

Diplomarbeit

**Sensortechnik in der Reproduktionsmedizin
Analyse von Kulturbedingungen durch optische Nadelsensoren**

Eingereicht von

Christian Neugebauer

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt am

Das Kinderwunschinstitut Schenk GmbH

Am Sendergrund 11

A-8143

unter der Anleitung von

ao.Univ.-Prof. Mag. Dr.rer.nat. Dr.scient.med. Erwin Petek

Dr. med. univ. Michael Schenk, MAS

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Leibnitz, am 27.05.2021

Christian Neugebauer eh

Danksagungen

An dieser Stelle ist es mir ein großes Anliegen, jenen Personen meinen persönlichen Dank auszurichten, die mich nicht nur in der Zeit der Erstellung dieser Diplomarbeit, sondern auch während des gesamten Studiums auf verschiedene Weise unterstützt haben.

Allen voran möchte ich mich herzlichst beim Team des Kinderwunschinstitutes Dr. Schenk und dabei bei vor allem bei Dr. med. univ. Michael Schenk für die Betreuung, die Hilfsbereitschaft bei Problemen sowie die Bereitstellung von Material und Räumlichkeiten bedanken. Im Speziellen möchte ich mich nicht nur für die Betreuung der Diplomarbeit, sondern auch für das Wecken des Interesses an der Frauenheilkunde bedanken.

Ich bedanke mich auch bei Ao.Univ.-Prof. Mag. Dr. Dr. Erwin Petek für die Betreuung und die Unterstützung.

Genauso gilt mein Dank dem Institut für Analytische Chemie und Lebensmittelchemie der Technischen Universität Graz mit Univ.-Prof. Dipl.-Chem. Dr.rer.nat. Ingo Klimant für die Bereitstellung und Erläuterung der verwendeten Sonden und die Unterstützung bei den durchgeführten Messungen.

Letztendlich möchte ich mich bei den wichtigsten Personen für die Unterstützung und die Geduld in schwierigen Phasen bedanken – meiner Familie. Sie haben sowohl durch wichtige Ratschläge, viel Motivation und Humor an der Erstellung dieser Diplomarbeit beigetragen, als auch während des gesamten Studiums ein offenes Ohr für Probleme und viel Verständnis während kleinerer (oder größerer) Nervenzusammenbrüche.

Inhaltsverzeichnis

Danksagungen	ii
Inhaltsverzeichnis	iii
Glossar und Abkürzungen	v
Abbildungsverzeichnis	vii
Tabellenverzeichnis	ix
Zusammenfassung	x
Abstract.....	xii
1 Einleitung	14
1.1 Optische (Lumineszenz-basierte) Sensoren.....	14
1.1.1 Fluoreszenz und Phosphoreszenz	14
1.1.2 Fluoreszenzlöschung	17
1.1.3 Faseroptische Fluoreszenzsensoren (Optroden)	17
1.2 Desinfektion und Sterilisation	19
1.2.1 Definition und Grundlagen.....	19
1.2.2 Methoden der Sterilisation	21
1.2.3 Desinfektionsmethoden	25
1.3 Embryokultur	37
1.3.1 Kulturprinzipen.....	37
1.3.2 Zusammensetzung von Embryokulturmedien.....	39
1.3.3 Sauerstoffreduktion	41
1.3.4 Ölschicht.....	42
2 Material und Methoden	44
2.1 Desinfektion und Sterilisation optischer Sonden.....	44
2.1.1 Desinfektion und Sterilisation optischer Sauerstoffsonden.....	44
2.1.2 Desinfektion und Sterilisation optischer Temperatursonden	45
2.2 Sauerstoffmessungen in Kulturmedien mit und ohne Ölschicht	46
3 Ergebnisse – Resultate.....	47
3.1 Desinfektion und Sterilisation optischer Sonden.....	47
3.1.1 Wasser (Referenzmessung)	47
3.1.2 Ethanol (96 %).....	48
3.1.3 Wasserstoffperoxid 3 %.....	48
3.1.4 Wasserstoffperoxid 15 %.....	49
3.1.5 Wasserstoffperoxid 30 %.....	50
3.1.6 1-Propanol (60 %)	50
3.1.7 2-Propanol (60 %)	51
3.1.8 Peroxyessigsäure (0,5 %)	52

