untersuchungen an den Plasmaquellen vor. Mittels Optischer Emissionsspektroskopie sollte die Zusammensetzung der Plasmen untersucht und Aussagen über Plasmaparameter getroffen werden. Die Ausbildung und Propagierung der Plasmen in den engen Lumina sollte mit Hilfe schneller und hochauflösender Bildgebungstechniken (ICCD Kamera) verfolgt werden. Parallel dazu waren umfangreiche oberflächenanalytische Untersuchungen vorgesehen. Die Plasma- und oberflächendiagnostischen Methoden wurden gekoppelt mit der Testung der Reduktion mikrobiologischer Kontaminationen in den Lumina. Dazu waren die entsprechenden Nachweismethoden im Rahmen dieses Projektes auszuarbeiten.

Im Teilbereich 4 war die Beteiligung des INP an der Konzeption und Konstruktion der Demonstratoren notwendig. Zudem war das INP in die Wirksamkeitstests der Behandlungen und die Funktionstests der Geräte nach dem Plasmaverfahren eingebunden. Eine weitere Aufgabe bestand darin, den Endoskopherstellern Anforderungen und Möglichkeiten von Modifikationen an den Instrumenten aufzuzeigen. Damit sollte die generelle Aufbereitbarkeit der Produkte verbessert werden.

Die einzelnen Arbeitspakete des INP sind im Anschluss an die Erläuterung des Projektablaufes detailliert dargestellt.

2.2 Ablaufplanung und Zusammenarbeit mit den Projektpartnern

Die Ablauf- sowie die Zeitplanung erfolgte in enger Abstimmung mit den anderen Teilvorhaben, insbesondere aufgrund der engen Verzahnung der jeweiligen Arbeitspakete mit den Teilvorhaben des Fraunhofer IGB, der HygCen GmbH, der Webeco GmbH & Co.KG, der Vanguard AG, der XION medical GmbH und des IMAB Greifswald e.V. sowie der FujiFilm Europe GmbH. Diese enge Verzahnung war auf Grund der stark unterschiedlichen experimentellen Ausstattung und der fachlichen Expertise zwischen den Partnern gegeben.

Das Leibniz-Institut für Plasmaforschung und Technologie e.V. war in erster Linie für die folgenden Punkte mit verantwortlich:

- Erarbeitung und Diagnostik von Plasmaquellen zur Dekontamination von Lumen
- Adaption der untersuchten Plasmaquellen an die ausgewählten Medizinprodukte
- Plasmaprozesse in Kombination mit Nanopartikel-Beschichtungen
- Nachweis der antimikrobiellen Wirkung der verwendeten Atmosphärendruckplasmaquellen im Lumen von Medizinprodukten
- Optimierung der mikrobiologischen Nachweismethoden an den gewählten Prüfkörper

Um die enge Verzahnung zwischen Plasmaquellenentwicklung und Integrationsfähigkeit zu gewährleisten, wurde je ein Mitarbeiter der Webeco GmbH & Co.KG und der Vanguard AG über die gesamte Projektlaufzeit für die erforderlichen Arbeiten an das INP Greifswald abgestellt.

Der Projektpartner IMAB Greifswald e.V. beschäftigte sich mit der Auswahl, Herstellung und Charakterisierung der Lipid-Nanopartikel sowie der Prüfung der bakteriostatischen

Wirkung der Beschichtung im Lumen von Medizinprodukten.

Die Aufgabe des Projektpartners XION medical GmbH bestand in der Bereitstellung von verschiedensten Prüfkörpern und Materialien flexibler Endoskope und in der Konstruktion, Integration und Adaption von Plasmaquellen an herkömmliche, flexible Endoskope.

Weiterhin stellte der Projektpartner FujiFilm Europe GmbH eine Vielzahl von handelsüblichen Biopsiekanälen und kompletten Gastroskopen zur Verfügung.

Die Konstruktion und Erarbeitung von komplexen Anlagendemonstratoren zur Sterilisation von Medizinprodukten, die Integration spezieller Plasmaquellen in diese Demonstratoren sowie die Bedienung und Durchführung von Sterilisationsprozessen, war die Aufgabe vom Projektpartner Webeco GmbH & Co.KG.

Die Vanguard AG beschäftigte sich mit der Integration der Plasmaquellen in die Demonstratoren sowie deren Adaption an die komplexen Aufreinigungs- und Dekontaminationsverfahren.

Als akkreditiertes und zertifiziertes biologisches Prüflabor übernahm die HygCen GmbH mikrobiologische Untersuchungen insbesondere im Bereich der Bakteriophagen und war eines der an den Ringversuchen teilnehmenden Labore.

Das Fraunhofer IGB bearbeitete drei große Schwerpunkte. Zum einen die Entwicklung und Adaption von geeigneten Plasmaquellen im Niederdruck zur Dekontamination von engen Lumen, zum anderen beschäftigte es sich auch mit den biologischen Fragestellung, nahm an den Ringversuchen teil und etablierte einen schnellen Pyrogennachweistest.

Der detaillierte Arbeitsplan des Teilvorhabens ist Abbildung 2.1 zu entnehmen. Er gliedert sich in 4 Phasen:

1. Screening

2. Erarbeitung der Plasma- und Beschichtungsverfahren

3. Diagnostik

4. Demonstratoren

Die Phase 1 beinhaltete die Vorauswahl von Endoskopmodellen und Plasmaquellen sowie die Testung von Plasmaquellen auf ihre grundsätzliche Eignung zur Dekontamination im Lumen von Medizinprodukten. Die Phase 2 widmete sich der Erarbeitung und Anpassung geeigneter Plasma- und Beschichtungsverfahren an die speziellen Geometrien flexibler Endoskope.

In der 3. Phase wurden die erarbeiteten Plasmaquellen hinsichtlich ihrer antimikrobiellen Komponenten und ihrer Wechselwirkung mit den Oberflächen der Medizinprodukte untersucht. In der 4. Phase wurden spezielle Labormuster erarbeitet, welche den Einsatz von Normaldruckplasmen in der Aufbereitung von flexiblen Endoskopen demonstrieren.

Arbeitspakete	Projektlaufzeit in Quartalen												
	07	2008			2009				2010				
	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV
1. Screening													
1.1. 1.1.1. Produkt-Screening													
1.2. 1.2.1. Plasmaquellen-Screening													
1.3. 1.3.1. Plasmawirkung in Spalten													
1.3. 1.3.2. Plasmawirkung in Tubings													
1.4. 1.4.1. Erstellung mikrobiologischer Nachweistest													
1.5. 1.5.1 Thermische Belastung durch Mikroplasma													
1.6. Auswahl und Herstellung geeigneter Nanopartikel													
1.7. 1.7.1. Plasmagestützte Nanopartikelbeschichtung auf planaren Substraten													
2. Erarbeitung des Plasmaverfahrens													
2.1. 2.1.1. Mitarbeit Erstellung Pflichtenheft und Lastenheft													
2.2. 2.2.1. Spezifikation und Anforderungen Prüfkörper													
2.3. 2.3.1. Normaldruck-Strahlplasma für enge Lumina und Kanäle													
2.3. 2.3.2. Diffus ausgedehnte Plasma für enge Lumina und Kanäle													
2.3. 2.3.3. Geführte Plasma in engen Lumina und Kanälen													
2.4. 2.4.1. Plasmagestützte Nanopartikelbeschichtung in Spalten und Tubings													
2.4. 2.4.2. Verfahren zum Lipid-Nanopartikelaufrag in Prüfkörpern													
2.4. 2.4.3. Plasmagestützte Nanopartikelbeschichtung in Prüfkörpern													
2.5. 2.5.1. Konzeption Plasmaquellen für Außenbehandlung Endoskope													
2.5. 2.5.2. Konzeptumsetzung Plasmaquellen für Außenbehandlg. Endoskope													
2.6. 2.6.1. Screening und Testung alternativer Plasmaverfahren													
3. Diagnostik													
3.1. 3.1.1. Plasmacharakterisierung													
3.1. 3.1.2. Plasmaausbreitung in Lumina													
3.1. 3.1.3. Konzepterstellung Prozessmonitoring													
3.2. 3.2.1. Oberflächenwirkung Plasma in Prüfkörpern													
3.3. 3.3.1. Mikrobiologische Testung der Keimreduktion in Prüfkörpern													
3.4. Erstellung Prüfsystem Pyrogentest für kleinen Lumina													
3.5. 3.5.1. Durchführung Behandlungen für Analyse antimikrob. Ausrüstung													
3.6. 3.6.1. Erstellung Dokumentation und Auswertung													
4. Demonstratoren													
4.1. 4.1.1. Auswahl Behandlungsmethoden													
4.1. 4.1.2. Erarbeitung kombiniertes Verfahren													
4.2. 4.2.1. Erstellung Anforderungsliste für Plasmabehandlung													
4.2. 4.2.2. Konzeption Demonstrator													
4.2. 4.2.3. Prozessmonitoring Demonstrator													
4.3. 4.3.1. Optimierung Sterilisation im Demonstrator													
4.4. 4.4.1. Optimierung Beschichtung im Demonstrator													
4.5. Demonstrator zur Lumenpyrogenanalyse													
Meilenstein													
Verbundtreffen													

Abb. 2.1: Balkenplan zum Projektstart 1.12.2007

2.3 Ablauf des Teilvorhabens

Das Projekt konnte im Wesentlichen planmäßig abgearbeitet werden. Es gab grundsätzlich nur kleine Verschiebungen des Startzeitpunkts der Arbeitspakete, sowohl nach vorne als auch nach hinten. Einige Arbeitspakete wurden aufgrund der im Projekt gewonnenen Erkenntnisse und der dadurch entstandenen alternativen Möglichkeiten verlängert, so dass zu jedem Zeitpunkt des Projektes mehrere Lösungsstrategien parallel bearbeitet wurden. Die Meilensteine nach 18 Monaten Projektlaufzeit wurden erreicht. Zu diesem Zeitpunkt lagen verschiedenste Prüfkörper und Endoskopmodelle für die weiteren Untersuchungen vor. Es konnte die Realisierbarkeit von mehreren Lösungsansätzen zur Plasmaerzeugung in engen Lumen an Prüfkörpern gezeigt werden. Weiterhin war ein Entwurf einer Konzeption für die technische Umsetzbarkeit der Plasmabehandlung in der Aufbereitung erarbeitet, als auch die Machbarkeit einer keim- und schmutzabweisenden Beschichtung durch Lipid-Nanopartikel an äußeren Oberflächen wurde in Verbindung mit den Projektpartnern gezeigt. Um die Konzeption und Anpassung der Plasmaquellen an die Geometrien flexibler Endoskope stetig weiter zu entwickeln, wurde das AP 2.2 (Prüfkörper) stark verlängert. Dadurch konnten die neusten Erkenntnisse hinsichtlich des Aufbaus der Plasmaquellen und der Applizierung der Plasmen in engen Lumen konsequent hinsichtlich eines Einsatzes an realen Endoskopen optimiert werden. Entsprechend wurde auch das Paket 2.3 Erarbeitung Plasmaquellen für Lumensterilisation und -bearbeitung nach hinten verlängert. Im Gegenzug dazu wurde das AP 3 Diagnostik, speziell die Diagnostik Plasmaquellen 3.1 und die Analyse der Plasmawirkung auf Oberflächen 3.2, eher begonnen. So konnten die Plasmaquellen parallel an immer komplexer werdende Prüfkörper angepasst werden, wobei gleichzeitig die Plasmen und deren Wirkung auf

Oberflächen und Mikroorganismen als Hauptkriterium für die Verwertbarkeit der Ergebnisse untersucht wurden. Entsprechend der dadurch entstandenen effizienteren Arbeitsweise war es möglich, die Konzeption und Konstruktion von Demonstratoren (AP 4.2) eher zu beginnen. Die Testläufe für Kompletsterilisation mit den erarbeiteten Demonstratoren wurden abschließend durchgeführt. In Laufe der Projektbearbeitung entstand ein, vielversprechender Ansatz auf Basis der bifilaren Entladungsanordnung. Dieser Ansatz wurde als so erfolversprechend angesehen, dass bereits mit den daran beteiligten Industriepartnern Schutzrechte angemeldet wurden. Das Problem bestand nun darin, dass das grundsätzliche Funktionieren zunächst nur an handgearbeiteten Speziälschläuchen demonstriert werden konnte. Um eine vernünftige Reproduktion der erforderlichen mikrobiologischen Testungen zu erreichen, war es notwendig, die Materialien in deutlich höherer Menge aus professioneller Fertigung zur Verfügung zu stellen. Dies wurde durch den Projektpartner XION mit einem ausländischen Lieferanten im Sommer 2009 vorbereitet. Voruntersuchungen an Mustern erfolgten unmittelbar nach Erhalt, so dass im November die Produktion einer Sonderserie beauftragt werden konnte. Diese Bestellung wurde aufgrund von Anlaufproblemen in der Produktion des Zulieferers erst Ende Mai 2010 geliefert. Dieser extrem lange Vorlauf von der Idee bis zum Erhalt der Schläuche von fast 12 Monaten war nicht abzusehen und konnte daher in der Projektplanung nicht vorgesehen werden.

In der ursprünglich vorgesehenen Projektlaufzeit bis Ende November 2010 war eine Bearbeitung und ausführliche Testung der Schläuche nicht mehr möglich. Daher wurde eine zuwendungsneutrale Verlängerung der Projektlaufzeit von 4 Monaten, also bis zum 31. März 2010, beantragt und vom Projektträger bewilligt.

3. Dekontamination von Endoskopen mit Atmosphären- Druckplasmen

3.1 verwendete Plasmaquellen für die Innendekontamination

Endoskope sind sehr komplexe und kostenintensive Medizinprodukte zur intrakorporalen Diagnostik und Chirurgie. Untersuchungen und Behandlungen mit Endoskopen beinhalten immer das Risiko nosokomialer Infektionen, dies wird auch in der Literatur diskutiert. [7, 14 28] Diese Infektionen sind gesundheitsschädlich und müssen durch eine konsequente Prophylaxe verhindert werden. Eine solche Prophylaxe beinhaltet hauptsächlich sichere Reinigungs- und Sterilisationsmethoden für die Endoskope. Die Wiederaufbereitung von Endoskopen stellt eine Herausforderung hinsichtlich temperaturlabiler Materialien wie PTFE und PU sowie stark kontaminierten, langen und sehr schmale Biopsiekanälen dar. Auf Grund der zur Konstruktion von Endoskopen verwendeten Materialien ist eine Hitzesterilisation mittels Autoklav (121°C) nicht möglich. Die langen und engen Lumen der Biopsiekanäle verhindern eine schnelle, gleichmäßige und einfache Penetration mit antimikrobiell wirksamen Agenzien. [28] Üblicherweise genutzte chemische Gase sind meistens giftig und karzinogen. Daher sind spezielle Schutz- und Sicherheitsvorkehrungen für das Personal zu treffen. Darüber hinaus treten durch diese Chemikalien Materialschädigungen und Schwierigkeiten mit der Biokompatibilität auf. [29-31]

Nicht-thermisches atmosphärisches Plasma hat ein sehr großes Potential für die Sterilisation von komplexen Medizinprodukten und ist daher von großem wissenschaftlichem und hygienischem Interesse. [32] Typischerweise, bestehen

Biopsiekanäle aus PTFE oder FEP und haben einen Innendurchmesser von 1 bis 2 mm. Die Länge der Kanäle überschreitet meistens einen Meter. Innerhalb der letzten Jahre wurden verschiedene Konzepte zur Plasmazündung in langen, engen Schläuchen entwickelt. Die Techniken reichen dabei von der Zündung einer Dielektrisch-behinderten Entladung (DBE) mittels Außen- und Innenelektrode bis zur Verwendung von „Afterglow“-Plasmen und Plasma bullets. [27, 33, 34]

3.1.1 koaxiale Anordnung (DBE)

Auf der Grundlage von, aus der Literatur bekannten, Anordnungen zur Erzeugung von Normaldruck-Plasmen in engen Schläuchen und eigenen experimentellen Untersuchungen wurde die Entscheidung getroffen, einerseits eine koaxiale DBE-Anordnung mit einer geerdeten metallischen Innenelektrode und andererseits eine planare DBE-Anordnung mit zwei Außenelektroden für die weiteren Untersuchungen zu favorisieren. Für die Durchführung entsprechender Dekontaminationsversuche an Teflonschläuchen waren dabei zwei unterschiedliche Aspekte der Plasmabehandlung von Interesse. Einerseits sollte mit einer Plasmavorbehandlung der Schläuche eine Hydrophilisierung der inneren Oberfläche erreicht werden, damit im Interesse einer Reproduzierbarkeit der Dekontaminationsergebnisse eine gleichmäßige Kontamination der Oberfläche erreicht wird. Andererseits sollte mit der Plasmabehandlung nach der Kontamination eine möglichst effektive Dekontamination durch die Wirkung des Plasmas erzielt werden. Für die Vorbehandlung der für die Versuche verwendeten Teflonschläuche hat sich die koaxiale DBE-Anordnung mit geerdeter metallischer Innenelektrode bewährt, wobei zur Erzielung einer signifikant hydrophilen Oberfläche im Falle von Teflon als Prozessgas Formiergas (95% N₂ + 5% H₂) verwendet wurde. Diese Anordnung hat den Vorteil, dass sie auf Grund der geringen erforderlichen Betriebs-

spannung auch für den Betrieb mit Prozessgasgemischen mit größeren Molekülgas-Anteilen (z.B. Luft, Formiergas, N_2 , O_2) geeignet ist. Der Schlauch wird dabei, wie in Abbildung 3.1 zu sehen, zwischen der Seitenplatte 1 aus Aluminium (geerdete Elektrode) und einem, auf einer Grundplatte aus Polycarbonat aufgespannten, durch die Seitenplatte 2 aus Polycarbonat gestützten Draht mit Silikonisolation (Hochspannungselektrode) eingeklemmt. Durch die Verschraubung der Seitenplatten mit der Grundplatte und einer Deckplatte aus Polycarbonat wird einerseits der Schlauch zwischen den eng anliegenden Elektroden fixiert und andererseits die Ausbildung parasitärer Entladungen außerhalb des Schlauches verhindert. Die Verwendung von Polycarbonat, als isolierendes Material für Deck- und Grundplatte, ermöglicht dabei, die Ausbildung des Plasmas im Schlauch betrachten und visuell bezüglich Homogenität bzw. Filamentierung bewerten zu können. Die koaxiale DBE-Anordnung mit Innenelektrode wurde in ähnlicher "Sandwich"- Bauweise gefertigt. In diesem Fall wird der Draht als Hochspannungselektrode, zusammen mit der Seitenplatte 2 aus Polycarbonat, durch eine Seitenplatte 2 aus Aluminium ersetzt, die gemeinsam mit der Seitenplatte 1 aus Aluminium als Hochspannungselektrode geschaltet wird. Als geerdete Gegenelektrode dient ein, in den Schlauch eingeführter Draht aus Edelstahl von 1mm Durchmesser.

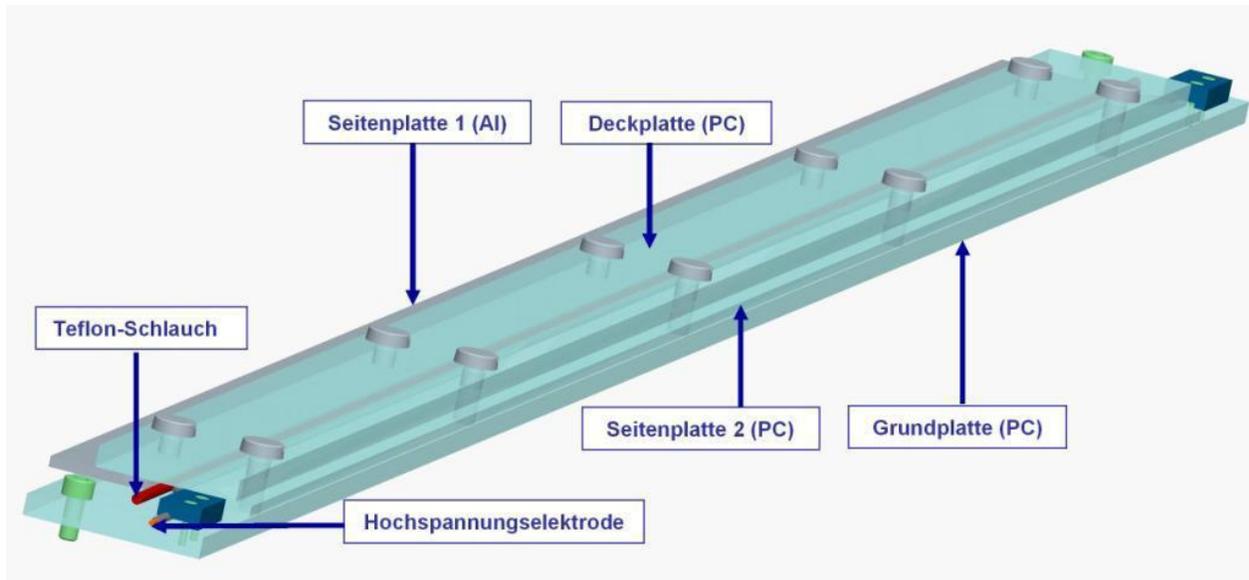


Abb. 3.1: 3D-Modell einer planaren DBE-Anordnung zur Plasmabehandlung der inneren Oberfläche von Teflonschläuchen.

3.1.2 BiFix – bifilare Helixanordnung [43]

3.1.2.1 Aufbau und Funktionsweise

Neben der Möglichkeit eine dielektrisch behinderte Barriereentladung unter Normaldruck in einem Schlauch mittels koaxialer Elektrodenanordnung zu zünden, lässt sich die Plasmaerzeugung auch ohne Innenelektrode realisieren. Dazu werden zwei Elektroden, wie in Abbildung 3.2 skizziert, parallel und spiralförmig um einen PTFE-Schlauch gewickelt und geeignet elektrisch voneinander isoliert. Nach dem Anlegen einer ausreichend hohen elektrischen Wechselspannung zwischen den beiden Elektroden, zündet im Innern des Schlauches eine Gasentladung. Als Gase kommen vorzugsweise leichtzündliche Gase wie Argon und Helium zum Einsatz, die durch den Schlauch geströmt werden. Allerdings lassen sich auch erhebliche Mengen von Stickstoff und

Sauerstoff zumischen, ohne dass die Zündung beeinträchtigt wird. Die Spannungsversorgung erfolgt mittels Audioverstärker und Zündspule, sodass ein sinusförmiges Hochspannungssignal mit variabel einstellbarer Frequenz im Kilohertzbereich und einer maximalen Amplitude von bis zu 22 kVss erzeugt wird.

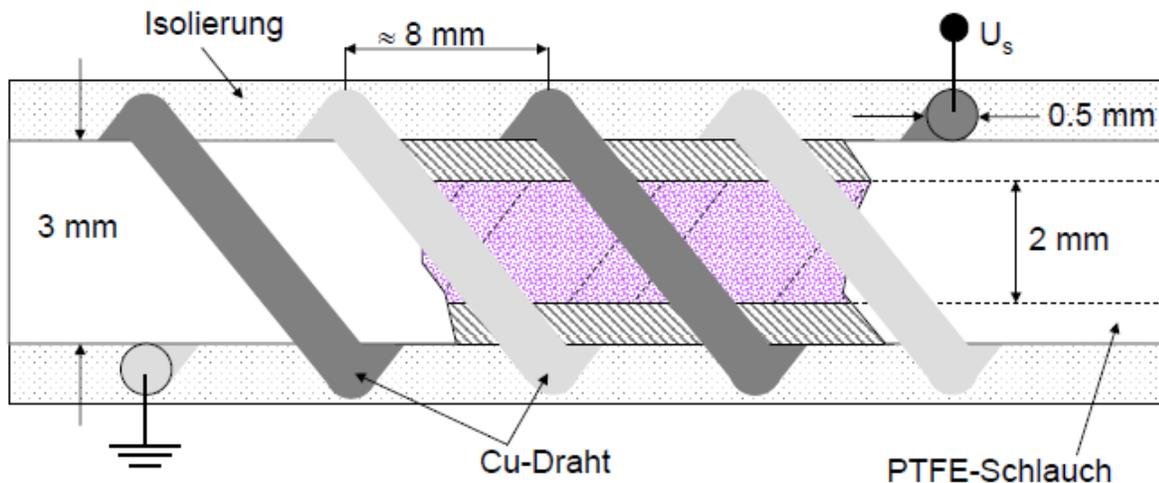


Abb. 3.2: Skizze der bifilaren Helixanordnung

Die Plasmaausbildung ist in Abbildung 3.3 für eine reine Argonentladung und für eine Entladung in Argon und Stickstoff dargestellt. Deutlich ist das entlang der Elektroden gewundene spiralförmig ausgebildete Plasma zu erkennen. Die unterschiedliche Färbung beider Plasmen rührt von der unterschiedlichen spektralen Zusammensetzung des Plasmas her. In Abb. 3.4 ist ein frontal aufgenommenes Foto von der bifilaren Helixentladung dargestellt. Hier ist neben den Leuchterscheinungen auf der Tubusinnenseite ein über den gesamten Durchmesser brennendes Filament zu erkennen. Die Gasentladung bildet sich demnach zwischen den sich gegenüberliegenden und gegensätzlich gepolten Elektroden aus.

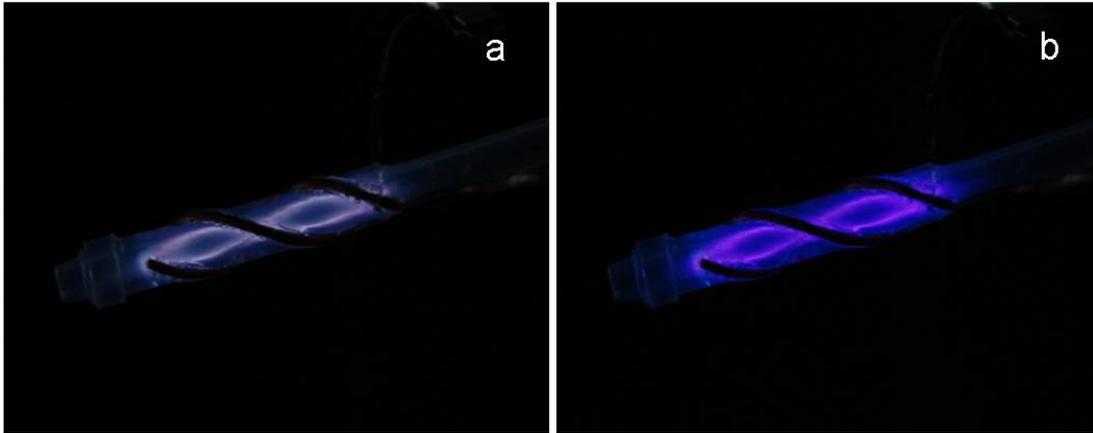


Abb. 3.3: Plasmaausbildung unter Verwendung der bifilaren Helixelektroden-anordnung. Die Schlauchlänge ist so gewählt, dass eine vollständige Wicklung realisiert wird. a) 1,5 slm Argon b) 1,5 slm + 20 sccm Stickstoff.

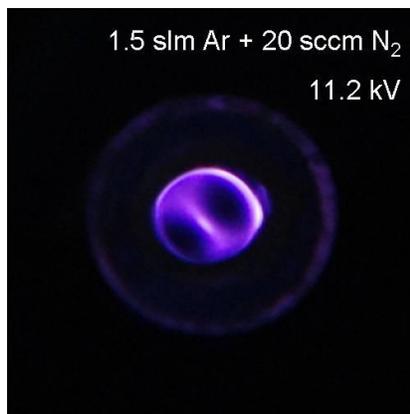


Abb. 3.4: Frontaler Blick in das Entladungsvolumen der bifilaren Helixanordnung.

Es gelang mit diesem Aufbau eine gleichmäßige Plasmaerzeugung in bis zu 110 cm langen PTFE-Schläuchen (siehe Abbildung 3.5), wobei die Zündung selbstständig erfolgte. Darüber hinaus sind auch längere Schläuche (mehrere Meter, Abbildung 3.6) und FEP als Material möglich. Zusätzlich ist zu erwähnen, dass die so gefertigten Schläuche weiterhin flexibel sind, wobei ein Biegeradius von 6 cm problemlos erreicht wird (siehe Abbildung 3.7). Kleinere Biegeradien sind mit industriell hergestellten Schläuchen möglich.

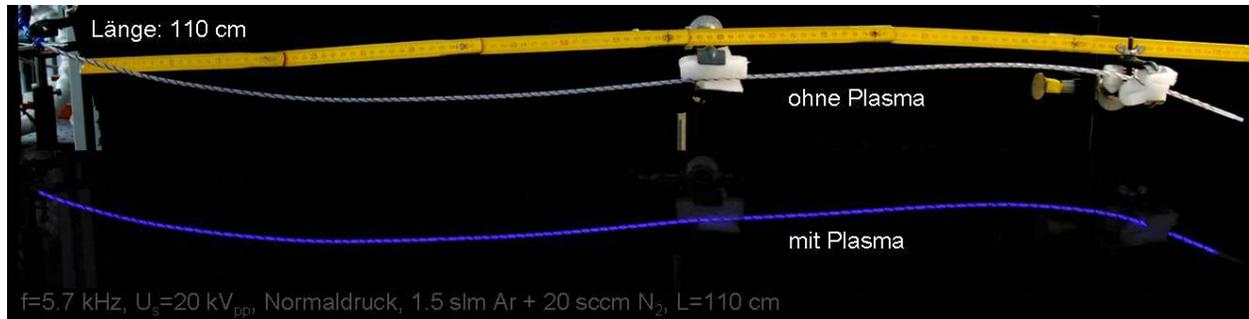


Abb. 3.5: Plasma in einem 110 cm langen PTFE-Schlauch mit einem Innendurchmesser von 2 mm. Die Anregungsfrequenz und die Spannung betragen 5.7 kHz und 20 kVss. Die Gasmischung besteht aus 1.5 slm Argon und 20 sccm Stickstoff.

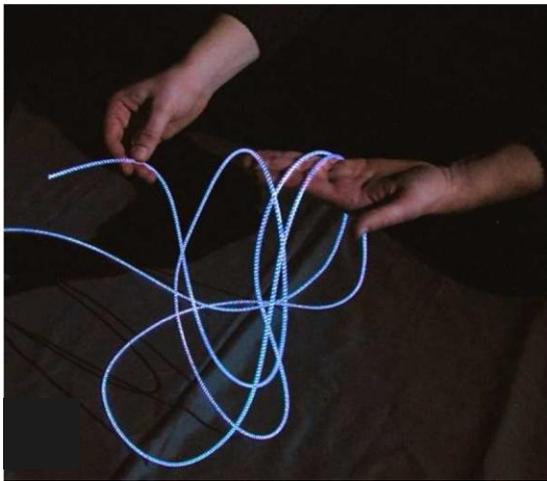


Abb. 3.6: Kommerziell gefertigter FEP-Schlauch mit Helixanordnung der Elektroden, Innendurchmesser von 2 mm und Wandstärke von 0,75 mm.

Die Erzeugung des Plasmas ist bei der bifilaren Helixanordnung nicht nur auf das Innere des Schlauchs begrenzt. So ist es zudem möglich, durch eine geeignete Wahl von Gasstrom und Schlauchgeometrie ein Plasma am Schlauchende aus dem Lumen zu treiben wie in Abbildung 3.8 zu sehen ist. Die geometrische Länge dieser ausgetriebenen Entladung beträgt bis zu einem Zentimeter. Durch Hinzufügen einer virtuellen Masse am Schlauchende wird seine Strahlungsintensität deutlich erhöht.

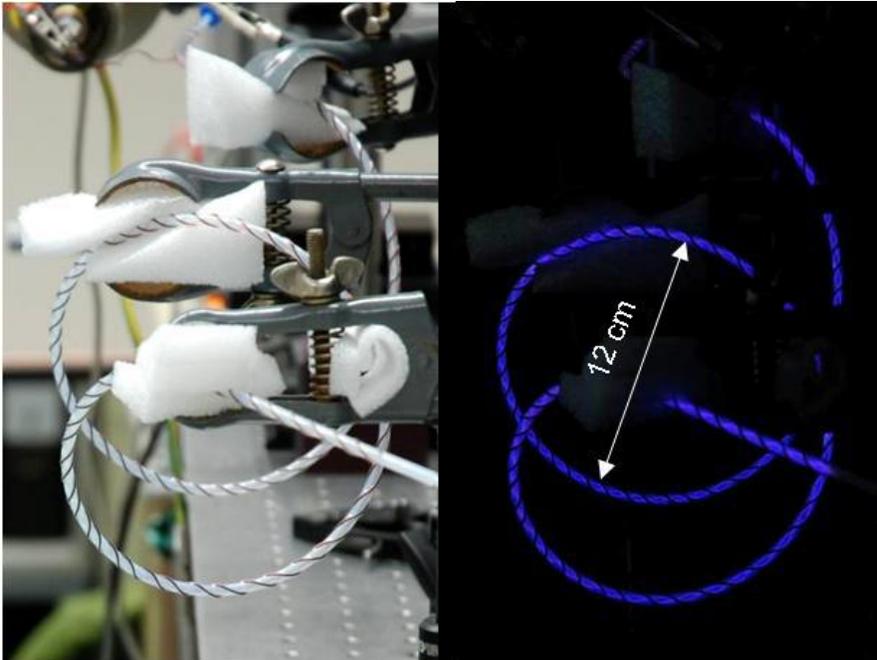


Abb. 3.7: Foto der bifilaren Helixanordnung. Die Flexibilität des PTFE-Schlauchs ist mit dieser Anordnung nicht beeinträchtigt.

Dies kann Metall, Kunststoff oder organisches Material sein. Das ausgetriebene Plasma könnte eine Funktionserweiterung bei der Endoskopie darstellen, da therapeutische, zumindest aber dekontaminierende Anwendungen wie beispielsweise die antimikrobielle Behandlung von Wunden denkbar sind. [44] Der Nachweis, dass das Plasma im Lumen sowie das ausgetriebene Plasma eine antimikrobielle Wirkung hat, ist in Kapitel 3.6.8 beschrieben.

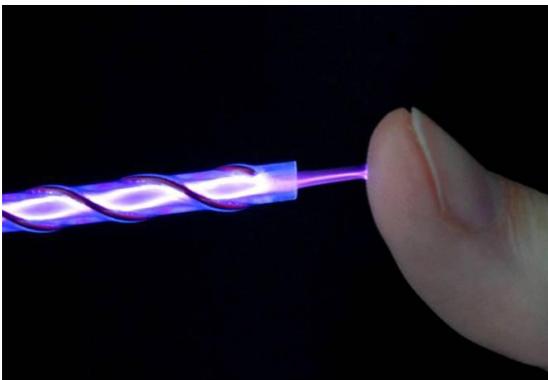


Abb. 3.8: Foto eines ausgetriebenen Plasmas mit virtueller Masse

3.1.2.2 Diagnostik

Zur Bestimmung der Plasmatemperatur im Schlauchinneren wurden Messungen, OES und FTIR Spektroskopie durchgeführt. Der hierfür genutzte PTFE-Schlauch hatte runde Drahtelektroden in bifilarer Helixanordnung und eine Länge von 10 cm. Der Leistungsverlust wurde über den Spannungsabfall mit einem 9 nF Kondensator durch Oszillographie (Lissajous-Figur) bestimmt. Das gemittelte Signal der zeitabhängigen Ladung und der Versorgungsspannung wurde mittels einem digitalen Phosphor-Oszilloskops (TDS 5104, Tektronix) gemessen. Anschließend wurde die Fläche der Lissajous-Figur numerisch bestimmt und mit dem Signal der Frequenz der Versorgungsspannung multipliziert. Um statistische Fehler zu vermeiden, wurde die Leistungsmessung 5-fach durchgeführt. Zur Messung der Temperatur des Plasmas im Schlauchinneren wurde ein fiberoptischer Sensor (Optocon GmbH, Fotemp1) mit einem Durchmesser von 0,55 mm und einer Genauigkeit von 1 K genutzt. Der Sensor wurde zentriert im Schlauch mit einem 1 cm Abstand vom Schlauchende ohne Berührung der Schlauchwand lokalisiert. Die Temperatur wurde bei vier verschiedenen Flussraten (0.5 slm, 1.0 slm, 1.5 slm, 2.0 slm) von reinem Argon bei Raumtemperatur (23,8 °C) gemessen. Zur Analyse der emittierten Strahlung durch das Plasma wurde die Optische Emmisionsspektroskopie (OES) im Spektralbereich von 115-220 nm (VUV) und 240-400 nm (UV) eingesetzt. Hierfür wurde eine VUV Apparatur, die im Detail bei Lange et al (2009) beschrieben ist, und ein Model 1263 0,5 Meter Spektrograph (EG&G Princeton Applied Research, Gitter: 1200 g/mm geblazt bei 250 nm) in Czerny-Turner Konfiguration genutzt. Das Emissionsspektrum der Entladung im Schlauchinneren wurde generell endständig gemessen. Darüber hinaus wurde der Abgasstrom mittels

FTIR GASMET CR-2000i (Ansyco) Spektrometer mit einem Diagnostikbereich von 800 – 4200 cm^{-1} und einer Auflösung von 8 cm^{-1} untersucht. Damit wurden die Konzentrationen von NO_2 , N_2O , N_2O_5 , O_3 , CO und COF_2 bestimmt, wobei unterschiedliche Zusätze von Sauer- und Stickstoff mit berücksichtigt wurden. Die Versorgungsspannung wurde konstant bei $21 \pm 0.5 \text{ kV}_{\text{pp}}$ belassen.

3. 1.2.2.1 Temperatur

Zur Implementierung des PTFE-Schlauches mit bifilarer Helixanordnung in ein reales Endoskop, muss gewährleistet sein, dass die Innentemperatur niedrig genug ist, um Schäden an den Hitze sensitiven Materialien zu vermeiden. In Abbildung 3.9 ist die Temperatur des Plasmas im Schlauchinneren für verschiedene Leistungen und vier Flussraten von reinem Argon im Bereich von 0,5 slm bis 2 slm dargestellt. Zusammengefasst ist zu sehen, dass die Temperatur mit zunehmender Leistung und abnehmendem Gasfluss ansteigt. Dabei ist der Kurvenanstieg der Temperatur für geringe Flussraten am höchsten und für hohe Flussraten am niedrigsten. Betrachtet man einen Gasfluss von 0,5 slm und eine Leistung von 0,9 W, wird eine Temperatur von fast 60 °C erreicht. Ein signifikanter Temperaturabfall von mehr als 10 K wird unter gleichen Leistungsbedingungen durch eine Verdopplung der Flussrate auf 1 slm Argon erreicht. Die gemessene Temperatur für den höchsten untersuchten Gasfluss von 2 slm lag unter 35 °C.

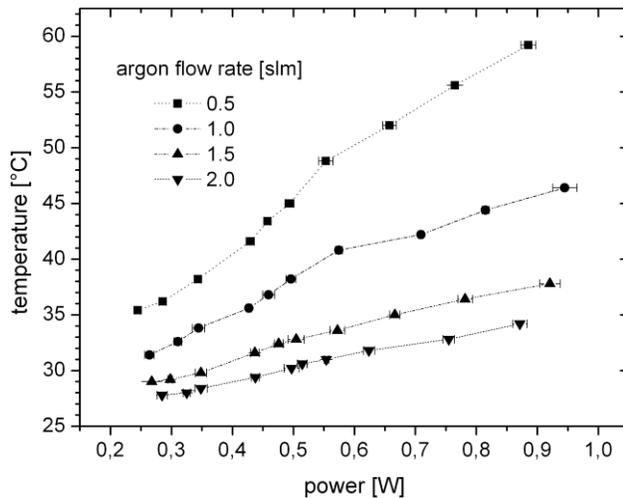


Abb. 3.9: Temperatur des Plasmas im Schlauchinneren in Abhängigkeit von der Leistung für vier verschiedene Gasflüsse von reinem Argon. Der Innendurchmesser des Schlauches beträgt 2 mm, die Länge 10 cm und das Entladungsvolumen $31,4 \text{ cm}^3$

3.1.2.2.2 Optische Emissionsspektroskopie (OES)

Die OES ist ein sehr nützliches diagnostisches Mittel, welches genutzt werden kann, um Änderungen in der Plasmazusammensetzung zu erfassen. Ebenso kann sie zur Identifikation von mikrobiziden Agenzien dienen. Im Folgenden werden die Ergebnisse der spektrometrischen Messungen im VUV- und UV-Bereich diskutiert.

VUV Emission (115 - 220 nm)

Typische VUV-Emissionsspektren des Plasmas im Schlauchinneren für verschiedene Gaszusammensetzungen sind in Abbildung 3.10 gezeigt. In reinem Argon dominiert das 2. Kontinuum des Argon-Excimers Ar_2^* mit einem Intensitätsmaximum bei 126 nm das VUV-Spektrum. Diese Zustände werden durch einen 3-Körper-Stoß von Argon-Atomen

im Grundzustand (Ar) mit Atomen im angeregten Zustand (Ar^*) gebildet. [35] Unter Zugabe von geringen Mengen an molekularem Sauer- oder Stickstoff zum Argon wurde ein signifikanter Abfall des 2. Argon-Excimer Kontinuums beobachtet, welches für eine Reduktion der Ar_2^* -Bildung spricht. Da das Argon-Excimer mit Hilfe des angeregten Argon-Atoms gebildet wird, kann geschlossen werden, dass die Ar^* -Dichte durch die Zugabe der molekularen Gase abnimmt. Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt kann auf der einen Seite die abnehmende mittlere Elektronenenergie und auf der anderen Seite das Quenching der angeregten Argon-Atome durch Kollision mit Sauer- oder Stickstoffmolekülen sein. Die Abnahme der mittleren Elektronenenergie resultiert aus der höheren Anzahl von unelastischen Kollisionen von Elektronen mit den zugegebenen Molekülen.

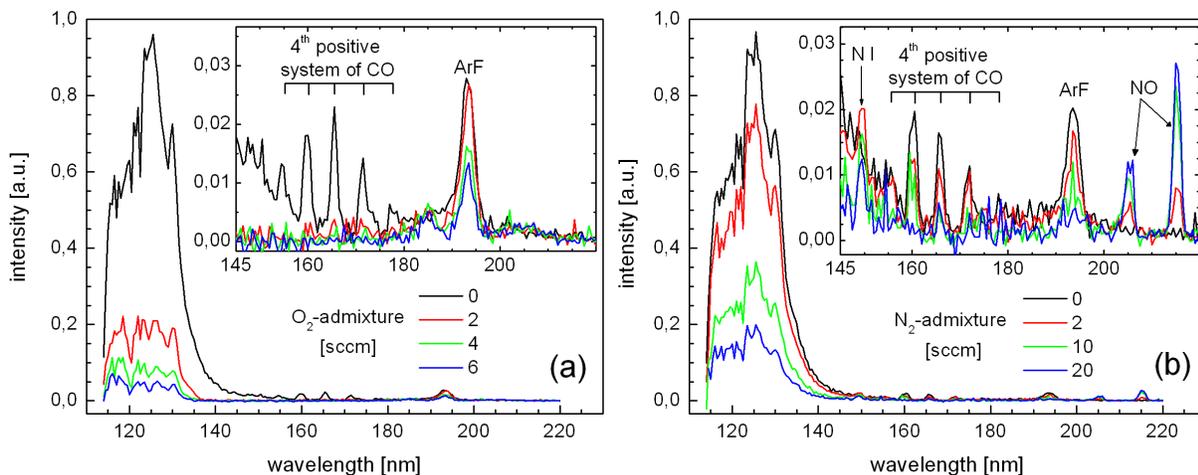


Abb. 3.10: VUV-Emissionsspektrum im Spektralbereich von 115 – 220 nm des Plasmas im Schlauchinneren für unterschiedliche Gaszusammensetzungen. a) Zugabe von Sauerstoff, b) Zugabe von Stickstoff zu 1,5 slm reinem Argon. Die Versorgungsspannung betrug 19 kV_{pp} entsprechend einer Verlustleistung von 0,7 W.

Neben dem 2. Argon-Excimer Kontinuum wurde ein System von molekularen Banden im Bereich zwischen 150 nm und 180 nm (Peaks bei 155, 160, 165,5, 172 und 177 nm)

gefunden, die bereits in der Literatur beschrieben sind. Kubodera *et al* brachte drei Peaks bei 160, 165 und 172 nm mit der Emission von Argon-Ionen (Ar II) in Verbindung. [36] Aber die oberen Energiestufen für die dort beschriebenen Übergänge sind sehr hoch (> 21.5 eV), daher werden die in den vorliegenden Messungen gefundenen Banden vermutlich nicht von ionisiertem Argon stammen. [37] Masoud *et al* beschrieb die beobachteten Emissionen im Bereich von 140 – 175 nm als N₂ Lyman-Birge-Hopfield (LBH) Banden entsprechend dem Übergang $a^1\Pi_g \rightarrow X^1\Sigma_g^+$. [38] In unseren Messungen lagen die höchsten Intensitäten für die Banden zwischen 150 und 180 nm immer dann vor, wenn in reinem Argon ohne Stickstoffzugabe gemessen. Außerdem nahm die Intensität der betreffenden Banden im Falle einer Stickstoffzugabe kontinuierlich ab. Beide Beobachtungen führen dazu, dass der N₂-Übergang nicht geeignet ist, um die beobachteten Banden zu erklären. Merbahi *et al* führte solche Banden auf das 4. positive System des CO entsprechend dem Übergang $CO[A^1\Pi] \rightarrow CO[X^1\Sigma^+]$ zurück. [39] Dies ist durch Erosion der Schlauchwand möglich, hierbei werden Kohlenstoff- und Fluor-Atome in die Gasphase freigesetzt. Zusammen mit Sauerstoff aus einer dünnen Wasserschicht auf der Schlauchwand kann sich dann CO bilden. Diese Hypothese wird durch die Messungen von CO, CO₂ und COF₂ Molekülen im FTIR gestützt. Zudem kann die Bande bei 193 nm Argonfluorid (ArF) zugeordnet werden. [40]

Bei Zugabe von Stickstoff NO(γ) wurden Banden bei 204,7 nm und 214,86 nm und eine atomare Linie von Stickstoff (N I) bei 149,5 nm detektiert. [41] Mit Erhöhung der Stickstoffzugabe steigt auch die Intensität der NO Bande an. Die integrierte VUV-Intensität (Integrationsbereich von 110 – 220 nm) in Abhängigkeit von der Sauer- und Stickstoffzugabe ist in Abbildung 3.11 gezeigt. Deutlich ist hier zu erkennen, dass die

VUV-Intensität sehr stark durch die Sauerstoffzugabe beeinflusst wird. Bei einer Zugabe von 6 sccm O_2 nimmt die integrierte Intensität um 5 % ab. Dies wird für Stickstoff erst bei Zugaben größer 50 sccm erreicht.

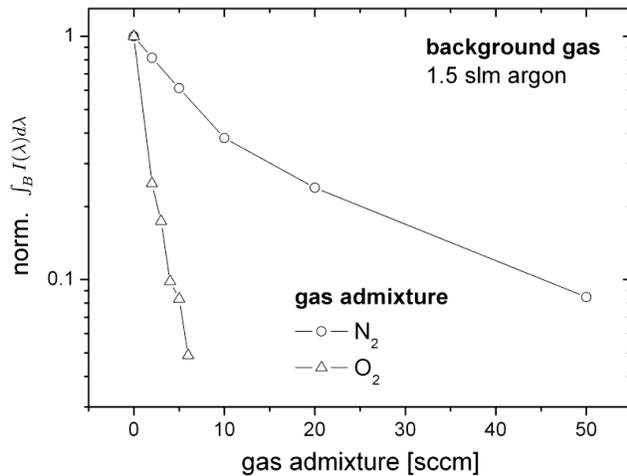


Abb. 3.11: Integrierte VUV-Intensität in Abhängigkeit einer Sauer- und Stickstoffzugabe

UV Emission (220 - 400 nm)

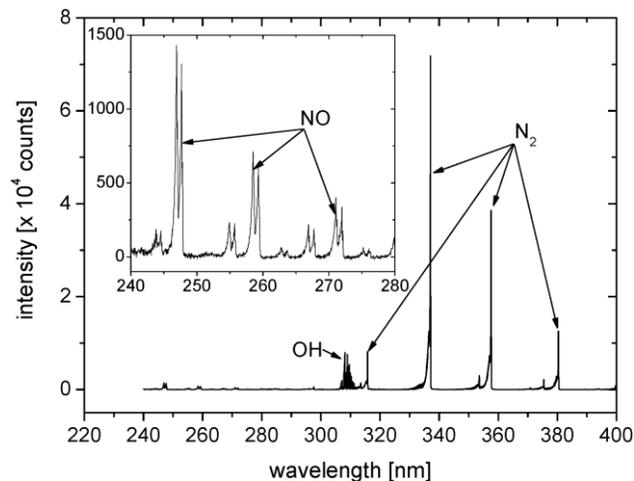


Abb. 3.12: UV Spektrum endständig am Schlauch für eine Gaszusammensetzung von 1,5 slm Ar und 20 sccm Stickstoff bei einer Spannungsversorgung von 17,3 kV gemessen.

Das Ergebnis der UV Messungen für eine Gaszusammensetzung von 1,5 slm Ar und 20 sccm N_2 ist in Abbildung 3.12 dargestellt. Das 2. positive System von molekularem

Stickstoff $N_2(C^3\Pi_u - B^3\Pi_g)$ ist die größte Komponente im Spektrum. Darüber hinaus sind OH Banden bei 308 nm und Banden von NO(γ) bei 247,1 nm, 258,7 nm und 271,3 nm zu finden. [41] Die NO Banden zeigen eine vergleichsweise niedrige Intensität (weniger als 1 % der N_2 Banden), daher beschränken sich die weiteren Untersuchungen auf das 2. positive System des Stickstoffs und die OH Banden. Zum Vergleich der Banden-Intensitäten bei verschiedenen Stickstoffzugaben wurde die Strahlung über die relevanten Wellenlängen integriert. Die dazugehörigen Beschränkungen sind in Tabelle 3.1 gezeigt. Die integrierten Intensitäten der dominierenden UV Banden für verschiedene Stickstoffzugaben sind in Abbildung 3.13a zu sehen. Die Stickstoffbanden sind dominierend und es sind zwei Verläufe unterscheidbar. Während die Intensität der OH Banden exponentiell mit zunehmender Stickstoffzugabe abnimmt, zeigt das 2. positive System von Stickstoff ein Maximum bei der Zugabe von 20 sccm (entspricht einer Konzentration von 1,3 %). Bei höheren Stickstoffgasflüssen nimmt die Intensität langsam wieder ab.