3.1.9	Natriumhypochlorit (5 %)	52
3.1.10	Glutaraldehyd (3 %)	53
3.1.11	Triclosan (2 %)	54
3.1.12	Chloramin T (1 %)	54
3.1.13	CTAB (10 %)	55
3.1.14	2-Phenylphenol (4 %)	56
3.1.15	Wasserdampfsterilisation	56
3.2	Desinfektion und Sterilisation optischer Temperatursonden	58
3.3	Sauerstoffmessungen in Kulturmedien mit und ohne Ölschicht	59
4	Diskussion	61
4.1	Desinfektion und Sterilisation optischer Sonden	61
4.2	Embryokulturmedien mit und ohne Mineralölschicht und dessen Auswirkungen auf das Sauerstoffverhalten	63
5	Literaturverzeichnis	67

Glossar und Abkürzungen

CDC	Centers for Disease Control and Prevention
D	Dublett
EO	Ethylenoxid
F	Intensität der Fluoreszenz in Anwesenheit eines Quenchers
F ₀	Intensität der Fluoreszenz in Abwesenheit eines Quenchers
HOMO	highest occupied molecular orbital
IC	internal conversion
ICM	inner cell mass
ICSI	Intrazytoplasmatische Spermieninjektion
IL-1	Interleukin-1
ISC	Intersystemcrossing
IVF	In-vitro-Fertilisation
K _D	Stern-Volmer-Konstante
k _q	bimolekulare Quenchingkonstante
LPS	Lipopolysaccharid
LUMO	lowest unoccupied molecular orbital
mosmol/kg	Osmolalität
m _s	Magnetische Spinquantenzahl
φ	Phasenverschiebung
ÖGHMP	Österreichischen Gesellschaft für Hygiene, Mikrobiologie und Präventivmedizin
ÖGSV	Österreichischen Gesellschaft für Sterilgutversorgung
Q	Quencher
QAV	Quartäre Ammoniumverbindung
RKI	Robert Koch Institut
ROS	reactive oxygen species
S	Singulett
T	Triplett

TNF- α	Tumornekrosefaktor
τ_0	Lebenszeit des Fluorophors in Abwesenheit eines Quenchers
VAH	Verbund für angewandte Hygiene

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Jablonski-Diagramm.....	16
Abbildung 2 Risikobewertung und Einstufung von Medizinprodukten vor der Aufbereitung	21
Abbildung 3 Resistenzstufen von Mikroorganismen gegenüber feuchter Hitze.....	22
Abbildung 4 Ethanol, N-Propanol und Isopropanol.....	26
Abbildung 5 Formaldehyd und Glutaraldehyd.....	28
Abbildung 6 Strukturformel von Phenol.....	30
Abbildung 7 Peroxyessigsäure.....	33
Abbildung 8 Grundstruktur von Quartären Ammoniumverbindungen.....	35
Abbildung 9 Änderung der Intensität und des Phasenwinkels aufgrund der "Desinfektion" mit Wasser.....	47
Abbildung 10 Änderung der Intensität und des Phasenwinkels aufgrund der Desinfektion mit 96 prozentigem Ethanol.....	48
Abbildung 11 Änderung der Intensität und des Phasenwinkels aufgrund der Desinfektion mit 3 prozentigem Wasserstoffperoxid.....	49
Abbildung 12 Änderung der Intensität und des Phasenwinkels aufgrund der Desinfektion mit 15 prozentigem Wasserstoffperoxid.....	49
Abbildung 13 Änderung der Intensität und des Phasenwinkels aufgrund der Desinfektion mit 30 prozentigem Wasserstoffperoxid.....	50
Abbildung 14 Änderung der Intensität und des Phasenwinkels aufgrund der Desinfektion mit 60 prozentigem 1-Propanol.....	51
Abbildung 15 Änderung der Intensität und des Phasenwinkels aufgrund der Desinfektion mit 60 prozentigem 2-Propanol.....	51
Abbildung 16 Änderung der Intensität und des Phasenwinkels aufgrund der Desinfektion mit 0,5 prozentiger Peroxyessigsäure.....	52
Abbildung 17 Änderung der Intensität und des Phasenwinkels aufgrund der Desinfektion mit 5 prozentigem Natriumhypochlorit.....	53
Abbildung 18 Änderung der Intensität und des Phasenwinkels aufgrund der Desinfektion mit 3 prozentigem Glutaraldehyd.....	53
Abbildung 19 Änderung der Intensität und des Phasenwinkels aufgrund der Desinfektion mit 2 prozentigem Triclosan.....	54
Abbildung 20 Änderung der Intensität und des Phasenwinkels aufgrund der Desinfektion mit 1 prozentigem Chloramin T.....	55