Tabelle 3.1: Beobachtete molekulare Übergänge im UV-Bereich und ihre Integrationsgrenzen für die Quantifikation der Intensität.

Angeregte Spezies	Integrationsgrenze B [nm]	Übergang	Schwingungsstufen
OH	306 - 312	OH($A^2\Sigma^+ - X^2\Pi$)	0 - 0
N_2	328 - 339	$N_2(C^3\Pi_u - B^3\Pi_g)$	0 - 0

Die Stickstoffzugabe betrachtend, zeigen alle Linien des 2. positiven Stickstoffsystems die gleiche Abhängigkeit. Dies kann durch zwei konkurrierende Prozesse erklärt werden. Einerseits gibt es einen Energietransfer vom metastabilen Argon zum 2. positiven molekularen Stickstoff ($C^3\Pi_u$). Dementsprechend führt die höhere Stickstoff-

konzentration in der Entladung zu einer höheren Strahlung des molekularen Stickstoffs. Andererseits reduzieren die Stickstoffmoleküle die Elektronenenergie, welches direkt die Produktion des metastabilen Argons beeinflusst. Je weniger metastabiler Argon desto weniger angeregter Stickstoff. Für kleinere Zusätze dominiert der zuerst beschriebene Prozess und für Zusätze von 20 sccm und mehr der zweite Prozess. Die gesamte relative UV Intensität kann durch Integration über das Gesamt-UV-Spektrum bestimmt werden. Bedingt durch die niedrige spektrale Intensität der Hydroxyl-Banden, nimmt die maximale UV-Strahlung bei einer Stickstoffzugabe bis zu 17 sccm (1,1 %) nur leicht zu. Im Weiteren wurde die integrierte UV Intensität auch bei variierenden Sauerstoffzusätzen betrachtet. Die Ergebnisse hierfür sind in Abbildung 7b dargestellt. Auch hier war das Trägergas Argon mit einem Fluss von 1,5 slm. Um eine maximale UV Intensität zu garantieren, wurde der Stickstoffgasfluss konstant bei 17 sccm gehalten. Es wird offensichtlich, dass der Einfluss von Sauerstoff wesentlich höher als der von Stickstoff ist. Die integrierten Intensitäten der N_2 und OH Banden sind um fast 2 Dekaden bei einem Sauerstoffzusatz von 50 sccm reduziert. Hauptgrund für diese Entwicklung ist der Verlust der Elektronendichte durch die hohe Elektronegativität des Sauerstoffs. Dies korreliert direkt mit der Dichte des metastabilen Argons, welcher hauptsächlich angeregten Stickstoff produziert. Alles in allem kommt es zu einer Reduktion der UV Intensität durch Zugabe kleiner Gasmengen Sauerstoffs. Im Gegensatz dazu führt die Zugabe von 17 sccm Stickstoff zu einem Maximum der UV Intensität.

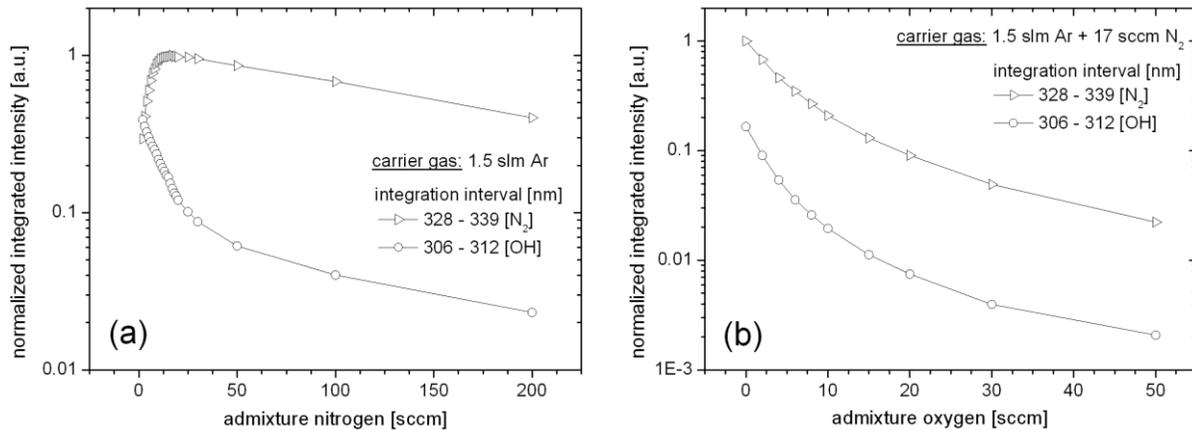


Abb. 3.13: (a) Integrierte Intensität für N_2 (328 - 339 nm) und OH (306 - 312 nm) für 1,5 slm Argon und verschiedene Zumischungen von Stickstoff. (b) Integrierte Intensität von N_2 und OH für 1.5 slm Argon und 17 sccm Stickstoff mit variierenden Sauerstoffzugaben.

Fasst man die Ergebnisse der spektroskopischen Untersuchungen sowohl im VUV- als auch im UV-Bereich zusammen, so lässt sich feststellen, dass die spektrale Zusammensetzung des Plasmas in großem Maße von der Gaszusammensetzung abhängt. Durch geeignete Wahl der Zumischung lässt sich der Anteil der VUV-Strahlung aber auch der der UV-Strahlung gezielt maximieren. So besteht grundsätzlich die Möglichkeit, das mittels bifilarer Helixanordnung erzeugte Plasma hinsichtlich einer antimikrobiellen Wirksamkeit hin zu optimieren.

3. 1.2.2.3 Fourier-Transformed-Infrared Spektroskopie (FTIR)

Neben den OES Messungen wurde auch die FTIR Spektroskopie zur Bestimmung der Agenzien verwendet, die durch das Plasma in Abhängigkeit der Gaszusammensetzung generiert werden können. In Abbildung 3.14 ist ein typisches Infrarot-Spektrum des Abgases einer Gaszusammensetzung von 1,5 slm Argon, 10 sccm Sauerstoff und 10 sccm Stickstoff gezeigt. Die Zündung eines Plasmas in dieser Gaszusammensetzung

führt zur Bildung von Ozon (O_3), Stickstoffdioxid (NO_2), Kohlenstoffmonoxid (CO), Kohlenstoffdioxid (CO_2) und Carbonylfluorid (COF_2). Darüber hinaus wurde eine Bande bei 1720 cm^{-1} detektiert und als Distickstoffpentoxid (N_2O_5) identifiziert. [41]

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Parameter-Studie beschrieben (Abbildung 9). Dafür wurden die Zusätze von Sauer- und Stickstoff auf feste Werte beschränkt (O_2 : 0, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 35, 50 sccm; N_2 : 0, 10, 20, 50, 100, 150 sccm), Die dazwischen liegenden Werte wurden linear interpoliert.

Die Konturdiagramme zeigen die Konzentration der jeweiligen Spezies in ppm geteilt durch den maximalen Wert der verschiedenen Gaszusätze in der Entladung. Für reines Argon konnten nur CO und kleine Mengen von COF_2 detektiert werden. Der Kohlenstoff und das Fluorion gelangen durch Erosion des verwendeten PTFE-Schlauches in die Entladung. Der Sauerstoff stammt vermutlich von einer dünnen Wasserschicht auf der Schlauchwand. Durch Zugabe von Sauerstoff zur Entladung erfolgt eine zunehmende Entstehung von CO und COF_2 .

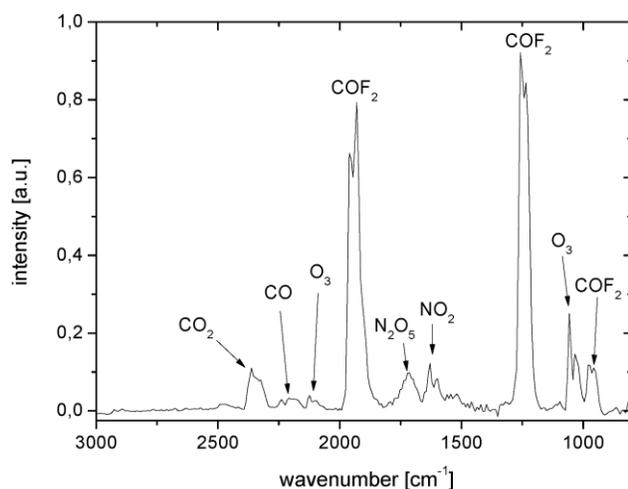


Abb. 3.14: Infrarot-Spektrum des Abgases einer Gasmischung von 1,5 slm Argon und 10 sccm Sauer- bzw. Stickstoff.

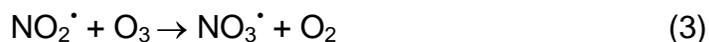
COF₂ zeigt dabei eine konstante Zunahme, wo hingegen CO bei einem Maximum von 0,75 sccm Sauerstoff (≈ 0.5 % Zugabe) dominiert. Für höhere Sauerstoffzusätze von 10 sccm kommt es auch zu einer Ozon-Produktion bis zu Konzentrationen von 470 ppm. Auf Grund der Abwesenheit von Stickstoff wurde kein NO₂, N₂O oder N₂O₅ gefunden. Durch die Zugabe von Stickstoff ohne Sauerstoff entstanden kleine Mengen an NO₂, N₂O und N₂O₅, auch hier stammt der benötigte Sauerstoff vermutlich von einer Wasserschicht auf der Schlauchwand. Die Entstehung von N₂O und N₂O₅ scheint diejenige von CO zu verhindern, da bei genannten Stickstoffzugaben gleichzeitig die CO Konzentration abnimmt. Die Bildung von COF₂ bleibt fast unverändert und Ozon wurde nicht detektiert. Bei Zugabe beider Gase zur Entladung zeigen die Konzentrationen der verschiedenen Spezies ein uneinheitliches Verhalten. COF₂ wird kaum durch eine Stickstoffzugabe beeinflusst, die höchste Konzentration von 41 ppm wird wenig auf 32 ppm minimiert. Hingegen zeigt die CO Konzentration eine starke Abhängigkeit. Hohe Stickstoffzugaben resultieren in kleinen CO-Konzentrationen. Dies liegt wahrscheinlich an den konkurrierenden Reaktionen, welche zur Bildung von NO₂, N₂O, N₂O₅ und O₃ führen. Für hohe Stickstoff- und kleine Sauerstoffzugaben wurde fast kein CO gefunden. Zur Detektierung von Ozon war ein initialer Sauerstoffgasfluss von 10 sccm nötig. Höhere Sauerstoffmengen steigerten die Ozonbildung, wo hingegen ein höherer Stickstoffanteil die Ozonentstehung behinderte. Ein fast gleiches Verhalten wurde für N₂O gefunden. Hier führte in beiden Fällen eine Erhöhung der Gaszusätze zu einer zunehmenden Bildung von N₂O. Bei steigender Zugabe von Sauer- und Stickstoff stieg auch die Menge an N₂O₅.

Die Konzentrationsänderungen der chemischen Produkte kann durch chemische Reaktionen in der Entladung erklärt werden. Die notwendigen Komponenten hierfür sind

atomarer Sauer- und Stickstoff. Dabei werden durch direkten Elektroneneintrag metastabiler Argon oder UV-Strahlung gebildet und bilden ihrerseits NO. Gleichzeitig reagiert der atomare Sauerstoff mit molekularem zu Ozon. Daraus ergeben sich folgende chemische Reaktionsgleichungen:



Ein höherer Anteil an Sauer- und Stickstoff führt zu einer Erhöhung des NO₂-Anteils, wie auch in Abbildung 3.15 zu sehen. Der Abbau von NO₂ durch Reaktion mit Ozon führt zur Bildung von NO₃:



Das gebildete NO₃ reagiert wiederum mit NO₂ und bildet N₂O₅:



Zum Ablauf der Reaktionen (3) und (4) wird Ozon benötigt. Sobald die Entladung Ozon generiert wird NO₂ in N₂O₅ umgewandelt. Die Konzentrationen von NO₂ und O₃ sind entscheidend. Bei niedrigen Ozon- und hohen NO₂-Konzentrationen liegt fast das gesamte Ozon zersetzt vor und genauso ist es auch anders herum. Da bei kleineren Sauerstoffzusätzen N₂O₅ gemessen wurde, muss Ozon vorhanden sein. Daraus ergibt sich, dass bei Sauerstoffgasflüssen niedriger als 10 sccm die entstandene Menge an NO₂ größer als die Ozon-Konzentration ist. D.h. Ozon wurde komplett umgesetzt und nur noch NO₂ konnte detektiert werden. Für Gasflüsse über 10 sccm O₂ ist die Ozon-Konzentration wiederum höher und NO₂ komplett umgesetzt.

Ein weiterer NO₂-Abbau ergibt sich aus der Bildung von N₂O:



Auf Grund dieser Reaktion führt ein höherer Gasfluss an molekularem Stickstoff zu höheren Konzentrationen an atomarem Stickstoff und damit auch zu höheren Konzentrationen von N_2O .

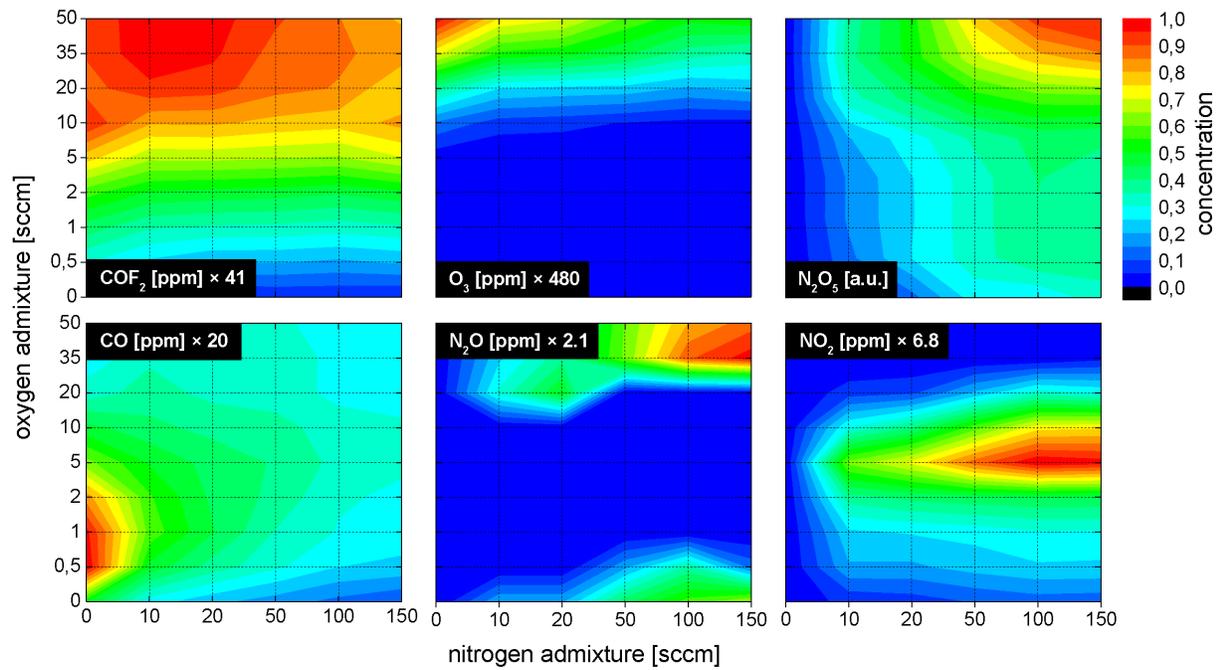


Abb. 3.15:Konzentration der gemessenen Spezies für 1,5 slm Argon als Trägergas mit variierenden Sauer- und Stickstoffzusätzen bei einer Versorgungsspannung von.21 kV.

3.1.3 Mikrowellenplasma PLexc

Als weitere Atmosphärendruck-Plasmaquelle wurde die Mikrowellenplasmaquelle PLexc verwendet. Bei dieser Quelle handelt es sich um eine mikrowellenangeregte Plasmaquelle, die aber im Gegensatz zu konventionellen Plasmatorches über eine auch bei Atmosphärendruck selbstzündende Bauweise verfügt. Daraus resultiert sowohl eine hervorragende Pulsbarkeit der Plasmaquelle, als auch eine hohe Prozesssicherheit bedingt durch das automatische Wiederezünden des Plasmas nach Prozessstörungen. Der Plasmakopf als auch das Schaltnetzteil zum Betrieb der Quelle sind in Abbildung 3.16 dargestellt.



Abb. 3.16: PLexc-Plasmakopf mit Netzteil.

Im Vergleich zu DBEs können mikrowellenangeregte Plasmen ohne Elektroden erzeugt werden. Dazu wird mittels eines Magnetrons Mikrowellenstrahlung mit typischerweise 2.45 GHz erzeugt. Die Mikrowellen können über spezielle Hohlleiter oder Koaxialkabel transportiert werden. Zur Zündung des Plasmas muß eine lokale Feldstärkeüberhöhung derart erzeugt werden, dass die jeweilige Zündbedingung erfüllt wird. In Abbildung 3.17 sind einige der am INP verwendeten Anordnungen zur Erzeugung eines

Mikrowellenplasmas dargestellt. Mikrowellenplasmen können mit praktisch allen gängigen Prozessgasen bei typischen Flussraten im slm-Bereich betrieben werden. Die benötigte elektrische Leistung hängt stark von der Geometrie ab und liegt im Bereich von 80 W bis hin zu 1 kW und darüber hinaus. Daraus resultieren Gastemperaturen von nahezu Raumtemperatur bis 10000 °C. Entsprechend werden mikrowellenangeregte Plasmen vorrangig im Remote-Mode für die Dekontamination von thermolabilen Medizinprodukten verwendet. In diesem speziellen Fall ist das Plasma-erzeugte Prozessgas die wirkende Komponente.

Der Vorteil von mikrowellenangeregten Plasmen im Remote-Mode liegt im universellen Einsatz und im entsprechend großen Anwendungsfeld. Durch die Verwendung des Plasma-erzeugten Prozessgases kann jede beliebige Geometrie behandelt werden. Das Gas wird dazu in eine Prozesskammer, in der sich das zu sterilisierende Gut befindet, geleitet und kann dort seine Wirkung entfalten. Durch spezielle Techniken (z. B. Druckzyklen) wird das Prozessgas in nahezu jede Kavität und in jedes Lumen gebracht.

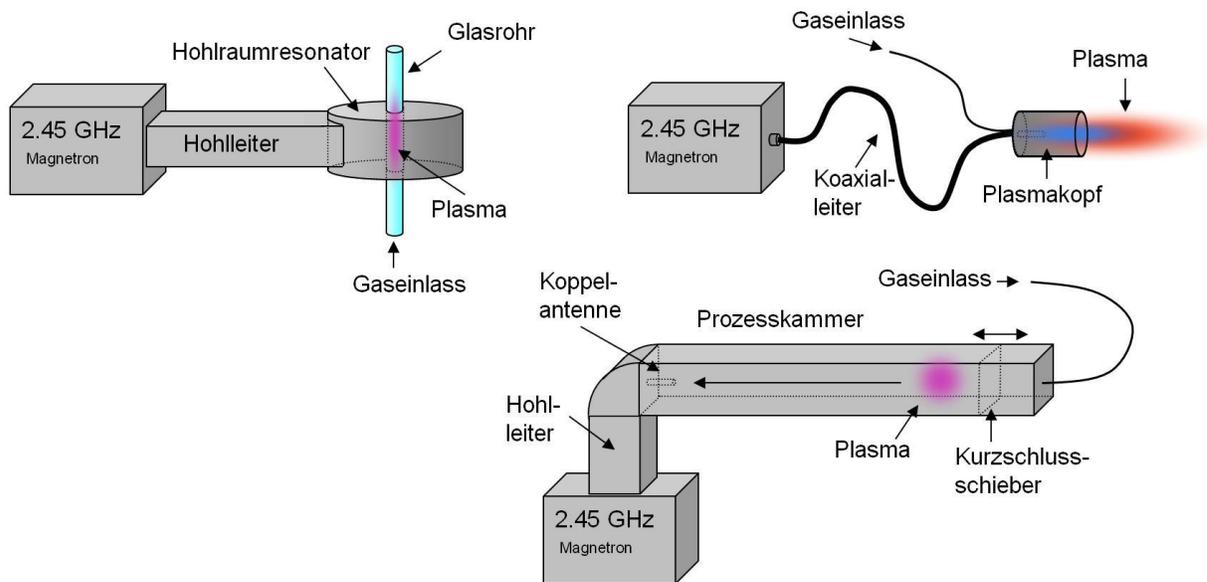


Abb. 3.17: Verschiedene mögliche Anordnungen zur Erzeugung eines Mikrowellenangeregten Plasmas.

Dies ist besonders bei der Dekontamination von Endoskopen von Vorteil, da so die Außen- und Innendekontamination in einem Prozessschritt vorgenommen werden kann.

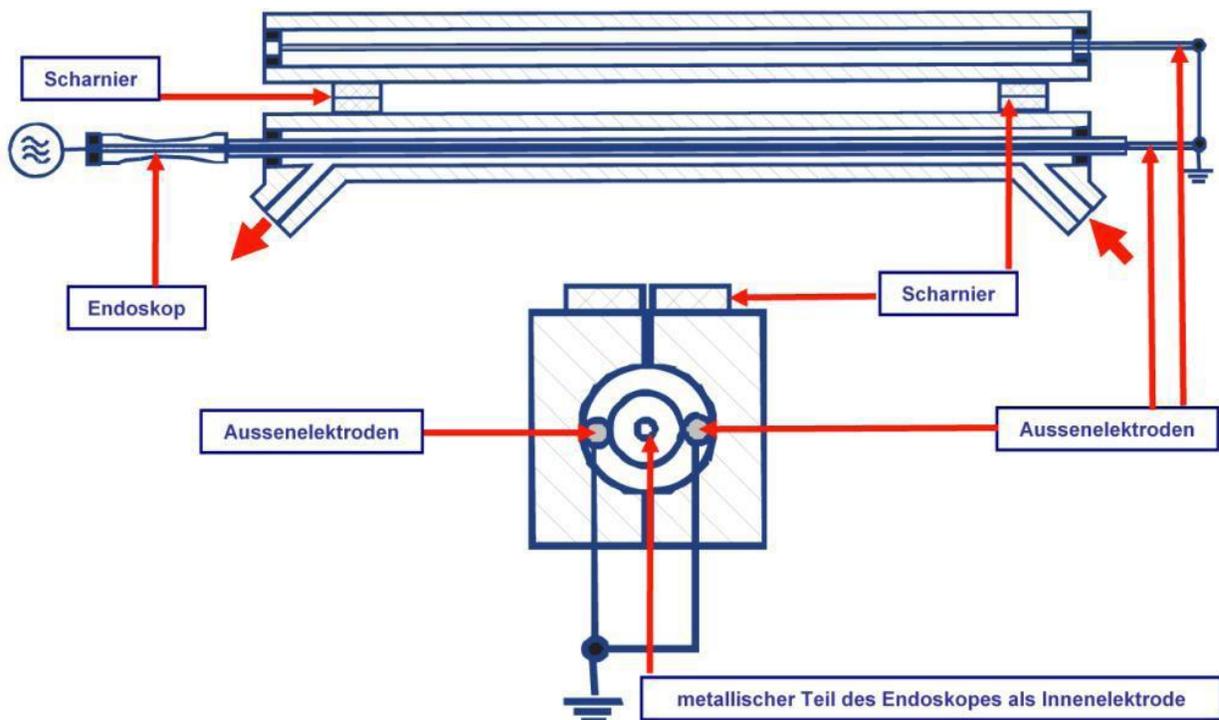
3.2 verwendete Plasmaquellen für die Außendekontamination

Für die Außenbehandlung eines komplexen dreidimensionalen Medizinproduktes ist eine Grundvoraussetzung, dass die wirkenden Agenzien aus dem Plasma jede Stelle des Medizinproduktes erreichen. Mit gerichteten Quellen wie z.B. dem Plasmajet ist daher eine besondere Prozessführung notwendig. Bei Kathetern zum Beispiel lässt sich eine solche noch relativ einfach umsetzen, jedoch bei komplizierten Endoskopen stößt man recht schnell an die Grenze des Möglichen. Um diesem Problem entgegen zu wirken, wurden die schon in den Kapiteln 3.1.1 und 3.1.3 beschriebenen Plasmaquellen getestet.

3.2.1 koaxiale Entladung

Wie bereits im Zwischenbericht 2009 dargestellt, können Plasmajet-Anordnungen für die Außenbehandlung flexibler Endoskope genutzt werden, wobei insbesondere wegen der guten Spaltgängigkeit Vorteile bei der Behandlung kritischer Zonen (wie z.B. Spalten, Materialübergänge, Ritzen etc.) zu erwarten sind. Ein großer Nachteil ist allerdings die durch den langen Verfahrensweg bedingte lange Behandlungszeit sowie der dadurch bedingte hohe Gasverbrauch. Alternativ dazu wurde daher versucht, eine, bereits früher in einem eigenen Patent dargestellte Anordnung (Abbildung 3.18) zu realisieren. Zu diesem Zweck wurde in einem Gehäuse eines horizontalen Schlauch-Treaters ein

Demonstrator (Abbildung 3.19) aufgebaut. Das Endoskop wurde dafür in einem, vom Arbeitsgas Argon durchströmten, Glasrohr montiert. Als geerdete Außenelektrode diente ein über das Endoskop gezogener, eng anliegender Metallgaze-Schlauch. Als Hochspannungselektrode wurden die, im Inneren des Endoskops angeordneten, metallischen Bowdenzüge genutzt. Mit der oben beschriebenen externen Spannungsversorgung konnte damit bei einer Frequenz von 1 kHz und einer Spannung von 5 kV ein relativ homogenes Oberflächen-DBE-Plasma erzeugt werden.



NEOPLAS-Patent WO2009019156, Priorität: 8. August 2007:
 „Verfahren und Vorrichtung zur plasmagestützten Oberflächenbehandlung“

Abb. 3.18: Schematische Darstellung einer Anordnung zur Endoskop-Außenbehandlung.



Abb. 3.19: Demonstrator zur Endoskop-Außenbehandlung

3.2.2 Mikrowellen-Entladung

Die im Kapitel 3.1.3 bereits beschriebene Plasmaquelle PLexc, die auf der Mikrowellen-Technik beruht, wurde auch für die Außenbehandlung und Dekontamination von langen, dünnen Schläuchen eingesetzt (Abbildung 3.20).

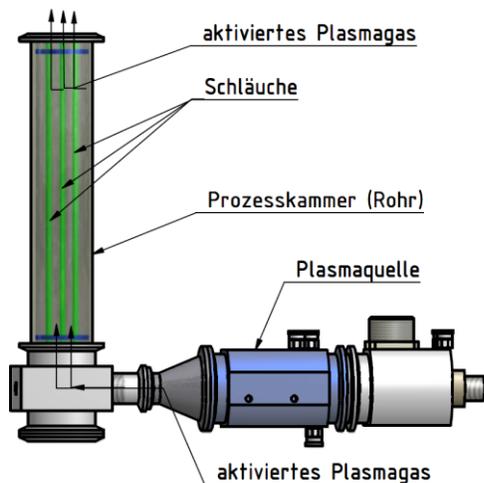


Abb. 3.20: Schematische Darstellung der Außenbehandlung von langen, engen Lumen mittels Mikrowellen-Entladung PLexc

Hieraus gibt sich ein großer Vorteil, da mit Hilfe des erzeugten Gases der PTFE-Schlauch gleichzeitig in einem Arbeitsschritt innen und außen dekontaminiert werden kann.

3.3 Plasmawirkung auf Oberflächen

Im Laufe des Verbundprojektes wurden mehrere Hinweise gefunden, dass Plasmen die Oberfläche von Kunststoffen, speziell von Teflon und auch PE, modifizieren. Der Teilchenbeschuss, die im Plasma erzeugten Radikale und die VUV/UV-Strahlung brechen dabei die langen CF_2 Ketten des Teflons auf und es entstehen CF und CF_3 Verbindungen. Durch Luftkontakt werden die verbleibenden ungesättigten Bindungen mit Sauerstoff, Stickstoff und Kohlenstoff besetzt, was zu verschiedensten Modifikationen führen kann. Weiterhin findet eine Abtragung bzw. Erosion der Teflonoberfläche statt. AFM-Aufnahmen nach 5 min Luftplasma haben gezeigt, dass sich tiefe Krater im Bereich von mehreren hundert nm ausbilden und dementsprechend auch die Rauigkeit der Oberfläche stark erhöht wird. Im Hinblick auf eine hohe Zyklenzahl bei der Aufbereitung sollte diese Modifikation/Erosion durch das Plasma möglichst gering gehalten werden, speziell die Erosion stellt dabei die größte Einschränkung für die Langlebigkeit der Endoskopkanäle dar. Als Ursache für die Erosion kommen vorrangig 2 Mechanismen in Frage:

1. Die verwendete Entladung im Normaldruckbereich bildet teilweise starke Filamente aus. Diese Filamente transportieren eine Vielzahl von Ladungsträgern und Radikalen, welche eine begründete Ursache für die Erosion darstellen.

2. Daraus folgend finden physikalische und chemische Sputterprozesse an der Oberfläche statt.

Aufgrund dieser Annahmen wurden 3 Lösungsmöglichkeiten erarbeitet:

1. Verringerung des mittleren Energieeintrags pro Periode durch einen so genannten "Burst-Modus".

2. Die Vermeidung von Filamenten.

- Durch die geschickte Wahl eines Arbeitsgases, welches einen diffusen Entladungsmodus ausbildet (Bspw. Helium)
- Durch eine geeignete elektrische Ansteuerung kann ebenfalls ein diffuser Modus erzeugt werden.

3. Die Vermeidung von Ätzprozessen durch eine Beschichtung des Teflons mit 'resistenten' Materialien.

Um definierte und reproduzierbare Bedingungen zu erhalten, wurde ein speziell für dieses Problem geeigneter Aufbau realisiert (siehe Abbildung 3.21). Es wurde dabei versucht, den so genannten "worst-case" zu simulieren. Das bedeutet man hat ein Filament, welche die ganze Zeit auf der gleichen Position steht und dementsprechend kontinuierlich an der gleichen Stelle die Oberfläche abträgt. Die gesamte Leistung geht

daher auch in dieses eine Filament. Dies entspricht zwar nicht den Bedingungen im Schlauch, aber die so gewonnen Ergebnisse können durchaus übertragen werden.

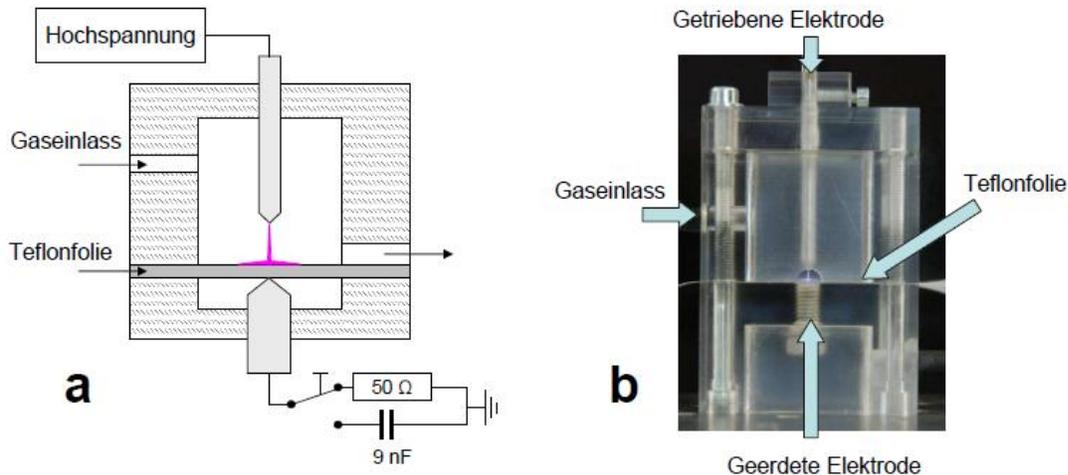


Abb. 3.21: Versuchsaufbau zur Bestimmung der Plasmawirkung auf Oberflächen. a) Schematische Darstellung der Versuchsanordnung. b) Foto des Aufbaus.

Im Folgenden wurde das Verhältnis von ON- zu OFF-Phase variiert und jeweils die Durchbrenndauer gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.22 dargestellt. Auf der Ordinate ist wieder die Durchbrenndauer dargestellt, auf der Abszisse die Verlängerung der Burst-Periodendauer durch die variable Länge der OFF-Phase. Wenn also die ON- und die OFF-Phase jeweils 1:1 der Periodendauer einnehmen, dann entspricht das einem Faktor von 2. Bei einem Verhältnis von 1:3 erhält man eine 4-fach längere Burst-Periodendauer etc. Die schwarze Gerade im Diagramm beschreibt den zu erwartenden Wert. Dabei wurde davon ausgegangen, dass die Durchbrenndauer allein von der gesamten Plasma ON-Phase abhängt. Also bei einem Verhältnis von 1:1 müsste demnach die Durchbrenndauer doppelt so lang sein, bei einem Verhältnis von 1:3 vier Mal so lang. Als Grundlage diente dabei der cw-Betrieb. Erstaunlicherweise wichen die Messwerte (rote Punkte) teilweise sehr stark von den zu erwartenden Werten ab. Bei langen OFF-Phasen konnte auf diese Weise in etwa ein Faktor 10 in der Durchbrenn-

dauer bei gleichem Leistungseintrag erreicht werden. Bei Werten oberhalb von 25 geht die Durchbrenndauer dann in Sättigung über. Genaue Ursachen für dieses Verhalten konnten bisher nicht gefunden werden. Vermutlich liegt der Abweichung ein Temperatureffekt zu Grunde.

Eine weitere Möglichkeit zur Reduktion der Erosion des Teflon liegt in der Vermeidung der Filamente durch ein spezielles Arbeitsgas. In diesem Fall wurden Versuche mit Helium durchgeführt, da Helium einen diffusen Plasma-Modus ausbildet. Dabei zeigte sich, dass durch die Einstellung eines diffusen Modus mit Helium als Arbeitsgas, in etwa ein Faktor 3 in der Lebensdauer bei etwa 3-fachem Leistungseintrag erreicht werden kann.

Weiterhin kann die elektrische Ansteuerung mit sehr steilen Flanken zur Vermeidung von Filamenten führen.

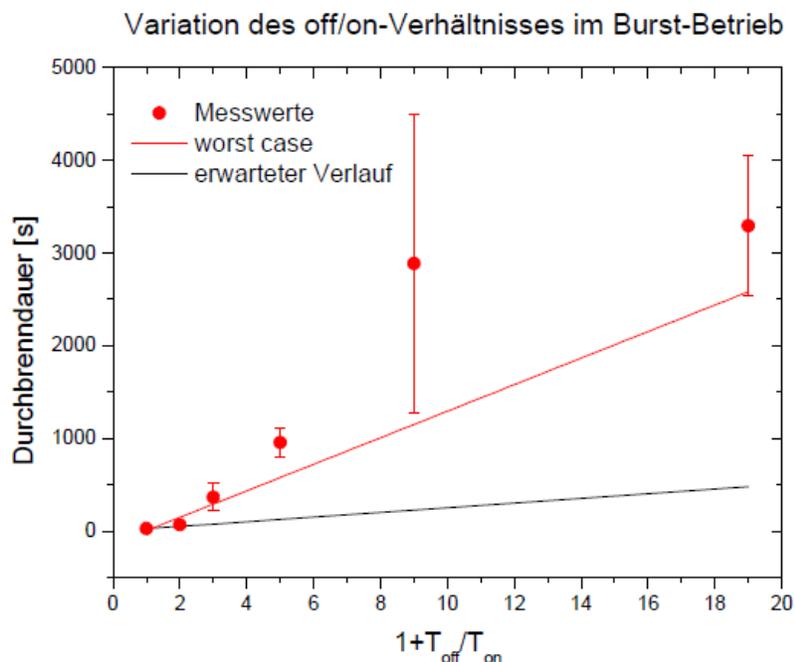


Abb. 3.22: Darstellung der Durchbrennzeit in Abhängigkeit vom Tastverhältnis im Burst-Modus. Die Einheit der Abszisse beschreibt die Verlängerung der Burst-Periodendauer durch die variable OFF-Phase.

Die letzte genannte Methode zur Verminderung der Erosion des Teflons liegt in der Beschichtung des Teflons mit plasmaresistenten Materialien. Die Erfahrung hat gezeigt, dass Glas und glasartige Schichten eine hohe Resistenz gegenüber Plasmaeinwirkungen besitzen. Es würde daher der Versuch gestartet, die 100 µm dicke Teflonfolie mit SiO_x zu beschichten. Die Beschichtung ist nahezu SiO₂, frei von Kohlenstoff (< 1%) und hat eine Dicke von ca. 100 nm. Erste Ergebnisse mit dieser Beschichtung zeigen einen Faktor 8 in der Durchbrenndauer bei vergleichbarem Leistungseintrag. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass der Betrieb im Burst-Modus etwa einen Faktor 10 in der Durchbrenndauer bringt, die Nutzung von Helium als Prozessgas ca. einen Faktor 25 und die Beschichtung mit SiO₂ ungefähr einen Faktor 8. Sollten sich die Effekte der einzelnen Maßnahmen ergänzen, dann wäre insgesamt, bei gleichem Leistungseintrag wie im cw-Betrieb mit Argon, mit einem Faktor 1000 in der Lebensdauer zu rechnen.

3.4 Vorbehandlung von PTFE mittels Plasma zur Lipid-Nanopartikel-Beschichtung

Die Untersuchungen der Materialien zeigten, dass eine Plasmavorbehandlung für eine bessere Verteilung der Partikel notwendig ist. Die Behandlung wurde vor allem mit einem DBE-Versuchsreaktor durchgeführt. Außerdem kamen noch ein Plasmajet mit Außenelektrode sowie ein Niederdruckreaktor zum Einsatz (siehe Abbildung 3.23 und 3.24). Die beiden Normaldruckplasmen wurden verwendet, da die Plasmabehandlung der inneren Lumina sowohl durch einen Plasmajet als auch durch eine DBE erfolgen kann und die Quelle für die Behandlung innerer Lumina noch an die realen Verhältnisse

eines Endoskops angepasst werden muss. Der Niederdruckreaktor wurde verwendet, um Materialtests an großvolumigen Objekten (z. B. Endoskopgehäuse) durchzuführen.

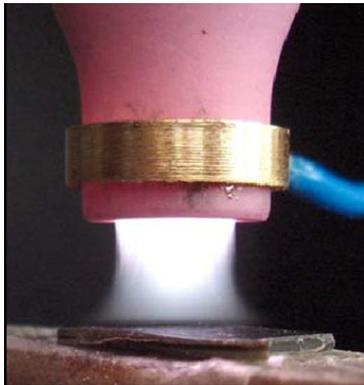


Abb. 3.23: Plasmajet mit Außenelektrode



Abb. 3.24: PlasmaFinish Niederdruckreaktor (Schwedt/ O.) im RF-Plasma

Während für den Plasmajet und die Niederdruckquelle schon Erfahrungen hinsichtlich einer Vorbehandlung vorhanden waren, musste für die DBE eine Optimierung erfolgen. Die Optimierung wurde mit Lipidnanopartikeln durchgeführt und die Erfahrungen aus den Experimenten auf die Sicastar-Nanopartikel der Firma Micromod angewendet. Zunächst wurden Kontaktwinkelmessungen nach Plasmabehandlung zur Verbesserung der Bindung und zur Optimierung der Eigenschaften durchgeführt. Es wurde der Abstand der Elektrode zur Probe variiert.

Außerdem wurde eine Variation der Behandlungszeit durchgeführt und anschließend die Kontaktwinkel bestimmt. Es zeigte sich, dass eine optimale Vorbehandlung bei einem Abstand von mindestens 3,2 mm und einer Zeit von 60 s erfolgte. Aufnahmen mit Hilfe der Elektronenmikroskopie belegten, dass mit ungünstiger Plasmavorbehandlung eine sehr ungleichmäßige Verteilung der Lipidnanopartikel auf der PE-Oberfläche vorhanden war. Dagegen gelangten mit Hilfe der Plasmavorbehandlung eine Hydrophilierung des

Kunststoffes und damit eine definierte Selbstanordnung der Nanopartikel (siehe Abbildung 3.25). Als Prozessgas wurde zunächst Argon verwendet.

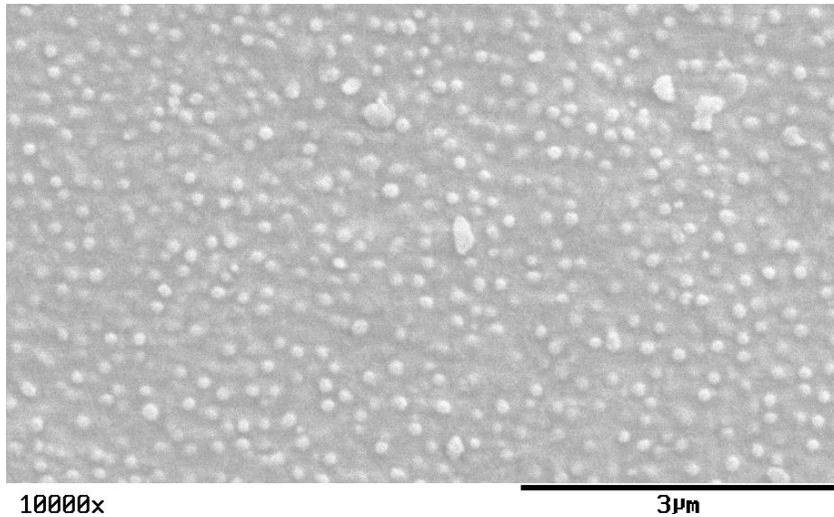


Abb. 3.25: REM-Aufnahme einer plasmabeschichteten PE-Oberfläche unter optimalen Plasma- und Stabilisierungsbedingungen.

Für weitere Details sei auf die Abschlussberichte der Projektpartner IMab und micromod verwiesen.

3.5 Demonstratoren

3.5.1 Schlauch-Treater (DBE)

Auf der Grundlage der beiden Anordnungen (Kapitel 3.1.1) wurde ein Schlauch-Treater (siehe Abbildung 3.26) aufgebaut, bei der eine der beiden Anordnungen (in Sandwich-Bauweise) optional, zusammen mit der Hochspannungsversorgung INP-NG (siehe Abbildung 3.26), in einem abgeschlossenen Gehäuse mit Gasanschluss und Gasabsaugung eingebaut werden kann. Mit dem Aufbau dieses einfachen Schlauch-Treaters sollte eine Referenzentladung geschaffen werden, die für Vergleichsuntersuchungen zwischen den Projektpartnern ausgetauscht werden kann.



Abb. 3.26: Schlauch-Treater mit DBE-Anordnung als Referenzentladung

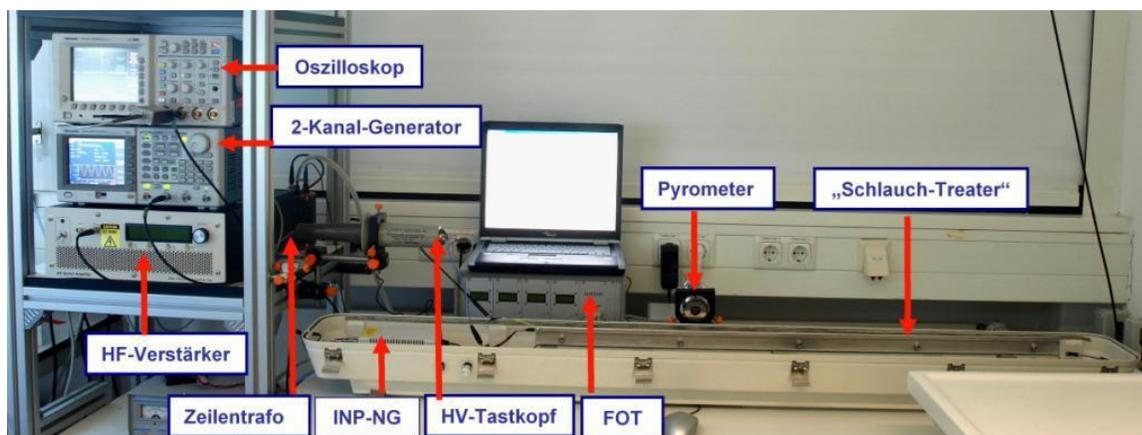


Abb. 3.27: Experimenteller Aufbau für Untersuchungen zum burst-mode.

Die für die Zündung der Referenzentladung genutzte Hochspannungsversorgung (INP-NG) ist allerdings nicht für einen Betrieb im burst-mode ausgelegt, der insbesondere für eine Reduzierung der Temperaturbelastung des Schlauchmaterials während der Behandlung bei gleicher Spannungsamplitude von Interesse ist. Für diese Betriebsart wurde der in Abbildung 3.27 dargestellte experimentelle Aufbau mit externer Spannungsversorgung genutzt.

Um die effektiven Zeiten der Plasmabehandlung im Rahmen längerer Versuchsreihen zu verkürzen, wurde in einem weiteren Schlauch-Treater-Modul in Sandwich-Bauweise eine koaxiale DBD-Anordnung mit der Möglichkeit einer gleichzeitigen Behandlung von 3 Schläuchen realisiert (siehe Abbildung 3.28). Hierbei wurden zusätzlich 2 Lagen einer feinmaschigen Metallgaze eingefügt, die einerseits die Fläche der Hochspannungselektrode vergrößern und andererseits weiterhin eine Beobachtung und Beurteilung der räumlichen Ausbildung des Plasmas durch Polycarbonat-Deckplatte und Metallgaze hindurch gestatten soll.

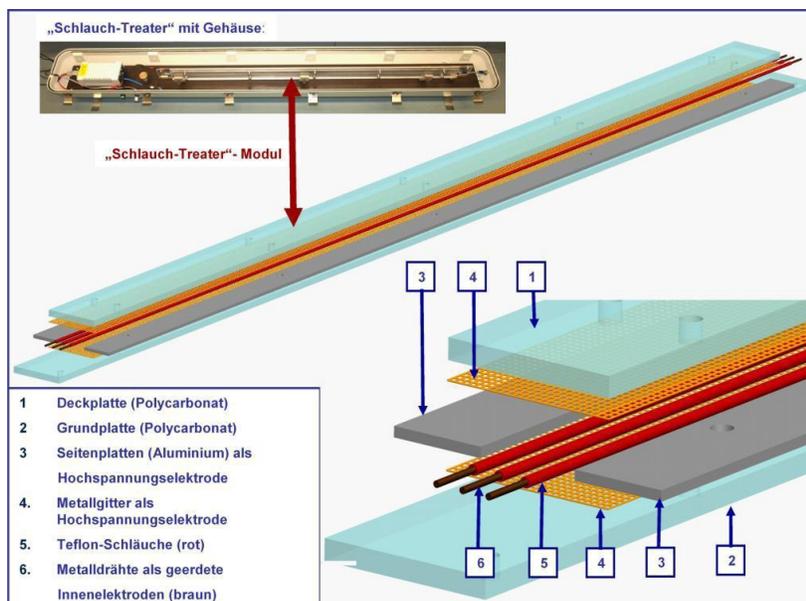


Abb. 3.28: DBE-Variante mit Innenelektroden zur parallelen Behandlung von 3 Schläuchen.

Auch in diesem Fall wurde eine externe Hochspannungsversorgung genutzt, da das im Schlauch-Treater eingebaute INP-NG für die resultierende erhöhte kapazitive Last nicht ausgelegt ist. Bewährt hat sich hierfür eine Hochspannungsversorgung, bei der das von einem Signalgenerator gelieferte und von einem leistungsstarken Audioverstärker verstärkte Signal einer geeigneten Zündspule zugeführt wird, die die erforderliche Hochspannung erzeugt. Im Interesse einer weiteren Rationalisierung, einer Verbesserung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, einer Gewährleistung der Arbeitssicherheit sowie einer anwendungsnahen Gestaltung der Plasmabehandlung wurde der, im Rahmen des BMBF-Projekts Plasmore entwickelte, vertikale Katheter-Treater zu einem vertikal angeordneten Schlauch-Treater zur parallelen Plasmabehandlung von bis zu 6 Teflon-Schläuchen umgebaut (siehe Abbildung 3.29).

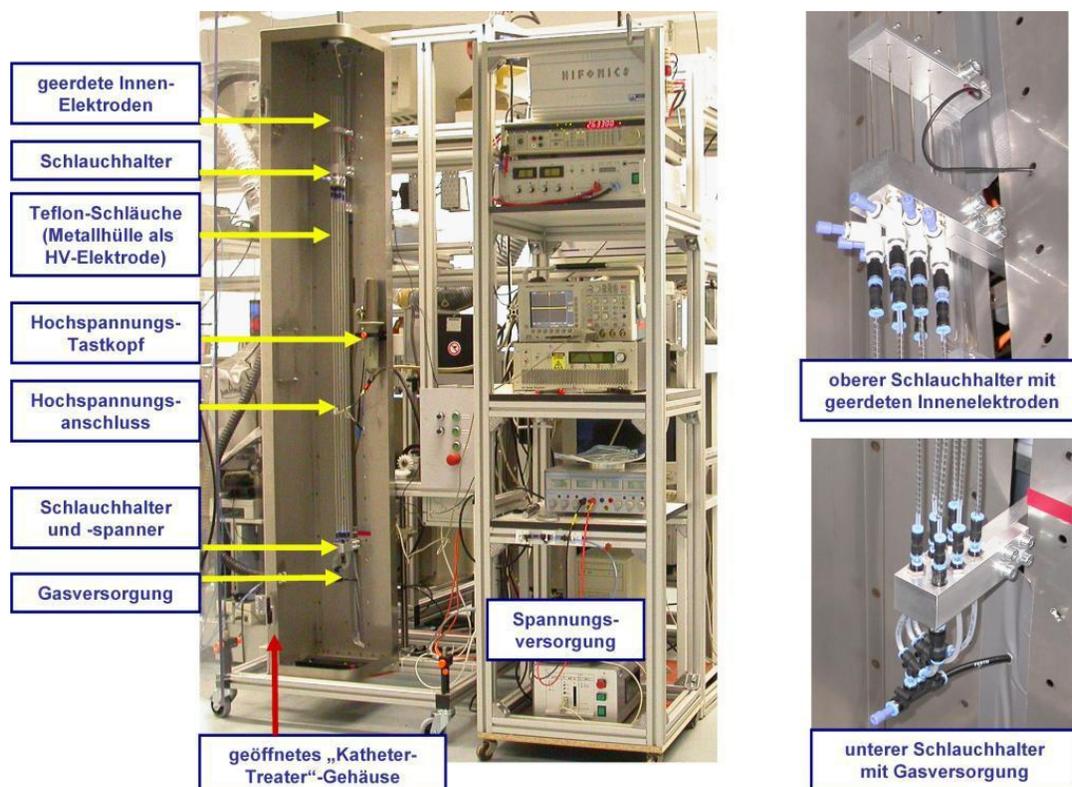


Abb. 3.29: Parallele Plasmabehandlung von 6 Teflon-Schläuchen in einem vertikal angeordneten Schlauch-Treater.