Abbildung 21 Änderung der Intensität und des Phasenwinkels aufgrund der Desinfektion mit 10 prozentigem CTAB	55
Abbildung 22 Änderung der Intensität und des Phasenwinkels aufgrund der Desinfektion mit 4 prozentigem 2-Phenylphenol	56
Abbildung 23 Änderung der Intensität und des Phasenwinkels optischer Sauerstoffsonden mit kurzem Kabel infolge der Heißdampfsterilisation im Autoklav	57
Abbildung 24 Änderung der Intensität und des Phasenwinkels optischer Sauerstoffsonden mit langem Kabel infolge der Heißdampfsterilisation im Autoklav	57
Abbildung 25 Temperaturdifferenz zur extern gemessenen Temperatur und Änderung der Intensität aufgrund der „Desinfektion“ mit Wasser	58
Abbildung 26 Vergleich der Änderung der Sauerstoffkonzentration in einem Embryokulturmedium bei Vorhandensein einer Mineralölschicht und ohne Mineralölschicht	59
Abbildung 27 Vergleich der Änderung der Sauerstoffkonzentration in einem Embryokulturmedium bei Vorhandensein einer Mineralölschicht und ohne Mineralölschicht während der ersten 10 Minuten nach Entnahme aus dem Inkubator.....	59
Abbildung 28 Änderung der Sauerstoffkonzentration in einem Embryokulturmedium bei Vorhandensein einer Mineralölschicht (Einzelmessung)	60
Abbildung 29 Änderung der Sauerstoffkonzentration in einem Embryokulturmedium ohne Vorhandensein einer Mineralölschicht (Einzelmessung)	60

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Erklärung der folgenden Begriffe.....	47
Tabelle 2 Referenzmessung mit Wasser.....	47
Tabelle 3 Desinfektion mit Ethanol (96%).....	48
Tabelle 4 Desinfektion mit Wasserstoffperoxid (3%).....	48
Tabelle 5 Desinfektion mit Wasserstoffperoxid (15%).....	49
Tabelle 6 Desinfektion mit Wasserstoffperoxid (30%).....	50
Tabelle 7 Desinfektion mit 1-Propanol (60%)	50
Tabelle 8 Desinfektion mit 2-Propanol (60%)	51
Tabelle 9 Desinfektion mit Peroxyessigsäure (0,5%)	52
Tabelle 10 Desinfektion mit Natriumhypochlorit (5%)	52
Tabelle 11 Desinfektion mit Glutaraldehyd (3%)	53
Tabelle 12 Desinfektion mit Triclosan (2%)	54
Tabelle 13 Desinfektion mit Chloramin T (1%).....	54
Tabelle 14 Desinfektion mit CTAB (10%).....	55
Tabelle 15 Desinfektion mit 2-Phenylphenol (4%).....	56
Tabelle 16 Heißdampfsterilisation im Autoklav	56

Zusammenfassung

Einleitung

In der Reproduktionsmedizin ist besonders die Kultur unter Sauerstoffreduktion essenziell für den Erfolg der Behandlung. Ölschichten über microdrop-Kulturen werden vor allem aufgrund der Evaporation von Kulturmedium und zur Stabilisierung des pH-Wertes verwendet. Der Einfluss einer Mineralölschicht in Bezug auf die Sauerstoffkonzentration in der Embryokultur wurde bisher wenig untersucht. Für die Analyse der Sauerstoffkonzentration und anderen Kulturbedingungen in der Embryokultur sind optische Nadelsonden aufgrund einer dynamischen Messung und den minimalen Eingriff in das Medium optimal geeignet.