Dieser vertikale Schlauch-Treater konnte durch eine entsprechende Modifikation der Halterungen auch erfolgreich zur Plasmabehandlung der Arbeitskanäle von Original-Endoskopen eingesetzt werden (Abbildung 3.30). Die, auf der äußeren Schlauchoberfläche angeordnete, Metalldrahtwicklung, die der Stützung und Stabilisierung des Arbeitskanales dient, kann dabei als äußere Hochspannungselektrode genutzt werden.

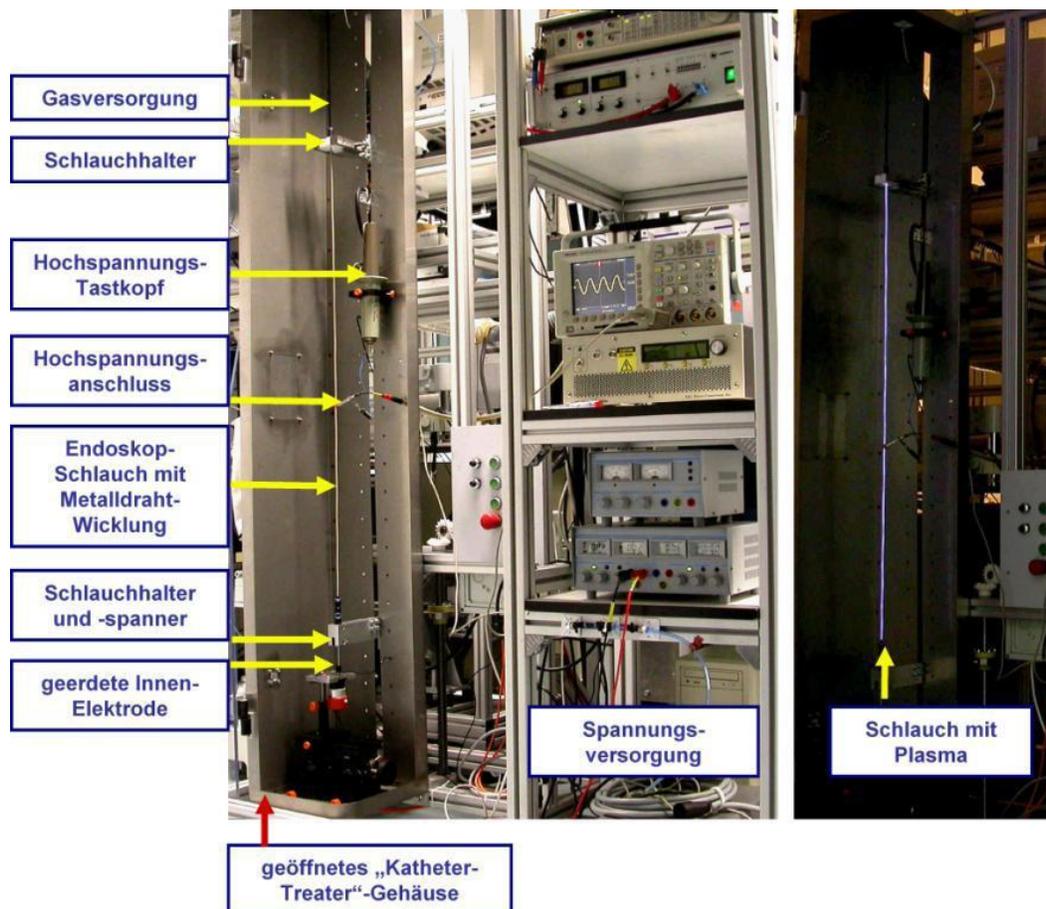


Abb. 3.30: Plasmabehandlung des Arbeitskanales eines Original-Endoskops in einem vertikalen Schlauch-Treater.

3.5.2 Demonstrator 1 (BiFix)

Es sollte ein Demonstrator entwickelt und hergestellt werden, der es ermöglichen sollte, die gefundenen Plasmawerkzeuge in eine Anlage zu überführen, Prüfkörper aufzunehmen und reale Einsatzbedingungen zu simulieren. Das Gerät sollte Versuche automatisieren helfen, manuelle Eingriffsmöglichkeiten bieten und automatisch Prozesse dokumentieren können. Zunächst sollte das Gerät einen Prüfkörper in Form eines Teflonschlauchs (AD 3 mm, ID 2 mm, Länge 1.5 m) aufnehmen, später aber auch ein Sterilbarrieresystem unterbringen können. Zur Erzeugung des Plasmas innerhalb des Prüfkörpers sollte ein Gemisch aus verschiedenen Gasen eingeleitet werden, das dann mit einer niederfrequenten Hochspannung

gezündet wird. Die Gase sollten in Menge, Temperatur und Anfeuchtung einstellbar sein. Zur Simulation realer Einsatzbedingungen sollte es möglich sein, eine Reinigung bzw. Desinfektion mit verschiedenen Flüssigkeiten durchzuführen. Die Flüssigkeiten sollten in Menge, Temperatur und Druckluftanteil einstellbar sein. Um für Reihenuntersuchungen konstante Einsatzbedingungen zu schaffen, sollten diverse Leitungssysteme mit Druckluft

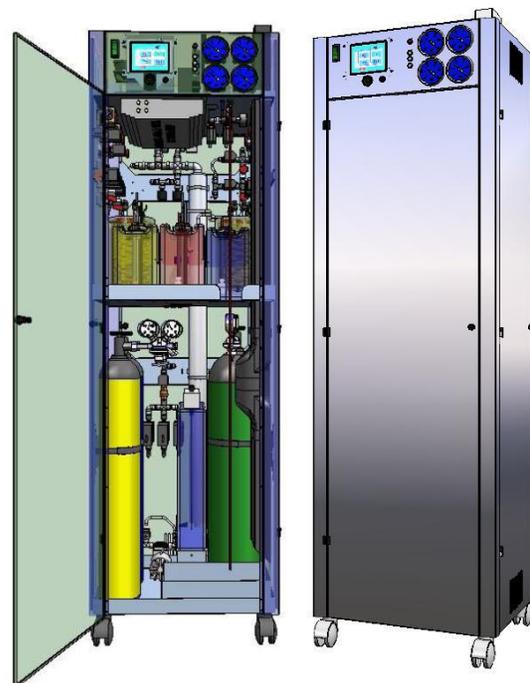


Abb. 3.31: CAD Zeichnung des Demonstrators

entleert und teilweise auch mit vollentsalztem Wasser gespült werden können. Das Gesamtgerät sollte kompakt aufgebaut sein und auch ohne eine externe Versorgung mit Medien (außer Spannungsversorgung) funktionstüchtig sein (siehe Abbildungen 3.31 und 3.32).

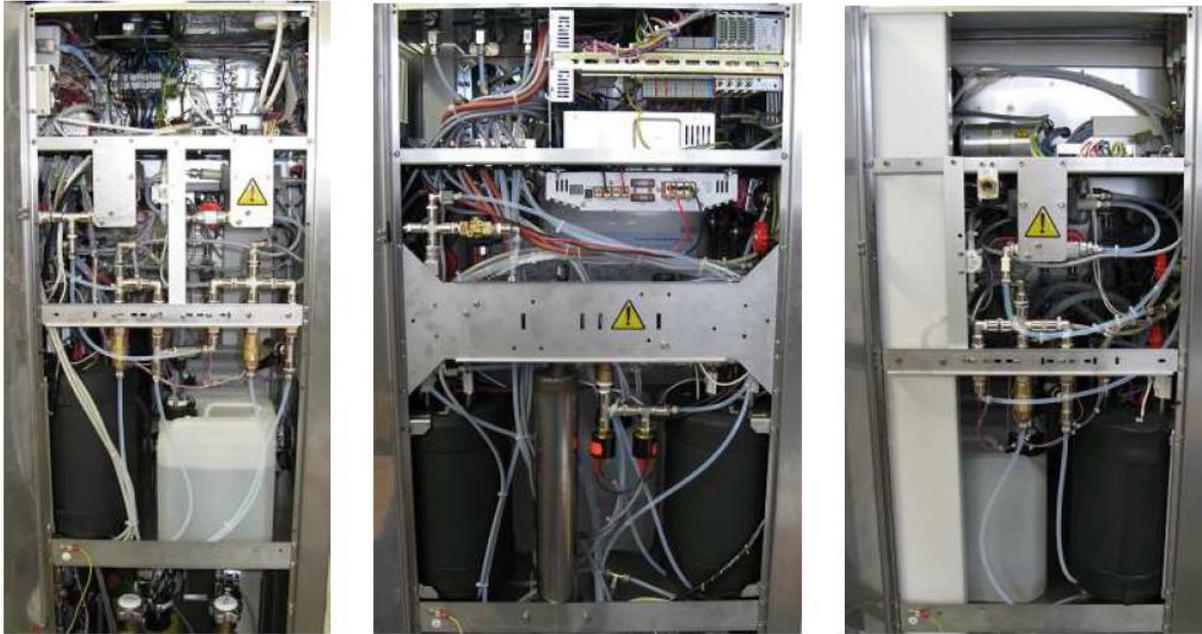


Abb. 3.32: Fotos von allen Seiten des offenen Demonstrators.

3.5.3 Plasmoskop (BiFix)

Die Funktionsweise der Plasma-Erzeugung in der bifilaren Anordnung wurde bereits im Kapitel 3.1.2 erläutert. Das vorgestellte Design wurde in ein bestehendes Endoskop eingebaut, d.h. die Plasmaquelle mit bifilarer Helixanordnung wurde vollständig den Gegebenheiten eines bereits im Markt befindlichen Endoskopes angepasst. Dies ist ein wesentlicher Vorteil für die praktische Umsetzung. Die Besonderheit des Schlauches ist die helikale Anordnung der elektrischen Zuleitungen, die die Grundvoraussetzungen für die Zündung des Plasmas sind. (siehe Abbildung 3.33) Da sich in einem Endoskop-Schaft eine Vielzahl an Leitungen und Funktionselementen befinden, ist der Platz im Lumen des Schafts sehr begrenzt (Abb. 3.34). Ein weiteres wichtiges Kriterium ist die Forderung in den standardisierten Innendurchmessern (1,4 mm; 2,0 mm; 2,2 mm; 2,8mm) zu bleiben. Üblicherweise ist ein Arbeitskanal im Endoskop mit einem aus medizinisch unbedenklichem PTFE/FEP Material im Innenbereich überzogen.

Dazwischen verstärkt ein Metallgeflecht den Schlauch, auf dessen Außenseite sich ein hochflexibler PU-Mantel befindet. Wenn das Metallgeflecht durch die bifilaren Bänder ersetzt wird, ergibt sich ein funktionsfähiger Arbeitskanal mit möglicher Plasmaerzeugung. Der im Endoskop-Schaft verbaute neue Arbeitskanal muss einerseits elektrisch kontaktiert werden und andererseits abgedichtet zum Endoskopkörper angeschlossen werden. Der Anschluss des Arbeitskanals erfolgte an einem Einführstutzen am Endoskopgriff. Von diesem Stutzen aus können sowohl Instrumente als auch Flüssigkeiten eingebracht werden. Beim Einführen der Instrumente in den Arbeitskanal kommt es im Bereich der Abwinklung zu einer starken mechanischen Beanspruchung.



Abb. 3.33: Beispielschlauch mit bifilarer Doppelhelixanordnung

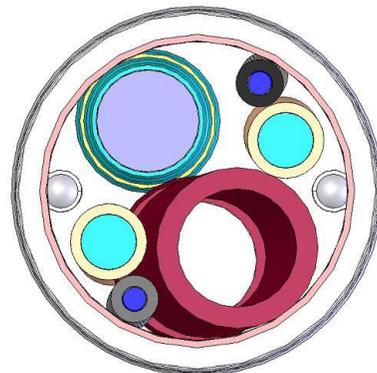


Abb. 3.34: Querschnitt durch einen Endoskopschaft: Arbeitskanal (rot), Bildleiter (türkis/blau), Lichtleiter und Seile

Ein vollständig aufgebauter Plasmoskop-Demonstrator mit einem Schlauch mit bifilarer Helixanordnung als Plasmaquelle wurde als Labormuster realisiert und ist in Abbildung 3.35 zu sehen.



Abb. 3.35: Demonstrator Plasmoskop

3.5.4 Demonstrator Niederdruck (Mikrowellenplasma)

Es sollte in Zusammenarbeit mit Webeco ein Demonstrator entwickelt und hergestellt werden, der die vom INP Greifswald e.V. erarbeitete Mikrowellen-getriebene Plasmaquelle (PLexc) als Kern für die Dekontamination der Außenflächen und Innenflächen von flexiblen Endoskopen nutzt. Mit diesem Anlagendemonstrator sollte die Möglichkeit bestehen, Dekontaminationsprozesse für eine Vielzahl unterschiedlicher Modellkörper und Medizinprodukte unter realen Einsatzbedingungen zu simulieren. Das Gerät sollte Versuche automatisieren helfen, manuelle Eingriffsmöglichkeiten bieten und automatisch Prozesse dokumentieren können. Zur Erzeugung des Plasmas sollte die Möglichkeit bestehen, verschiedene Prozessgase mit unterschiedlichem Durchfluss zu verwenden. Dabei sollte es möglich sein, zwei Plasmaquellen parallel aber unabhängig voneinander in einem größtmöglichen Druckbereich bei unterschiedlicher elektrischer Leistung zu betreiben. Das zu dekontaminierende Gut sollte sich in einer Prozesskammer befinden, die ebenfalls über eine Vakuumpumpe im Kammerdruck variiert werden kann, so dass die Prozesse beispielsweise im Niederdruck oder mit einer speziellen Druck-Wechsel-Technik durchgeführt werden können. Die Prozesskammer sollte darüber hinaus beheizbar sein und eventuelle Gasrückstände sollten nach dem Prozess durch eine Absaugung entfernt werden können.

Bei dem vom Projektpartner Webeco zur Verfügung gestellten Reaktor handelt es sich um ein Reaktorgefäß mit einem Innenvolumen von ca. 62 l in dem im Niederdruck ein mikrowellenangeregtes Plasma betrieben werden kann. Das besondere des Reaktors sind die großen über einen Hebelverschluss zu bedienenden Türen auf beiden Seiten des Vakuumgefäßes, die einen hervorragenden Zugang zum Innenraum gewähren, zu sehen in Abbildung 3.36.

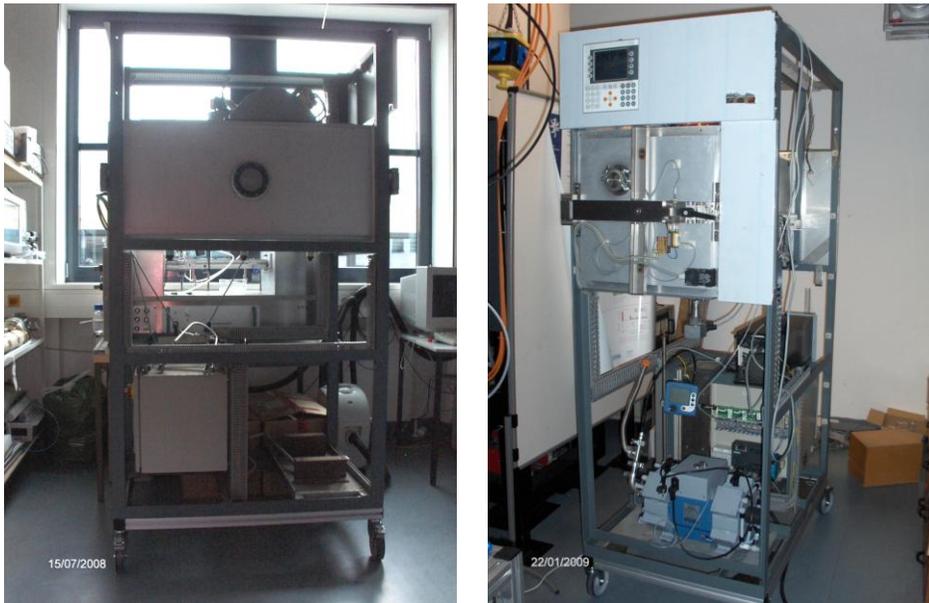


Abb. 3.36: Demonstrator Niederdruck: links: Seitenansicht, rechts: Vorderansicht mit Pumpe und Anlagensteuerung.

Im Rahmen des Endoplas Projektes sollten der Reaktor als Prozesskammer genutzt werden, in der reproduzierbare Bedingungen bzgl. der Gaszusammensetzung möglich waren. Hierzu wurde der Reaktor mit einer Vakuumpumpe und einer Prozesssteuerung ausgerüstet, gezeigt in Abbildung 3.36 rechts.

3.5.5 Demonstrator 2 für die Komplettdekontamination

In enger Zusammenarbeit mit der Firma Webeco wurde der Demonstrator 2 entwickelt. Sein Funktionsprinzip beruht auf der Generierung des wirksamen Agens durch mikrowellenangeregte Plasmaquelle. Da dies in seinen Wirkmechanismen analog zur klassischen Gassterilisation arbeitet, war es naheliegend zu prüfen, in welchem Umfang Sterilisatoren aus der vorhandenen Produktpalette des Projektpartners eine technische Basis für den hier zu erstellen Demonstrator bilden konnten. Durch diese Vorgehensweise konnten Kosten und vor allem Zeit eingespart werden. Das auf diese Weise erstellte Gerät ist in Abbildung 3.37 zu sehen. Das Grundverfahren wurde bereits im Kapitel 3.2.2 Mikrowellen-Entladung dargelegt. Im Unterschied zu der einfachen dort beschriebenen Experimentalanlage besteht der Demonstrator 2 bis auf die Plasmakomponenten aus grundsätzlich zulassungsfähigen Bauteilen.



Abb. 3.37: Darstellung des Demonstrators 2: Reaktorvolumen 145 l, Nutzvolumen 90 l, Mikrowellenleistung Plasmagenerator 1-2 kW, Gasverbrauch 16 slm Pressluft

Funktionell wurde das Arbeitsregime um die Möglichkeit Druckzyklen zu fahren erweitert. Dies erlaubt das verbesserte Eindringen des Wirkagens in Spalte und Lumen, bzw. in Sterilbarrieresysteme. Die Prozesssteuerung erlaubt die kontrollierte und dokumentierte Durchführung von größeren Versuchsserien, wie sie zu einer weiteren Evaluierung des Verfahrens erforderlich ist.

Weitere Details sind der ausführlichen Darstellung im Projektbericht der Firma Webeco zu entnehmen.

3.6 Mikrobiologie

3.6.1 Zielsetzung und allgemeine Bedingungen

Zielsetzung des Projektes Endoplas war die Dekontamination von engen Lumina wie sie in Endoskopen vorkommen bis hin zur Sterilisation mittels physikalischem Plasma.

Besondere Herausforderungen hierbei war die Zündung von Plasmen in den Lumen. Insbesondere die Auswahl und Einstellung der physikalisch-chemischen Parameter und die verfahrenstechnische Auslegung des Prozesses. Weiterhin musste eine Bewertung der Betriebsparameter und der antimikrobiellen/ Pyrogen-abbauenden Effektivität der Plasmen mittels reproduzierbarer Nachweismethoden erfolgen.

Zu Beginn des Projektes lagen durch das Projekt PLASMOSE einige Daten bereits vor. An planaren Oberflächen und definierten Modellspalten mit einer Eindringtiefe von bis zu 50 mm konnte die dekontaminierende Wirkung von Plasmen bereits gezeigt werden. Darüber hinaus zeigten NO-Niederdruckplasmen antimikrobielle Effekte ohne gravierende Ätzungen der Endosporen von *Bacillus atrophaeus*, *Geobacillus stearothermophilus* und *Bacillus pumilus*. Auch der Abtrag von Zellbestandteilen durch Ar/O₂-Niederdruckplasmen war durchs IGB gezeigt worden. Die benötigten Zeiten zur Inaktivierung von Endosporen lagen für Niederdruckplasmen bei ≤ 5 Minuten und es konnten in dieser Zeit Reduktionen von ≥ 6 log-Stufen erzielt werden.

Die am Projekt beteiligten Arbeitsgruppen mit mikrobiologischer Ausrichtung legten in 2008 die Vorgehensweisen und die Methodik in enger Absprache fest. Ein *Arbeitskreis Mikrobiologie* wurde ins Leben gerufen. Schriftliche und telefonische Absprachen sowie zwei Treffen des Arbeitskreises Mikrobiologie (1. Treffen am 14.03.2008 im Fraunhofer IGB in Stuttgart, 2. Treffen am 10.12.2008 bei Fa. HygGen in Schwerin) fanden statt.

Teilnehmende Partner waren jeweils Mitarbeitende von INP, IMAB, Fa. HygCen, Fraunhofer IGB sowie der Projektkoordinator. Beim ersten Treffen wurden die Erfordernisse an die Nachweismethoden formuliert, bestehende Verfahren vorgestellt und weitere mögliche Vorgehensweisen abgesprochen. Bewusst wurden verschiedene Ansätze offen gehalten.

Bei telefonischen Absprachen und beim zweiten Treffen standen Vergleichsmöglichkeiten der Verfahren und konkrete vergleichende experimentelle Überprüfungen im Vordergrund. Die Ergebnisse zeigten, dass in den verschiedenen Arbeitsgruppen bei Anwendung desselben Verfahrens nahezu identische Ergebnisse erzielt wurden. Der Vergleich verschiedener Durchführungsmethoden führte darüber hinaus zu der zulässigen Schlussfolgerung, dass die im Fraunhofer IGB etablierte Vorgehensweise zu ähnlichen Resultaten führt wie die der Norm entsprechende Methode, die von HygCen angewandt wird.

Damit standen innerhalb des Verbundes für die sehr anspruchsvolle Überprüfung der Plasmaparameter geeignete Verfahren zur Bewertung zur Verfügung. Im Folgenden werden die im Projekt durchgeführten Arbeiten zusammen gefasst.

3.6.2 Abgleich der Methoden

Beim Arbeitsgruppentreffen "Mikrobiologie" im Januar 2009 in Stuttgart wurde festgelegt, dass die Kontamination der Prüfkörper in der Regel durch HygCen GmbH erfolgen soll. Als akkreditiertes Prüflabor ist HygCen insbesondere für die Produktion großer Anzahlen von Prüfkörpern personell und fachlich gut ausgestattet. Mikrobiologische Arbeitsmethoden sind entsprechend nationaler und internationaler

Normen standardisiert. Damit für kleinere Versuchsserien auch Prüfkörper vom IGB oder INP vor Ort kontaminiert und die Rückgewinnung der Mikroorganismen durchgeführt werden können, wurde eine Methodenabstimmung zwischen den Laboren durchgeführt. Im Anhang des Zwischenberichtes zum Projektjahr 2008 existiert dazu bereits eine Methodenbeschreibung. Diese Methodenbeschreibung wurde 2009 aktualisiert und diente als Grundlage für die Ringversuche. An Stelle der ursprünglich vorgesehenen Endosporen von *Geobacillus stearothermophilus* wurden vorrangig Endosporen von *Bacillus athrophaeus* eingesetzt. Die Rückgewinnung erfolgte nicht in Teilstücken sondern im gesamten Schlauch. In Ringversuchen wurde der Methodenabgleich überprüft.

3.6.3 Verfahren zur Wiedergewinnung und Bestimmung der Zahl vermehrungsfähiger Mikroorganismen auf planaren Prüfkörpern

Voraussetzung für eine Bestimmung einer antimikrobiellen Effektivität der Plasmen ist eine quantitative Wiedergewinnung der Verkeimungssuspensionen von den planaren Prüfkörpern wie PTFE-Folien oder PE-Streifen. Das Verfahren dazu wurde in Anlehnung an bekannte Verfahren durchgeführt. Die in sterile Kulturröhrchen überführten Prüfkörper wurden horizontal in einem Schüttler eingespannt und 15 Minuten bei maximaler Frequenz geschüttelt. Die Kulturröhrchen waren zuvor mit 10 ml Caseinpepton-Sojamehlpepton-Bouillon (CSL-Bouillon) befüllt und autoklaviert worden. Außerdem wurden sie vor Überführung der Folien mit je 10 sterilen Glasperlen (4 mm) belegt. Handelte es sich um eine Sporensuspension, wurde diese nach dem Schütteln für 10 Minuten auf 80 °C erwärmt.

Von den anschließend vorliegenden Suspensionen wurden 1000 µl direkt auf der Oberfläche einer Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agarplatte ausgespatelt (Spatelplattenmethode). Mit weiteren 500 µl der Sporensuspension wird unter der Zugabe von VF-Wasser eine Verdünnungsreihe hergestellt. Das VF-Wasser enthielt 0,1 % Trypton und 0,85 % NaCl in destilliertem Wasser. Aus jeder Verdünnungsstufe wurden 100 µl auf der Agaroberfläche einer Platte ausgespatelt.

Nach einer Bebrütungszeit von 16 bis 18 Stunden (über Nacht) bei 37 °C wurden die auf den Agarplatten gewachsenen Kolonien gezählt (bis zu 350 Kolonien). Nach dieser Zeit waren die Kolonien mit bloßem Auge gut erkennbar und benachbarte Kolonien noch nicht miteinander verwachsen. Wenn kein Wachstum festzustellen war, wurden die Platten über maximal 7 Tage weiter bebrütet und täglich überprüft.

Ausgehend von der ausgezählten Koloniezahl je Agarplatte (KBE/ Platte) wurde unter Einbeziehung der jeweiligen Verdünnungsstufe und des Volumens der zum Ausschütteln der Prüfkörper verwendeten Lösung die Anzahl koloniebildender Einheiten pro Prüfkörper (z. B. KBE/ Folie) berechnet.

3.6.4 Verfahren zur Belegung der Lumen an der Innenseite [45]

Aufgabe der Mikrobiologen war zunächst eine reproduzierbare und quantifizierbare Methode zum Nachweis der Plasmaeffektivität zu entwickeln. Innerhalb kurzer Zeit konnte im Fraunhofer IGB eine Methode etabliert werden, die sowohl auf den Prüfkörper angepasst war, als auch verlässlich reproduzierbare Ergebnisse lieferte. Die Methode wurde aus diesem Grund von den Kooperationspartnern übernommen. Anschließende Ringversuche bestätigten die Stabilität und Reproduzierbarkeit des Systems. Im

Folgendes soll die Vorgehensweise zur Prüfkörperinnenbelegung dokumentiert werden. Diese Methode eignet sich auch für die Belegung der Außenoberfläche der als Prüfkörper verwendeten PTFE-Schläuche.

Obwohl zu Beginn des Projektes mit *Geobacillus stearothermophilus* gearbeitet wurde, zeigte sich die Verwendung von *Bacillus atrophaeus* als vorteilhaft bezüglich der Handhabung dieses Organismus. Endosporen von *Bacillus atrophaeus* konnten von allen Verbundpartnern selbst hergestellt werden. Bei der großen benötigten Menge an Sporen bedeutete dies sowohl eine finanzielle Einsparung, als auch die Eröffnung der Möglichkeit höhere Bakterienkonzentrationen verwenden zu können, als kommerziell angeboten werden.

Für das favorisierte Durchflussverfahren für alle am Prüfkörper Schlauch durchgeführten mikrobiologischen Untersuchungen wurden folgende Materialien und Suspensionen benötigt:

- Schlauchpumpe mit mindestens 10 bis 100 U/min
- Pumpenschlauch, Material Bioprene (ID 2.4mm)
- Schlauchverbindungsstücke (2-Wege-Verbinder für 1-4mm Schläuche)
- Gefäße für Flüssigkeiten
- Belegungssuspension: 0,3 % Albumin Fraktion V in Aqua dest.
- Rückgewinnungslösung: Caso-Bouillon
- für Verdünnungsreihen: VF-Wasser (1 % Trypton, 0,85 % NaCl, Aqua dest.)

Die Methode zur reproduzierbaren Belegung und Wiederfindung von Mikroorganismen (und Pyrogene) wurde im Verbund etabliert und mit Hilfe von Ringversuchen in ihrer

Zuverlässigkeit bestätigt. Die Ergebnisse der einzelnen Partner sind so vergleichbar und eine einheitliche Interpretation der Plasmaeffektivität ist möglich. Das Prinzip des Belegungsverfahrens beruht auf dem kontinuierlichen Durchfluss mit einer Belegungssuspension durch einen Testschlauch, welche die Endosporen in gewünschter Konzentration enthält (siehe Abbildung 3.38). Des Weiteren enthält sie 0,3 % Albumin (BSA) zur Verbesserung der Anhaftung der Zellen.

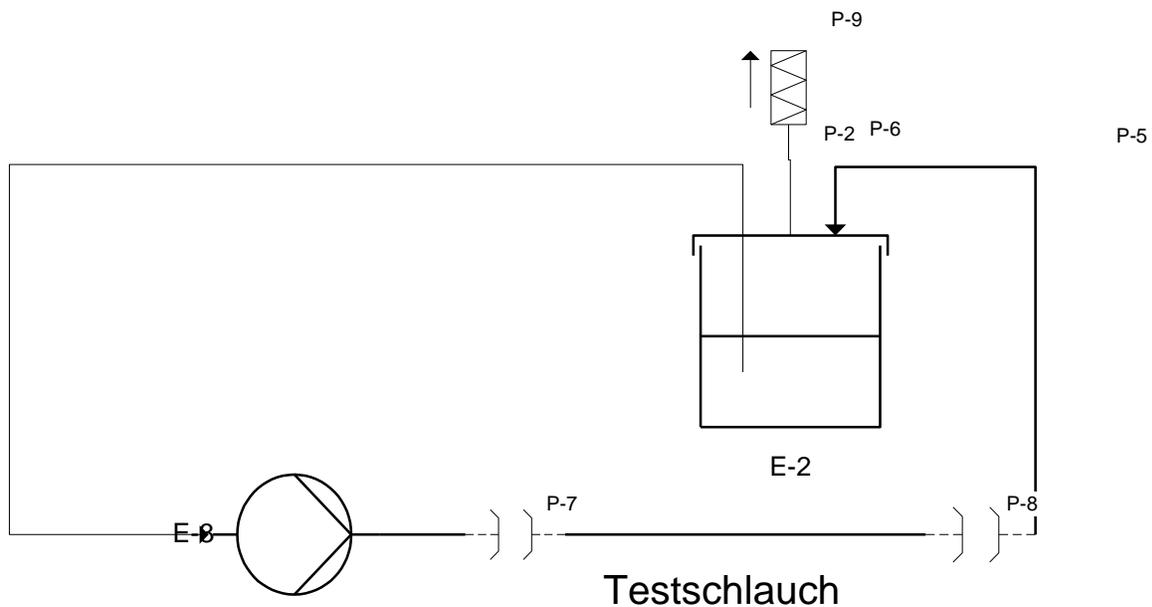


Abb. 3.38: Fließbild zur Innenbelegung von Teflonschläuchen der Testorganismen.

Anschließend müssen die Prüfkörper getrocknet werden, um ein Auskeimen der Sporen zu verhindern und optimale Voraussetzungen für die Plasmabehandlung zu schaffen. Die Trocknung findet bei Raumtemperatur und im Vakuum statt. Die Rückgewinnung kann bei gleichem Aufbau (allerdings mit einem gereinigten, sterilen System) durchgeführt werden. Die Parameter des gesamten Verfahrens sind in Tabelle 3.2 zusammen gefasst. Die Belegung mit 10^8 Zellen/ml führt zu einer Belegung mit einer Zellmenge von 6-7 log-Stufen auf der Oberfläche des Prüfkörpers.

Tab. 3.2: Parameter der Innenbelegung und Rückgewinnung der Prüfkörper.

	Suspensionsmenge [ml]	Durchflussgeschwindigkeit [ml/min]	Zeit [min]
Belegung	25	29,5	5
Trocknung			30
Rückgewinnung	50	59	20

3.6.5 Mathematisches Modell zur etablierten Durchflussmethode [45]

In dem Modell sei α die Wahrscheinlichkeit, dass ein Bakterium in Folge des Anschmutzungsprozesses an der Modellkörperwand anhaftet. Die entgegengesetzte Bakterienmigration (von der Wand in die Suspension) wird mit der Wahrscheinlichkeit β beschrieben. Vereinfachend wurde angenommen, dass α und β unabhängig von der Durchflussdauer und Bakterienkonzentration sind. Außerdem soll es nur innerhalb des Modellkörpers und nicht in den Zuleitungen zu einer Bakterienadhäsion kommen. Die Änderung der Bakterienanzahl auf der Wand dN_w für ein Zeitintervall dt hängt von der Anzahl der Bakterien in der Suspension N_s und von der Bakterienanzahl auf der Modellkörperwand N_w ab. Dasselbe gilt für die Änderung der Bakterienanzahl in der Suspension dN_s/dt . Dadurch ergeben sich folgende Differenzialgleichungssysteme:

$$\frac{dN_w}{dt} = \alpha \cdot N_s - \beta \cdot N_w$$

$$\frac{dN_s}{dt} = \beta \cdot N_w - \alpha \cdot N_s$$

Zu Beginn des Wiederfindungsprozesses sind die gesamten Bakterien N_0 auf der Modellkörperwand verteilt. Daher gilt $N_w(t=0)=N_0$ und $N_s(t=0)=0$. Mit diesen

Nebenbedingungen lässt sich das obige Differentialgleichungssystem lösen. Für die Bakterienanzahl auf der Wand ergibt sich:

$$N_w(t) = N_0 \frac{1}{\alpha + \beta} (\alpha + \beta \cdot e^{-(\alpha + \beta)t}),$$

und für die Bakterienanzahl in der Suspension gilt:

$$N_s(t) = N_0 \frac{\beta}{\alpha + \beta} (1 - e^{-(\alpha + \beta)t}).$$

In Abbildung 3.39 ist ein möglicher qualitativer zeitlicher Verlauf beider Mengen dargestellt.

Es bildet sich ein Gleichgewichtszustand aus. Die Bakterienanzahl, die auf der Modellkörperwand anhaftet ist gleich der Bakterienanzahl, welche sich wieder von dieser ablöst. Die Lage des Gleichgewichts ist nur von den beiden Wahrscheinlichkeiten α und β abhängig. Ab diesem Zeitpunkt führt eine Erhöhung der Durchflussdauer zu keiner weiter zunehmenden Ablösung der Bakterien. Die Wahrscheinlichkeiten α und β wurden experimentell bestimmt. Die Ergebnisse hierzu sind in Abbildung 3.40 dargestellt. Ein Großteil der Bakterien ist bereits nach 200 Sekunden ausgespült, später kommt es zu einer Sättigung (400 Sekunden). Bei der Verwendung einer zusätzlichen Belastung (BSA) in der Suspension konnten zur nicht belasteten Suspension keine wesentlichen Unterschiede gefunden werden. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass für die Bakterienwiederfindung unter Verwendung des Durchflussverfahrens die zusätzliche Belastung mit BSA keinen Einfluss hat.

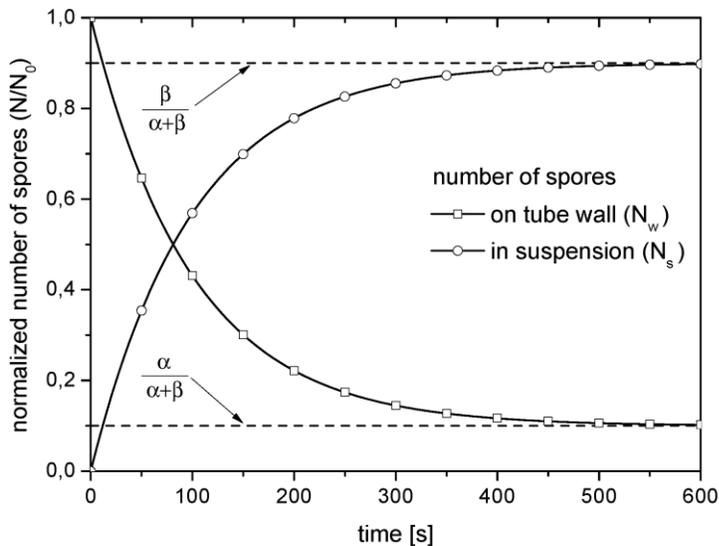


Abb. 3.39: Simulation der zeitabhängigen Charakteristik der Bakterienzahl auf der Modellkörperwand und in der Suspension jeweils normiert auf die Ausgangsbakterienzahl. Die Wahrscheinlichkeiten $\alpha = 1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ und $\beta = 9 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ wurden willkürlich gewählt.

In Übereinstimmung mit dem oben diskutierten Modell bedeutet die Spülung mit steriler Lösung, dass die Wahrscheinlichkeit für eine Bakterienanlagerung an der Modellkörperwand α Null ist. Aus diesem Grund gilt:

$$N_s(t) = N_0(1 - e^{-\beta t})$$

Analog zur mathematischen Beschreibung des Wiederfindungsprozesses kann für den Anschmutzungsprozess ein ähnliches Differentialgleichungssystem erstellt werden. Die Lösung dieses Systems liefert die Relation:

$$N_w^A \xrightarrow{\infty} N_0^A \frac{\alpha}{\alpha + \beta}$$

Die Anhaftungswahrscheinlichkeit α ist dann:

$$\alpha = \frac{N_0}{N_0^A} \beta \cdot \left(1 - \frac{N_0}{N_0^A} \right)^{-1}$$

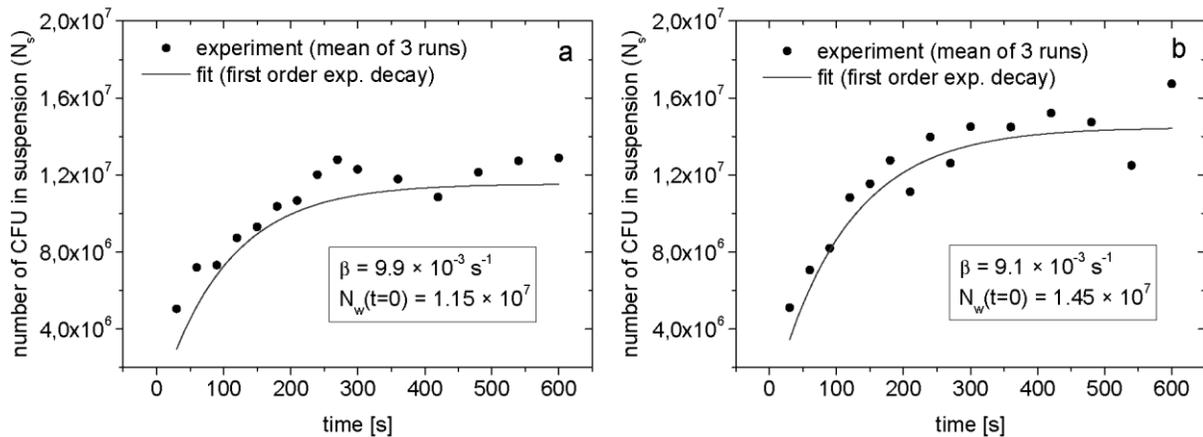


Abb. 3.40: Mittlere absolute Anzahl von Koloniebildenden Einheiten in der ausgespülten Suspension in Abhängigkeit der Durchspülzeit. Die Fit-Funktion ist eine Exponentialfunktion erster Ordnung. Mikrobielle Beladung: a) *Bacillus atrophaeus* Sporen ohne BSA, b) mit BSA.

Durch die experimentelle Bestimmung der beiden Wahrscheinlichkeiten α und β lässt sich die zeitabhängige Bakterienanzahl auf der Modellkörperwand N_w für den Fall, dass die ausgespülte Suspension wieder zurück in den Modellkörper geleitet wird, berechnen. Dies ist zusammen mit dem Fall, dass für das Ausspülen sterile Flüssigkeit ohne Rückführung verwendet wird, in Abbildung 3.41 dargestellt. Um nun den systematischen Fehler der Wiederfindungsmethode mit Rückführung der Suspension zu bestimmen, wurden drei Fälle unterschieden.

Der erste Fall ist, wenn das antimikrobiell wirkende Agens (in diesem Fall das Plasma) die Bakterien vollständig inaktiviert. In diesem Trivialfall entsteht kein systematischer Fehler, da die ursprünglich sterile Spüllösung auch weiterhin keine lebenden Bakterien in sich aufnimmt. Der zweite Fall ist eine teilweise Inaktivierung der Mikroorganismen durch das Agens. In diesem Fall ist die Anzahl der lebenden Bakterien größer als 0 aber kleiner als N_0 . Aus Abbildung 3.41 kann man entnehmen, dass der systematische Fehler nahezu 0 ist, wenn der Anteil der überlebenden Bakterien an der Gesamtzahl kleiner als 10^{-4} ist. Der dritte Fall tritt ein, wenn kein Bakterium inaktiviert wurde. Bei einer Ausgangskonzentration von 10^7 KBE/Modellkörper ist es möglich, alle Bakterien bis auf 10^3 KBE abzuspülen. Dies entspricht einem systematischen Fehler von 0,01-0,1 %, welcher jedoch im Vergleich zum systematischen Fehler der mikrobiologischen Assays vernachlässigbar ist.

Die etablierte Durchflussmethode eignet sich, um Modellkörper effizient und reproduzierbar zu kontaminieren und zu eluieren.

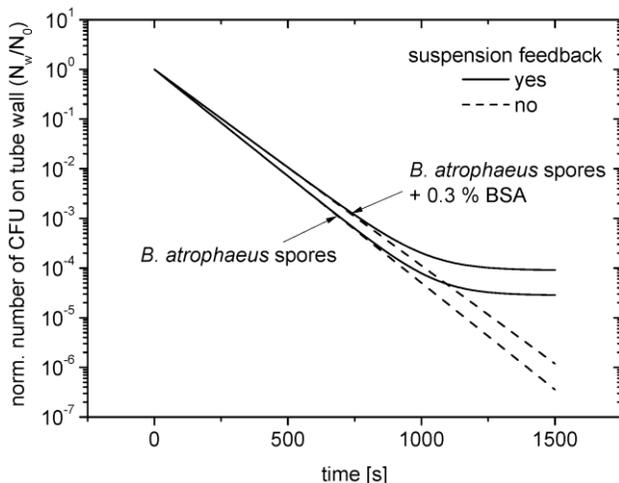


Abb. 3.41: Berechnete Anzahl koloniebildender Einheiten normiert auf die Gesamtzahl der aufgetragenen Mikroorganismen (N_0) auf der Modellkörperwand in Abhängigkeit der Wiederfindungsprozesszeit für die zwei Fälle, dass die ausgespülte Suspension in den Modellkörper zurück geleitet wird und dass mit steriler Suspension ohne Rückführung gearbeitet wird.

3.6.6 Ringversuche [46]

Im Verlauf der Ringversuche wurden mehrere Versuche durchgeführt (Ablauf der Versuche siehe Tabelle 3.3), die Variationen in der Art des Mikroorganismuses und des Labors, welches für die Kontamination verantwortlich war, aufwiesen. Gleichbleibend über alle Versuche hinweg waren die Materialien (Suspensionen und Lösungen), der Prüfkörper (PTFE-Schlauch), die Sporensuspension und die Methode der Kontamination und Wiederfindung. Die zu letzt genannten Methoden waren erst ab dem 2. Ringversuch gleich. Eine kurze Zusammenfassung der durchgeführten Ringversuche ist in Abbildung 3.42 zu sehen. Die Ergebnisse des 1. Ringversuchs zeigten deutlich die Unterschiede in der Kontamination und Wiederfindung zwischen den Laboren, in Abbildung 3.43 dargestellt. Nicht nur die Ausgangskonzentration und die Höhe der Wiederfindung, sondern auch die Differenz zwischen beiden Werten schwankte stark. Die Abweichungen waren meist größer als eine log-Stufe, also außerhalb einer mikrobiologischen Toleranz. Diese Unterschiede konnten auf verschiedenste angewandte Methoden zur Kontamination und Wiederfindung zurückgeführt werden. Betrachtete man lediglich die Wiederfindung so erreichte das INP mit der Kombination aus Durchflussverfahren für die Kontamination und Zerschneiden der Schläuche zur Wiederfindung die besten Ergebnisse. Wurde aber die Ausgangskonzentration berücksichtigt, so schnitt die Methodenkombination des IGB (Kontamination und Wiederfindung mit dem Durchflussverfahren) am besten ab. Daher entschied sich der Mibi-Arbeitskreise für die Durchflussmethode zur Kontamination und Wiederfindung für alle weiteren Ringversuche. HygCen sowie das INP übernahmen die Methode des IGB und etablierten sie mit einigen Vorversuchen. Im zweiten Ringversuch wurde dies vergleichend überprüft.

Mit Hilfe der Methodenangleichung wurde eine deutliche Verbesserung der Vergleichbarkeit der Ergebnisse im zweiten Ringversuch erzielt. Die Abbildung 3.43 zeigt deutlich, dass die Ausgangskonzentration auf 6 log KBE/ Schlauch anstieg, aber auch, dass die Wiederfindung weiterhin Abweichungen von mehr als einer log-Stufe hatte.

Ein möglicher Grund hierfür könnten die Unterschiede in der Methodenanwendung sein. Die verwendeten Schlauchpumpen waren nicht einheitlich und auch die genutzte Menge an Nährbouillon war unterschiedlich. Daher besprachen die an den Ringversuchen beteiligten Mitarbeiter des IGB, HygCen und INP die zukünftige Vorgehensweise erneut und standardisierten die Durchflussmethode genauer für einen 3. Ringversuch.

Tab. 3.3. Abfolge der Arbeitsschritte für die Ringversuche. Im Laufe der Ringversuche führte jedes der teilnehmenden Labore die Kontamination mindestens einmal durch. Alle Versuche wurden mit n=3 durchgeführt.

Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5
Hydrophilierung der Schläuche beim INP, Übernachttransport	Kontamination der Schläuche mit Sporensuspension und 0,3 % BSA 0,3einer Konzentration von 10^8 KBE ml ⁻¹ durch das verantwortliche Labor, Übernachttransport	Plasma-behandlung der kontaminierten Schläuche durch das IGB und INP, Lagerung der Kontrollschläuche	Wiederfindung der Restkontamination durch jedes Labor	Analyse und Interpretation der Ergebnisse durch alle Partner

Die Ergebnisse dieses Versuchs sind ebenfalls in Abbildung 3.47 zu sehen und zeigten eine deutliche Verbesserung der Wiederfindung. Die jeweiligen Werte der unterschiedlichen Labore waren sehr dicht beieinander und vergleichbar.

Die so erreichten Standards für die Durchflussmethode wurden auch in den folgenden Ringversuchen, welche der Reproduzierbarkeit (Labor- und Mikroorganismen-unabhängigkeit) dienen, angewandt und bestätigt.

Abb. 3.42: Zusammenfassung der 6 Ringversuche

Ringversuch	Datum	Ziel	Ergebnis
I	6/ 2009	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Vergleichbarkeit von Kontamination, <u>Elution</u> und Reduktionsfaktoren ▪ Methodenfindung 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ starke Streuung, kein Vergleich möglich ▪ Durchflussverfahren
II	10/ 2009	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Vergleichbarkeit von Kontamination, <u>Elution</u> und Reduktionsfaktoren 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ mittlere Streuung → optimierbar ▪ Kommunikation verbessern
III	11/ 2009	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Vergleichbarkeit von Kontamination, <u>Elution</u> und Reduktionsfaktoren 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Standardisierung der Prüfkörper ▪ Reduktionsfaktoren vergleichbar → Ziel erreicht
IV	3/ 2010	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Reproduzierbarkeit der Methodik (INP) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ erfolgreich ▪ Erhöhung der Reduktion
V	3/ 2010	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Reproduzierbarkeit der Methodik (IGB) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ erfolgreich ▪ Erhöhung der Reduktion
VI	6/ 2010	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Variation des Mikroorganismus 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ erfolgreich ▪ Reduktion erreicht Nachweisgrenze

Im 1. Ringversuch wurden die Schläuche durch jedes Labor jeweils vor Ort in der benötigten Stückzahl kontaminiert und erst zur Wiederfindung versandt. In den Ringversuchen 2 und 3 wurden alle benötigten Schläuche durch HygGen kontaminiert. Zur Reproduzierbarkeit der standardisierten Methodik und zur Demonstration der Unabhängigkeit von kontaminierenden Labor wurden im 4. Ringversuch die Schläuche durch das INP und im 5. Ringversuch durch das IGB kontaminiert. Die jeweiligen Ergebnisse hierzu sind in Abbildung 3.44 dargestellt. In beiden Fällen konnte die Reproduzierbarkeit der Kontamination und Wiederfindung stabil gezeigt werden. In einem letzten Ringversuch wurde der Mikroorganismus gewechselt.

Abb. 3.43: Ergebnisse des 1. (a), 2. (b) und 3. (c) Ringversuches. Der Mittelwert der \log_{10} / KBE/ Prüfkörper ist für jeden Versuch von jedem Labor gezeigt (unbehandelt und Plasma-behandelt) Die Plasmabehandlung wurde vom IGB und INP durchgeführt. Die Wiederfindung wurde durch alle Labore durchgeführt. Jeder Versuch fand mit $n = 3$ statt.

- a) alle Teilnehmer kontaminierten die Schläuche. Das IGB führte keine Wiederfindung für IGB-behandelte Schläuche durch und das INP keine für INP-behandelte Schläuche.
- b) HygCen kontaminierte die Schläuche.
- c) HygCen kontaminierte die Schläuche.

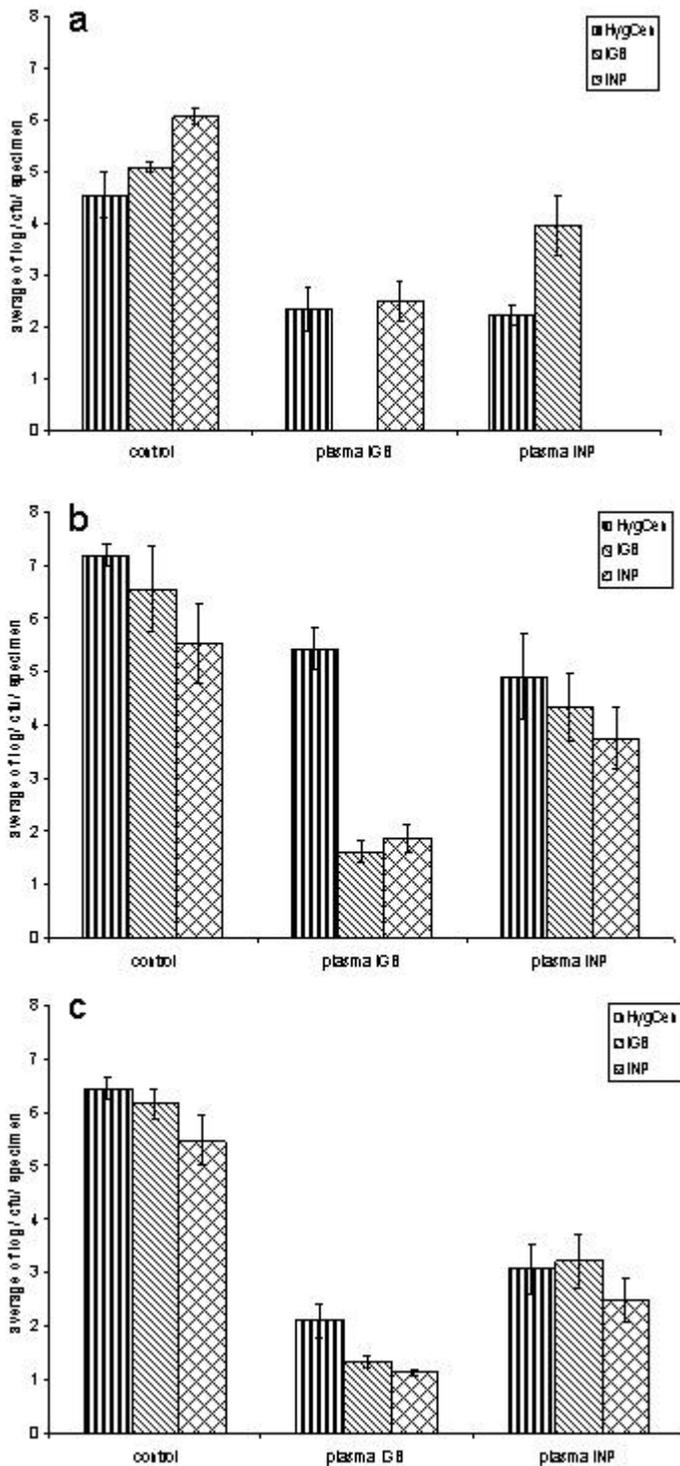
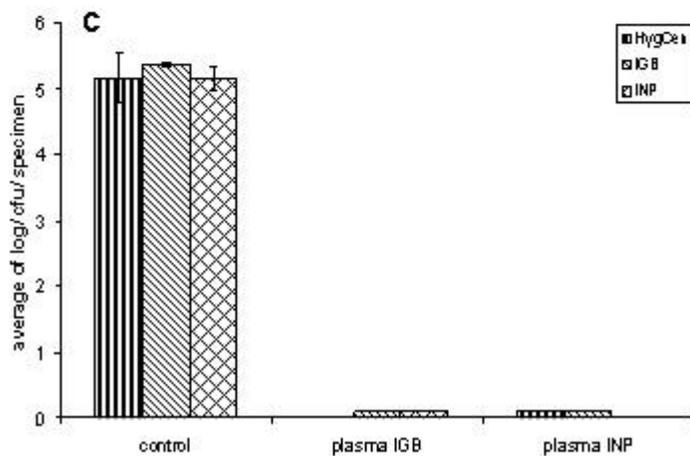
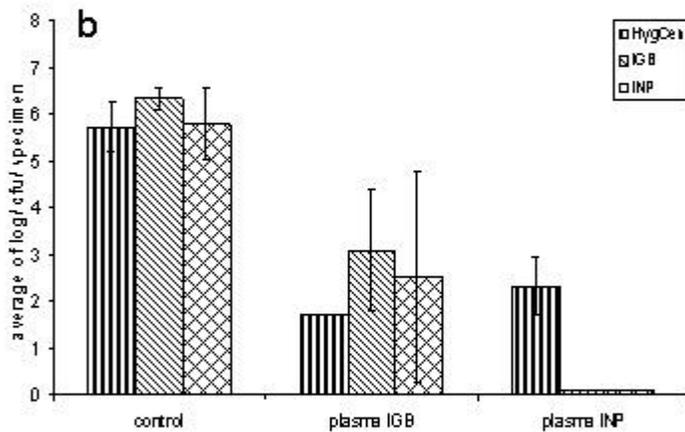
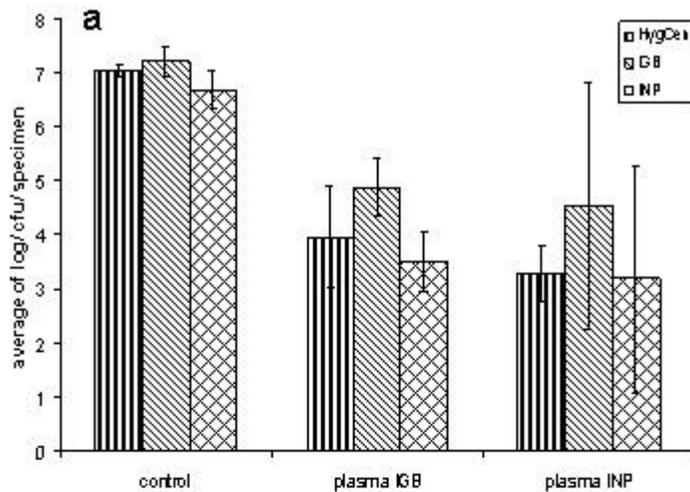


Abb. 3.44: Ergebnisse des 4. (a), 5. (b) und 6. (c) Ringversuches. Der Mittelwert der \log_{10} / KBE/ Prüfkörper ist für jeden Versuch von jedem Labor gezeigt (unbehandelt und Plasma-behandelt) Die Plasmabehandlung wurde vom IGB und INP durchgeführt. Die Wiederfindung wurde durch alle Labore durchgeführt. Jeder Versuch fand mit $n = 3$ statt.

- a) INP kontaminierte die Schläuche.
- b) IGB kontaminierte die Schläuche.
- c) HygCen kontaminierte die Schläuche. *G. stearotherophilus* Endosporen wurden verwendet.



Anstatt der Endosporen von *Bacillus atrophaeus* wurden Endosporen von *Geobacillus stearothermophilus* genutzt. Die Kontamination für diesen 6. Ringversuch erfolgte wieder bei HygGen.

Auch wenn die Ausgangskonzentration auf Grund der gewählten Spore ein wenig niedriger lag, so konnte eindeutig ein vergleichbares Ergebnis erzielt werden. Die Abweichungen der Laborergebnisse untereinander waren extrem gering (Abbildung 3.44). Alles in allem, konnte eine neue Methode zur Kontamination und Wiederfindung für enge, lange Lumen erfolgreich etabliert und in Ringversuchen die Reproduzierbarkeit bestätigt werden. Die neue Methode hat enorme Vorteile in ihrer Zeit- und Materialersparnis gegenüber dem alternativen Spülen und Zerschneiden und darüber hinaus zeigt das neue Durchflussverfahren eine höhere Effektivität in der Belegung der Schläuche und der Handhabbarkeit.

3.6.7 mikrobiologische Untersuchungen zur DBE

Zur Untersuchung der Wirksamkeit von antimikrobiellen Verfahren wie der Plasmabehandlung mittels DBE auf direkt zugängliche Mikroorganismen wurden PTFE-Folien (Teflon) in der Größe von 60 mm x 60 mm mit einer Dicke von 0,1 mm verwendet (Firma Goodfellow, siehe Abbildung 3.45). Nach einer fünfminütigen Plasma-Vorbehandlung zur Erhöhung der Benetzbarkeit wurden die hydrophilierten Bereiche der planaren PTFE-Folie mit einer Sporensuspension (*Bacillus atrophaeus*) belegt. Die Ausgangskonzentration betrug dabei ungefähr 10^6 KBE/ Probe. Anschließend wurden die PTFE-Folien für mindestens eine Stunde unter Laminar-flow-Bedingungen bei Raumtemperatur getrocknet. Nachdem die Suspension angetrocknet war, erfolgte die zehnminütige Plasmabehandlung mit dem Ziel der Entkeimung. Zuvor wurden die

Proben in den DBE-Reaktor gelegt und die Kammer evakuiert. War ein Druck von unter 1 mbar erreicht, wurde der Reaktor mit der verwendeten Gasmischung auf Normaldruck gefüllt, erneut abgepumpt und wieder auf Normaldruck befüllt. Diese Prozedur gewährleistet, dass möglichst wenige Verunreinigungen die Ergebnisse verfälschen können. Die Plasmabehandlung mit verschiedenen Plasmen (Formiergas, Helium, Argon) erfolgte direkt nach Trocknung der Prüfkörper.

Nach erfolgter Plasmabehandlung wurden die Proben in Reagenzgläser zum Abspülen der verbleibenden Keime überführt und zur Auswertung ins mikrobiologische Labor (INP) gegeben. Zur Herausarbeitung eines für die Entkeimung optimalen Plasmas wurde zuerst ein Test mit mehreren verschiedenen Gasen bzw. Mischungen durchgeführt. Dabei konnten im Rahmen der Nachweisgrenze bei einigen Plasmen keine Keime überleben und Reduktionsfaktoren von bis zu 3,8 erreicht werden. (siehe Abbildung 3.46). Es zeigte sich, dass ein Gasgemisch bestehend aus Argon und Luft bzw. aus Argon und Sauerstoff vielversprechende Keimreduktionen liefert, weshalb insbesondere diese Plasmen weiter verfolgt wurden.

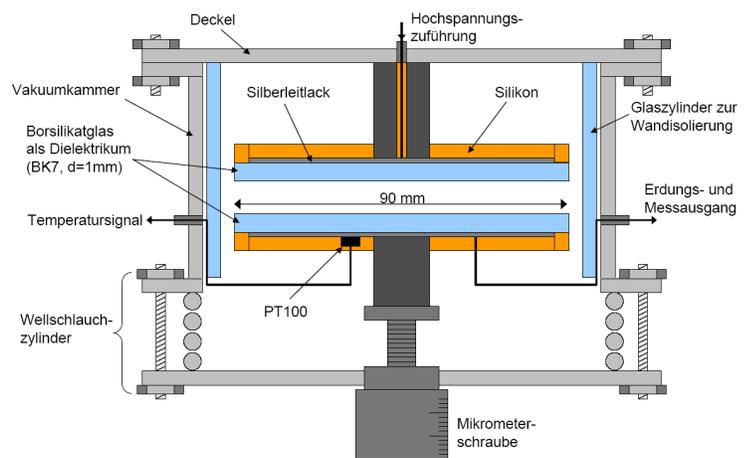


Abb. 3.45: verwendete Folien (links) und Skizze der Vakuumkammer mit den planparallelen Elektroden

Das Ergebnis der Untersuchung zum Mischungsverhältnis von Argon und Luft zeigte deutlich, dass für eine Luftzumischung von 20% bis 40% ein Maximum in der Keimreduktion mit Reduktionsfaktoren >4 erreicht wurde. Die Lage des Maximums war dabei unabhängig davon, ob die Vorbehandlung mit Argon oder mit Formiergas (N₂+5%H₂) vorgenommen wurde. Nicht unabhängig von der Vorbehandlung waren jedoch die Streuungen der einzelnen Messwerte, die im Fall einer Argon-Vorbehandlung sehr viel größer waren als die bei einer Helium-Vorbehandlung. Dies könnte an der unterschiedlichen Gleichmäßigkeit der Plasmavorbehandlung liegen.

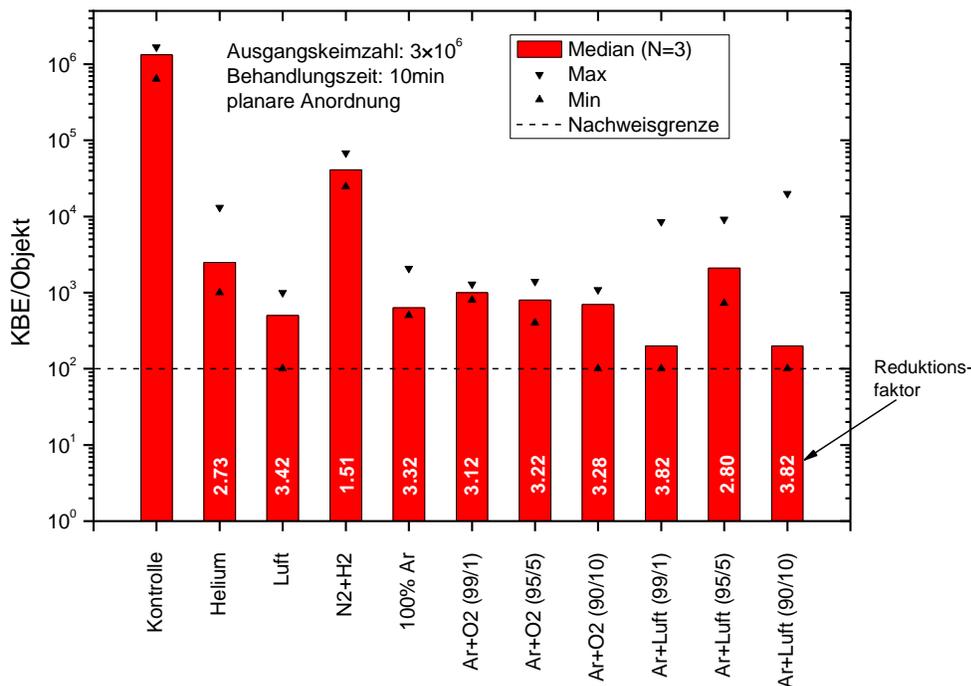


Abb. 3.46: Einfluss verschiedener Gaszusammensetzungen auf die antimikrobielle Wirksamkeit. Dargestellt ist die Anzahl der überlebenden koloniebildenden Einheiten (KBE) für verschiedene jeweils zehninütige Plasmabehandlungen bzw. für die unbehandelte Kontrolle.

So war aus Vorversuchen bekannt, dass mit Formiergas eine wesentlich homogenere Hydrophilierung der Teflonoberfläche erreicht wird als mit Argon. Für den Fall, dass ein Sauerstoff-Argon-Plasma verwendet wurde, ergaben sich ähnliche Reduktionsfaktoren. Dieser nahm mit steigendem Sauerstoffanteil zu. Des Weiteren wurde der Einfluss des Vakuums auf die verwendeten Keime untersucht, da es vorstellbar ist, dass die Keime allein durch den Unterdruck abgetötet werden. Hierzu wurde die Entkeimungsprozedur zu den vorherigen Versuchen bis auf den Fakt, dass das Plasma nicht eingeschaltet wurde, vollkommen identisch durchgeführt. Hierbei ließ sich jedoch im Rahmen der Messwertstreuung kein Unterschied zur Kontrolle, also zu den Keimen, die keinem Vakuum oder Plasma ausgesetzt waren, feststellen. Aus diesem Sachverhalt lässt sich schlussfolgern, dass der reine Unterdruck in der Kammer, der Spülvorgang mit dem Arbeitsgas sowie das Hineinlegen und Herausholen der PTFE-Proben aus dem Reaktor keinen nennenswerten Einfluss auf die Vitalität der Mikroorganismen haben und dass tatsächlich die Plasmabehandlung selbst die Keimreduktion hervorruft.

Die mikrobiologischen Ergebnisse zur koaxialen DBE wurden bereits in den Ringversuchen beschrieben (Kapitel 3.6.6).

3.6.8 mikrobiologische Untersuchungen zur bifilaren Helixanordnung

Das entwickelte Verfahren zur definierten Anschmutzung von engen Lumen und zur Wiederfindung der überlebenden Mikroorganismen wurde auch für die bifilare Helixanordnung eingesetzt. Unter Anwendung dieses Verfahrens gelang der Nachweis der antimikrobiellen Wirksamkeit des durch die bifilare Helixanordnung erzeugten Plasmas. Hierfür wurden 30 cm lange PTFE-Schläuche mit der bifilaren Helixanordnung

versehen und mit *Bacillus atrophaeus* Sporen belegt. Die Konzentration der Mikroorganismen pro Schlauch betrug ca. $1,4 \times 10^6$ Mikroorganismen/ Schlauch. Als Arbeitsgas wurde Argon mit einer Flussrate von 1,5 slm und diversen Zumischungen verwendet. Für jede einzelne Gasmischung wurde der Versuch dreimal wiederholt. Anschließend erfolgte die Wiederfindung der Mikroorganismen. Um eine Aussage über die Streuung des Behandlungserfolges im Schlauch treffen zu können, wurde der Prüfkörper vor der Wiederfindung in drei gleich lange Enden zerschnitten.

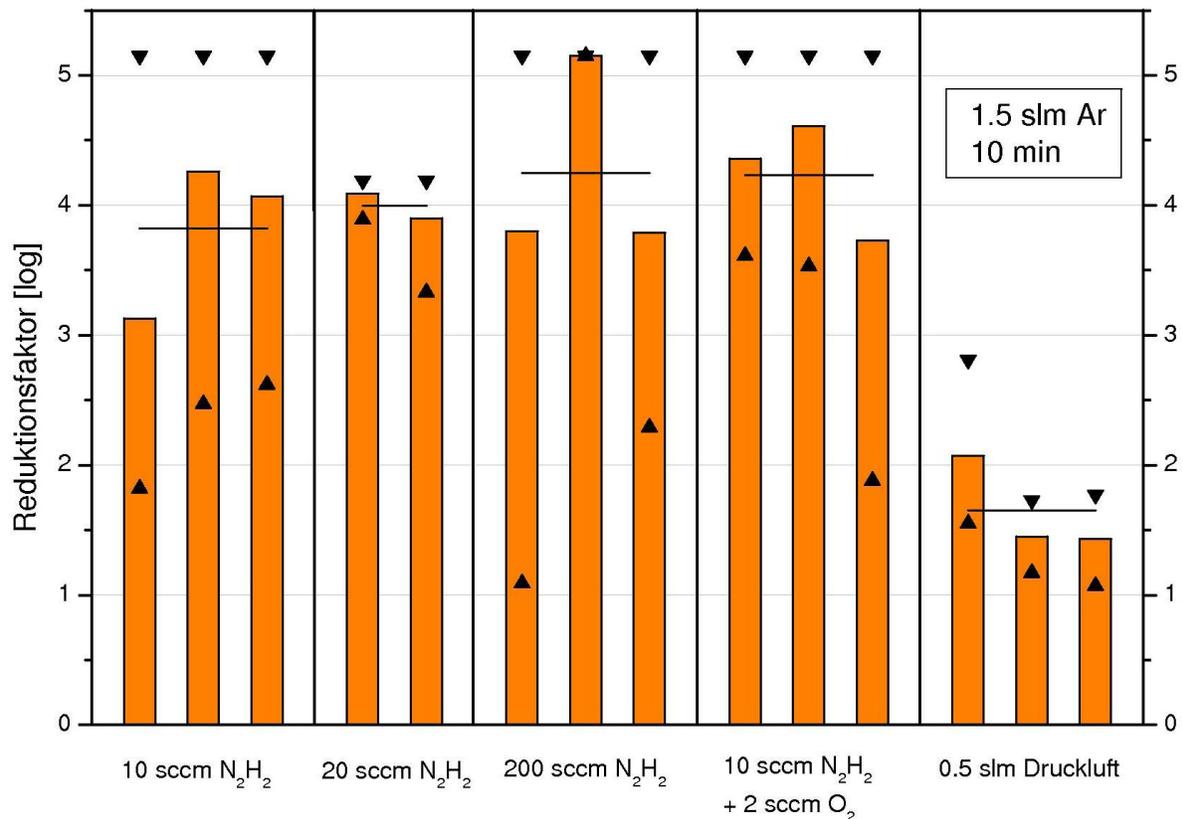


Abb. 3.47: Ergebnisse der antimikrobiellen Versuche unter Verwendung der bifilaren Helixanordnung. Dargestellt ist der Reduktionsfaktor für verschiedene Arbeitsgasmischungen. Ein Balken entspricht dem mittleren Reduktionsfaktor in einem 30 cm-Schlauch. Das Dreieck mit der Spitze nach oben (▲) bzw. mit der Spitze nach unten (▼) gibt den minimalen bzw. den maximalen Reduktionsfaktor an. Mit der horizontalen Linie (-) ist der Mittelwert des Reduktionsfaktors aus drei Behandlungen mit gleichen Versuchsparametern gekennzeichnet.

Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist in Abbildung 3.47 dargestellt. Hier ist der Reduktionsfaktor für verschiedene Arbeitsgasmischungen aufgetragen. Ein Balken entspricht dem mittleren Reduktionsfaktor in einem 30 cm-Schlauch.

Es wird deutlich, dass sich mit der bifilaren Helixanordnung eine signifikante Reduktion der Mikroorganismenkonzentration erreichen lässt. Der Nachweis, dass das ausgetriebene Plasma der bifilaren Helixanordnung ebenfalls eine antimikrobielle Wirkung hat, ist in Abbildung 3.48 zu sehen.

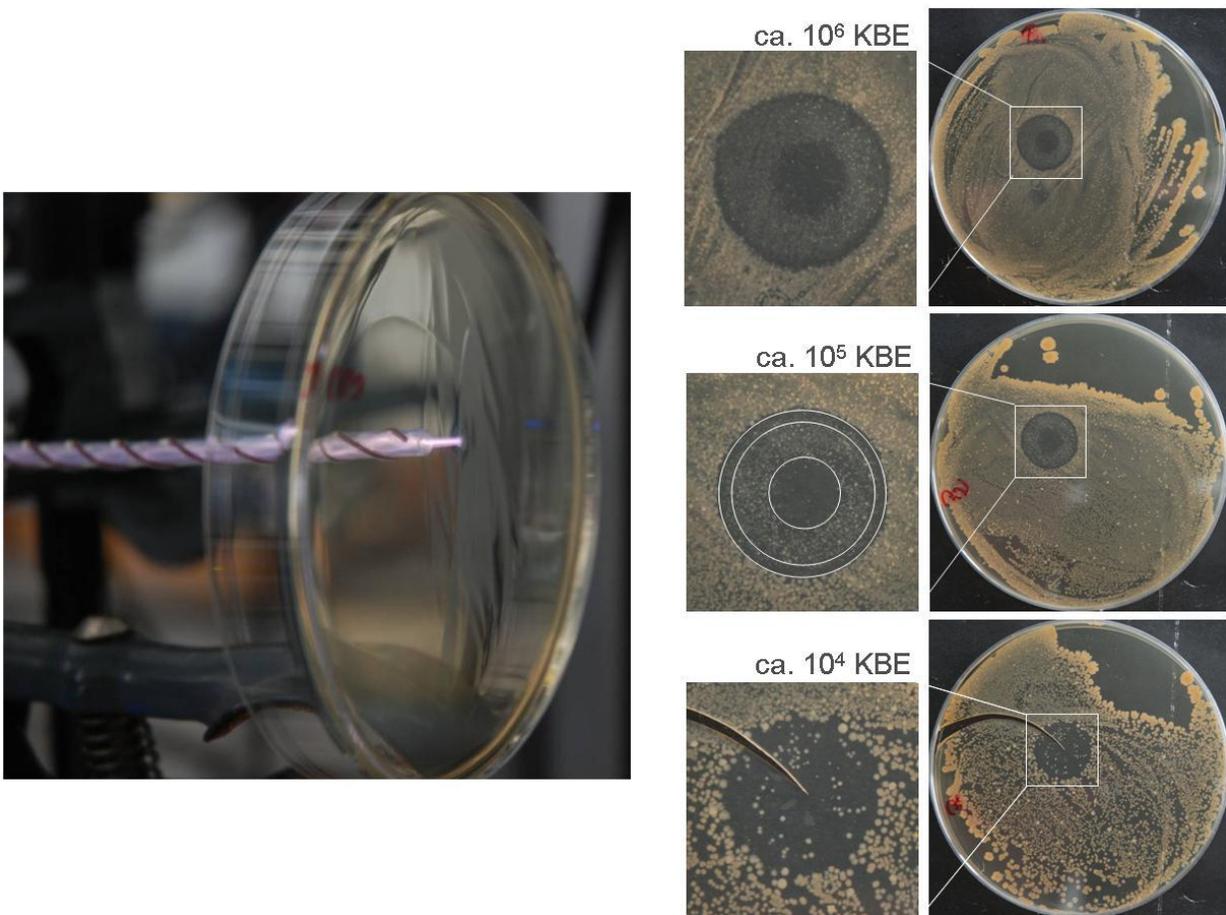


Abb. 3.48: Plasmabehandlung einer mit Mikroorganismen (*B. atrophaeus* Sporen) bestrichene Agar-Platte mittels ausgetriebener Entladung. Auf der rechten Bildseite sind deutlich die behandelten Regionen sichtbar.

Hier wurde eine mit Mikroorganismen (*B. atrophaeus* Sporen) bestrichene Agar-Platte an einer Stelle über einen Zeitraum von 4 Minuten mit dem ausgetriebenen Plasma behandelt. Bei der anschließenden Bebrütung der Mikroorganismen zeigte sich, dass an den plasmabehandelten Stellen ein kreisrunder Bereich (Hemmhof) entstand, der eine starke Reduktion in der Dichte der Mikroorganismen darstellte.

3.6.9 mikrobiologische Untersuchungen zum Demonstrator 1

Die Fähigkeit des Demonstrators 1 für dekontaminierende Prozesse eingesetzt zu werden, wurde durch einfache mikrobiologische Versuche gezeigt. Während dieser Versuche sollte ein realistischer Aufbereitungsprozess mit Spül- und Trocknungsstufen und anschließender Plasmazündung simuliert werden. Zum Einsatz kamen mit dem Durchflussverfahren kontaminierte industriell gefertigte Schläuche mit bifilarer Helixanordnung. Da die Schläuche sehr dünnwandig waren, konnte für den Plasmaprozess nur eine geringe Spannung angelegt werden. Die Schläuche aus PEF waren 1 m lang und mit Sporen von *B. atrophaeus* in einer Konzentration von 10^6 KBE/Schlauch kontaminiert. Die Prozessführung zur Aufreinigung und Dekontamination der Schläuche erfolgte in fünf Schritten. Diese sind nachfolgend aufgeführt:

Schritt 1: 60 s spülen mit VE-Wasser

Schritt 2: Wasser aus der Apparatur austreiben, 60 s mit 1 slm Ar

Schritt 3: 60 s trocknen mit Pressluft (hoher Luftstrom)

Schritt 4: 20 s fluten der Anlage 1 slm Ar

Schritt 5: 600 s Plasma

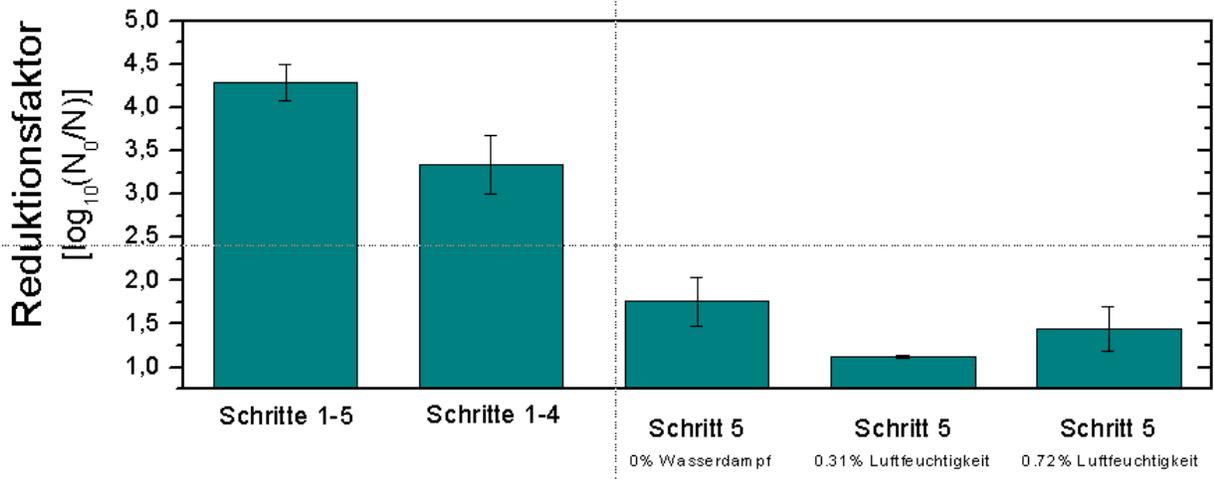


Abb. 3.49: mikrobiologisches Ergebnis für die Schritte 1 bis 5 am Demonstrator 1

In Abbildung 3.49 sind die erhaltenen mikrobiologischen Ergebnisse zu sehen. Die Schritte 1 bis 5 zusammen führten zu einer Reduktion der mikrobiellen Belastung um 4 bis 4,5 log-Stufen. Wurden die Schritte 1 bis 4 betrachtet, so ergab sich eine Reduktion von 3 bis 3,5 log-Stufen. Diese Reduktion wurde allein durch die Spül- und Trocknungsschritte erzielt. Die verbliebene Differenz zwischen den beobachteten Reduktionen ist auf die Plasmabehandlung zurückzuführen. Diese erzielt zusätzlich zu den Spül- und Trocknungsschritten eine Reduktion von 1 bis 1,5 log-Stufen. Eine Erhöhung der Reduktion, d.h. antimikrobiellen Effektivität, des Plasmas (Schritt 5) ist mit höheren Spannungen realisierbar. Allerdings werden hierfür Schläuche mit höherer Spannungsfestigkeit benötigt.

3.6.10 mikrobiologische Untersuchungen zum Demonstrator 2

Die Fähigkeit des Demonstrators 2 für dekontaminierende Prozesse eingesetzt zu werden, wurde durch einfache mikrobiologische Versuche gezeigt. Das üblicherweise durch das Mikrowellenplasma erzeugte Gas wurde hierfür durch ein Stickoxid-Luft

Gemisch simuliert. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Prozessgase sich in der Prozesskammer gleichmäßig verteilen und eine konstante mikrobiologische Inaktivierung in der gesamten Kammer gewährleistet wird. Zur Durchführung dieses Nachweises wurden inokulierte Agarplatten und Bioindikatorstreifen gleichmäßig in dem Sterilkorb verteilt (siehe Abbildung 3.50)

Die Agarplatten waren mit *E. coli* und *B. atrophaeus* kontaminiert und die Bioindikatorstreifen trugen je Streifen entweder 10⁶ KBE *B. atrophaeus* oder *G. stearothermophilus*.

Die Ergebnisse für die Agarplatten sind in Abbildung 3.51 dargestellt.



Abb. 3.50: Platzierung der Agarplatten und Teststreifen während des Behandlungsprozesses im Demonstrator 2.

Es sind immer jeweils die unbehandelten Agarplatten und die durch das Prozessgas inaktivierten Agarplatten zu sehen. Links die mit *B. atrophaeus* Sporen kontaminierten Platten und rechts im Bild die mit *E. coli* kontaminierten Platten. Es wird sehr deutlich, dass das Prozessgas mit 1 h Einwirkzeit alle aufgebrauchten Mikroorganismen vollständig inaktiviert hat.

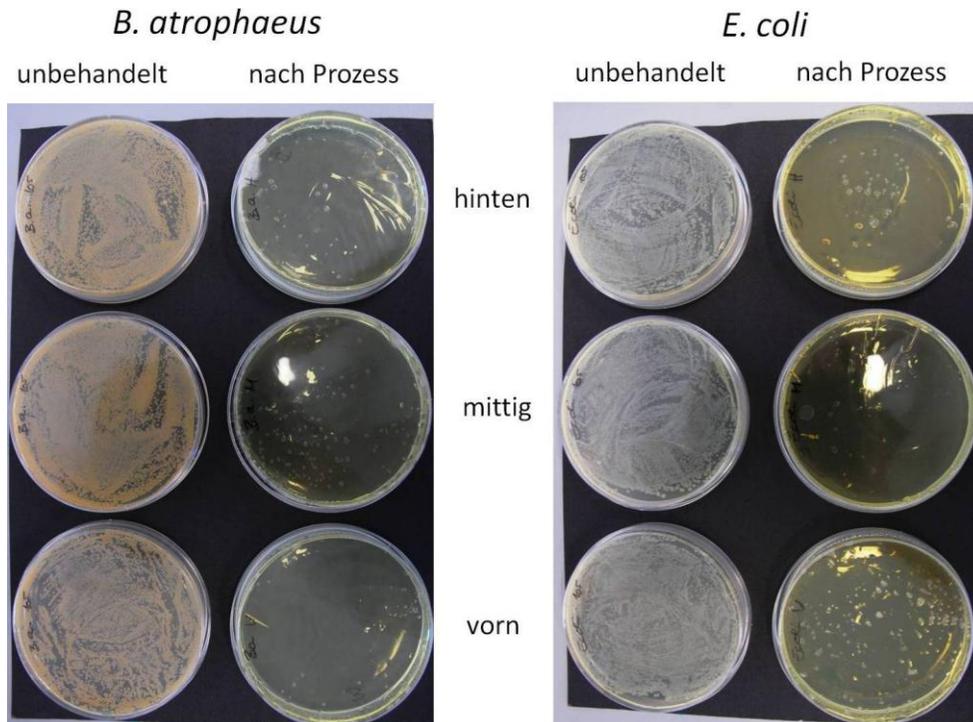


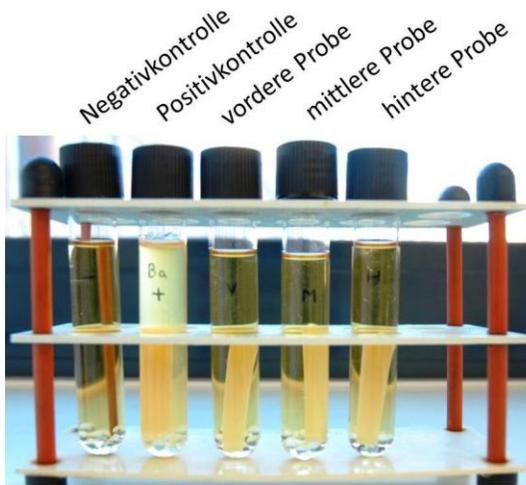
Abb. 3.51: Ergebnisse der Agarplatten vor und nach dem Behandlungsprozess für *E. coli* und Sporen von *B. atrophaeus*.

Dabei ist auch kein Einfluss bezüglich der Position in der Prozesskammer erkennbar.

Es kann also davon ausgegangen werden, dass das Prozessgas die Prozesskammer gleichmäßig ausgefüllt hat. Die Teststreifen in Abbildung 3.52 zeigen den gleichen Effekt. Lediglich die mittlere Probe von *G. stearothermophilus* weist noch Spuren von Wachstum auf.

Die Teststreifen erlauben jedoch nur eine grundsätzliche Ja/Nein-Aussage. Sobald auch nur 1 Mikroorganismus auf dem Teststreifen überlebt hat, zeigt sich ein Wachstum ähnlich der Positivkontrolle. Grundsätzlich zeigen aber auch die Ergebnisse mit den Teststreifen, dass der Demonstrator 2 entsprechend den Anforderungen funktioniert.

B. atrophaeus



G. stearothermophilus

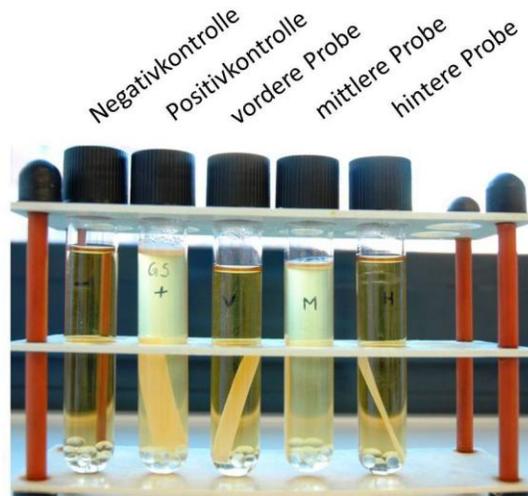


Abb. 3.52: Ergebnisse der Teststreifen nach dem Behandlungsprozess für Sporen von *B. atrophaeus* und *G. stearothermophilus*.

4. Zusammenfassung und Ausblick

Im Teilvorhaben "Erarbeitung von Plasmasterilisationsverfahren und deren Integration in den Aufbereitungsprozess" im Verbundprojekt "Inaktivierende Mikroplasma zur Sterilisation im Lumen von medizinischen Instrumenten (ENDOPLAS)" wurde der Einsatz von nichtthermischen Atmosphärendruckplasmen für die produktschonende biologische Dekontamination und die plasmagestützte bioaktive Beschichtung zum Schutz vor Rekontaminationen von hochwertigen und empfindlichen Medizinprodukten mit komplexen Strukturen und Lumen untersucht.

Um die Praxisnähe zu gewährleisten, war es ein Anspruch des Projektes, die neuartigen Verfahren an konkreten realen Produkten auszurichten und zu testen. Aus dem breiten Spektrum von für die Plasmabehandlung relevanten Medizinprodukten wurden als Prüfmuster flexible Endoskope mit Arbeitskanal (vorrangig Gastroskope der Firma FujiFilm sowie Nasopharyngoskope der Firma XION) ausgewählt. Die Arbeiten fokussierten sich ferner auf folgende Sachverhalte:

- Möglichkeiten des Einsatzes von speziell an die Geometrie dieser Endoskope angepasste dielektrisch behinderte Entladung für die schonende biologische Dekontamination
- Möglichkeiten des Einsatzes eines Mikrowellenplasmas für die schonende biologische Dekontamination

- Möglichkeiten des plasmagestützten Auftrags antimikrobiell wirkender Schichten aus Lipid-Nanopartikeln zum Schutz vor einer Rekontamination dieser Medizinprodukte
- Analyse der Wirkung der Plasmen und der Nanopartikelbeschichtung auf die Oberflächen der Medizinprodukte
- Etablierung und Standardisierung von mikrobiologischen Verfahren zur vergleichenden Analyse von antimikrobiellen Effekten von physikalischen Plasmen

Für alle Sachverhalte konnten gemeinsam mit den Projektpartnern WEBECO, Vanguard, Fraunhofer IGB, HygCen und IMAB Greifswald e.V. konkrete Lösungsansätze erarbeitet werden.

Es stehen damit prinzipiell plasmagestützte Verfahren bei Atmosphärendruck sowohl zur biologischen Dekontamination und zum Auftrag von Lipid-Nanopartikeln zur Verfügung.

In Kooperation mit den Projektpartnern konnte die antimikrobielle Wirkung der verschiedenen Plasmaquellen, sowohl bei der Außen- als auch bei der Innenbehandlung von Endoskop-Modellkörpern nachgewiesen und verifiziert werden.

Insbesondere das über die Ringversuche etablierte Durchflussverfahren ermöglichte einen Vergleich der antimikrobiellen Effektivität aller im Projekt untersuchten Plasmaquellen des INP und IGB.

Dabei stellte sich heraus, dass die Verwendung einer dielektrisch behinderten Entladung vorzugsweise für die Innendekontamination geeignet ist. Durch die im Projekt

erarbeitete Prozessführung unter Verwendung einer Innenelektrode, ist die biologische Dekontamination von kommerziell erhältlichen Endoskopen möglich und prinzipiell in einen Aufbereitungsprozess integrierbar. Um diese Integrierbarkeit zu demonstrieren, wurde im Rahmen dieses Projektes ein spezieller Arbeitskanal-Treater erarbeitet. Dieser Treater stellt eine Möglichkeit dar, die Arbeitskanäle mehrerer flexibler Endoskope parallel zu dekontaminieren. Die Vorteile der Verwendung einer DBE sind die einfache Applizierung in Endoskopen, die hervorragende Wirksamkeit hinsichtlich der Inaktivierung von Mikroorganismen und die gute Wirtschaftlichkeit der Entladung bezüglich verwendeter Gasflüsse und elektrischer Leistung zum Zünden sowie zur Aufrechterhaltung der Entladung.

Nachteilig ist dabei die Wechselwirkung der Entladung mit der Oberfläche. Es hat sich gezeigt, dass eine direkte Plasmabehandlung Materialerosion hervorruft. Im Rahmen des Projektes konnten jedoch eine Vielzahl verschiedener Konzepte erarbeitet werden, um dieser Materialerosion entgegen zu wirken.

Die Verwendung einer Mikrowellenentladung zeigt sich vorteilhaft bei der Komplettsterilisation von Endoskopen. So konnte am INP eine inaktivierende Wirkung sowohl auf der Außenseite als auch auf der Innenseite von Endoskop-Modellkörpern gezeigt werden. Aufgrund der Verwendung eines plasmaaktivierten Prozessgases lässt sich eine solche Plasmaquelle vergleichsweise einfach in einen Aufbereitungsprozess integrieren.

Während der Projektzeit wurde dazu in Kooperation mit WEBECO ein Demonstrator erarbeitet, der die grundsätzliche Machbarkeit einer Integration gezeigt hat. Der Vorteil der Mikrowellen-angeregten Entladung liegt in ihrer einfachen Applizierung an die komplexe Geometrie von Endoskopen. Durch spezielle Prozessführungstechniken ist es

möglich, dass plasmaaktivierte Prozessgas in die Lumen und Kavitäten von flexiblen Endoskopen zu leiten und dort eine hohe Inaktivierungsrate zu erhalten. Ein weiterer Vorteil besteht in der Verwendung von Luft als Betriebsgas für die Entladung. Es müssen daher keine teuren Edelgase oder ähnliches zur Verfügung gestellt werden. Durch geeignete Prozessführung in entsprechenden Prozesskammern ist auch die benötigte elektrische Leistung für den Betrieb dieser Entladungstypen moderat.

Zusammenfassend lässt sich aus der Sicht des INP Greifswald e.V. feststellen, dass Plasmaverfahren ein hohes Potenzial als Ergänzung oder sogar als Ersatz für herkömmliche Sterilisationsverfahren gezeigt haben. Wenn die ablaufenden Prozesse im Plasma, in Wechselwirkung mit den Mikroorganismen und die Wechselwirkung mit den Materialien ausreichend verstanden sind, dann wäre der Einsatz von Plasmen in der Aufbereitung von Medizinprodukten aus Sicht der industriellen Projektpartner durchaus denkbar.

5. Literatur

- [1] AWMF - Arbeitskreis Krankenhaus- und Praxishygiene der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften. *Hygiene in Klinik und Praxis*. MHPVerlag, Wiesbaden, **2004**.
- [2] N. Ghassemieh, M. Kraft, R. Schrödel. *Deutsche Zeitschrift für Klinische Forschung* **2002**, 1/2:14-18.
- [3] R. Schrödel. *Frankfurter Allgemeine Zeitung*, Sonderbeilage Hauptstadtkongreß, 10. Mai, **2006**.
- [4] RKI. *Hyg. Med.* **2001**, 26:488-499.
- [5] Bader L. Hygiene beim Endoskopieren – schon alles bestens? 8. Internationaler Kongress der Deutschen Gesellschaft für Krankenhaushygiene (DGKH), Berlin, 2.-5. 4. 2006, *Hyg. Med.* **2006**; 31, Suppl. 1, 24
- [6] Darbord JC. *J. Hosp. Infect.* **2004**; 56: 40-43
- [7] Heeg P. *J Hosp Infect* **2004**; 56: 23-26
- [8] Kampf G. Was macht die Aufbereitung flexibler Endoskope wirkungsvoll? 8. Internationaler Kongress der Deutschen Gesellschaft für Krankenhaushygiene (DGKH), Berlin, 2.-5. 4. 2006, *Hyg. Med.* **2006**; 31, Suppl.1, 24
- [9] Heudorf U, Exner M. *J Hosp Infect* **2006**; 64: 69-75
- [10] Bertram J, Mielke M, Beekes M, Lemmer K, Baier M, Pauli G. *Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz* **2004**; 47: 36-40
- [11] Murdoch H, Taylor D, Dickinson J, Walker JT, Perrett D, Raven NDH, Sutton JM. *J. Hosp. Infect.* **2006**; 63: 432-438
- [12] Kramer M. Überprüfung der Materialverträglichkeit flexibler Endoskope mit Reinigungs- und Desinfektionsmitteln. 8. Internationaler Kongress der Deutschen Gesellschaft für Krankenhaushygiene (DGKH), Berlin, 2.-5. 4. 2006, *Hyg. Med.* **2006**; 31, Suppl.1, 25
- [13] Okpara-Hofmann J, Knoll M, Dürr M, Schmitt B, Borneff-Lipp M. *J. Hosp. Infect.* **2005**; 59: 280-285
- [14] Martiny H, Floss H, Zühlsdorf B. *J. Hosp. Infect.* **2004**; 56: 16-22
- [15] Lerouge S, Wertheimer MR, Yahia L`H. *Plasma and Polymers* **2001**; 6: 175-188

- [16] Laroussi M. *Plasma Process Polym.* **2005**; 2: 391-400
- [17] Laroussi M. *IEEE Transactions on Plasma Science* **2002**; 30: 1409-1415
- [18] Moisan M, Barbeau J, Moreau S, Pelletier J, Tabrizian M, Yahia L`H. *Int. J. Pharm.* **2001**; 26: 1-21
- [19] Stoffels E. *Contrib. Plasma Phys.* **2007**; 47, 1-2: 40 – 48
- [20] Foest R, Schmidt M, Becker K. *Int. Journal of Mass Spectrometry* **2006**; 248: 87-102
- [21] Stoffels E, Flikweert AJ, Stoffels WW, Kroesen GMW. *Plasma Sources Sci Technol.* **2002**; 11: 383-388
- [22] Laroussi M, Lu X. *Appl. Phys. Lett.* **2005**; 87: 113902
- [23] Hopwood JA. *Journal of Microelectromechanical Systems* **2000**; 9: 309-313
- [24] Guchardi R, Hauser PC. *Journal of Analytical Atom Spectrometry* **2003**; 18: 1056-1059
- [25] Kadoski M, Yoshizawa H, Mori S, Suzuki M. *Thin Solid Films* **2006**; 506-507: 123-127
- [26] T. Sato, O. Furuya, K. Ikeda, T. Nakatani. *Plasma Process. Polym.* **2008**, 5, 606
- [27] H. Eto, Y. Ono, A. Ogino, M. Nagatsu, *Plasma Process. Polym.* **2008**, 5, 269-274
- [28] O. Leiß, *Hyg. Med.* **2002**, 27, 285-296
- [29] W. A. Rutala, D. J. Weber, *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **1999**, 20, 69-76
- [30] W. A. Rutala, D. J. Weber, *Emerg. Infect. Dis.* **2001**, 7, 348-353
- [31] M. Ruddy, C. C. Kibbler, *J. Hosp. Infect.* **2002**, 50, 261-268
- [32] J. Ehlbeck, U. Schnabel, M. Polak, J. Winter, T. von Woedtke, R. Brandenburg, T. von dem Hagen, K.-D. Weltmann, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **2011**; 44, 18
- [33] A.-M. Pointu, A. Ricard, E. Odic, M. Ganciu, *Plasma Process. Polym.* **2008**, 5, 559-568
- [34] E. Robert, E. Barbosa, S. Dozias, M. Vandamme, C. Cachoncinlle, R. Viladrosa, J. M. Pouvesle, *Plasma Process. Polym.* **2009**, 6, 795-802

- [35] R. Brandenburg, H. Lange, T. von Woedkte, M. Stieber, E. Kindel, J. Ehlbeck, K.-D. Weltmann, *IEEE Trans. Plasma Sci.* **2009**, *37*, 877-883
- [36] S. Kubodera, M. Honda, M. Kitahara, J. Kawanaka, W. Sasaki, K. Kurosawa, *Jpn. J. Appl. Phys.* **1995**, *34*, L618-L620
- [37] E. B. Saloman, *J. Phys. Chem. Ref. Data*, **2010**, *39*, 033101, 162p
- [38] N. Masoud, K. Martus, K. Becker, *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **2005**, *38*, 1674-1683
- [39] N. Merbahi, N. Sewraj, F. Marchal, Y. Salamero, P. Millet, *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **2004**, *37*, 1664-1678
- [40] F. Fanelli, *Plasma Process. Polym.* **2009**, *6*, 547-554
- [41] A. Rahman, A. P. Yalin, V. Surla, O. Stan, K. Hoshimiya, Z. Yu, E. Littlefield, G. J. Collins, *Plasma Sources Sci. Technol.*, **2004**, *13*, 537-547
- [42] R. Bussiahn, R. Brandenburg, T. Gerling, E. Kindel, H. Lange, N. Lembke, K.-D. Weltmann, Th. von Woedkte, T. Kocher, *Appl. Phys. Lett.* **2010**, *96*, 143701
- [43] M. Polak, J. Winter, U. Schnabel, J. Ehlbeck, K.-D. Weltmann, *Plasma Process. Polym.* **2011**, *8*: (published online) DOI: 10.1002/ppap.201000163
- [44] K.-D. Weltmann, Th. von Woedkte, *IEEE Trans. Plasma Sci.* **2011**, *39*, 1015-1025
- [45] T. Maucher, U. Schnabel, W. Volkwein, J. Köhnlein, J. Winter, K.-D. Weltmann, I. Trick, C. Oehr, *Plasma Process. Polym.* **2011**, *8*, 200-207
- [46] U. Schnabel, T. Maucher, J. Köhnlein, W. Volkwein, R. Niquet, I. Trick, M. Stieber, M. Müller, H.-P. Werner, J. Ehlbeck, C. Oehr, K.-D. Weltmann, *Plasma Process. Polym.* **2011**, *8*, (published online) DOI: 10.1002/ppap.201000206