Aufgrund der Verwendung dieser Sonden als medizinisches Produkt in diesem Zusammenhang muss eine Aufbereitung gewährleistet sein, ohne die Funktion oder die Lebensdauer einzuschränken, weshalb zunächst ermittelt wird, ob eine Desinfektion mit ausgewählten Desinfektionsmitteln und eine Sterilisation durch Wasserdampf einen Einfluss auf optische Sauerstoff- und Temperatursensoren haben. In dieser Arbeit sollen deshalb die Möglichkeiten der Aufbereitung optischer Sensoren beleuchtet und die Anwendung der Sonden in der Reproduktionsmedizin getestet werden.

Material und Methoden

Die Änderungen des Phasenwinkels ($d\phi$) und der Intensität optischer O_2 - und Temperatursensoren wurden infolge einer Desinfektion und der Wasserdampfsterilisation untersucht. Im zweiten Schritt wurde der Unterschied in der Sauerstoffanreicherung im Kulturmedium nach der Entnahme aus der O_2 -Reduktion (im Inkubator) zwischen Embryokulturmedien mit und ohne Ölschicht untersucht.

Ergebnisse

Unter den untersuchten Desinfektionsmitteln konnte lediglich bei Peroxyessigsäure ein negativer Effekt auf $d\phi$ bzw. eine Reduktion der Intensität optischer O_2 -Sensoren festgestellt werden. Bei der Wasserdampfsterilisation wurde bei Sonden mit kurzem Lichtleiterkabel eine Reduktion der Intensität gemessen.

Bei der O_2 -Messung in Embryokulturmedien mit und ohne Ölschicht konnte ein deutlicher Unterschied in der O_2 -Anreicherung dargestellt werden. Zehn Minuten nach der Entnahme aus dem Inkubator wurde mit Ölschicht eine O_2 -Konzentration von 3,412 mg/L (\pm 50,40 %

des Maximums) gemessen, während ohne Ölschicht bereits eine Konzentration von 5,104 mg/L (\cong 75,40 %) festgemacht wurde.

Conclusio

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein Großteil der Aufbereitungsmethoden ohne negative Folgen für optische Sauerstoffsonden durchgeführt werden können. Darunter fallen die Behandlung der meisten gängigen Desinfektionsmittel (Peroxyessigsäure ausgenommen) sowie die Wasserdampfsterilisation.

Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass eine Mineralölschicht die reduzierte Sauerstoffkonzentration in Embryokulturen nach der Entnahme aus der Inkubation länger aufrechterhalten kann. Diese Messergebnisse stimmen mit den Ergebnissen mehrerer Studien überein und resultieren aus einer verminderten Sauerstoffdiffusion durch die Ölschicht.

Abstract

Introduction

In assisted reproductive technology, especially the embryo culture with low oxygen concentration is essential for the outcome of the treatment. In general, oil layers over microdrop cultures have been used to prevent evaporation of culture medium and to stabilize its pH value. However, the influence of a mineral oil layer on the oxygen concentration in embryo culture hardly has been examined so far. For the analysis of the oxygen concentration and other culture conditions of embryo culture, optical needle probes are ideally suited due to their ability of dynamic measurement and the minimal intervention in the medium.

As these probes are used as medical products, washing, disinfection and sterilization has to be ensured without impairing their functions or lifespan. Therefore, in this thesis, it will be determined whether disinfection (with selected disinfectants) and sterilization (moist heat sterilization) have any effect on optical oxygen and temperature sensors. The aim of this thesis is to evaluate various possibilities of preparing optical sensors. In addition, the application of optical needle probes in reproductive medicine will be examined.

Material and methods

The changes in the angular phase shift ($d\phi$) and intensity of optical O_2 and temperature sensors as a result of disinfection and steam sterilization have been investigated. In the second step, it has been assessed if there is a difference in the oxygenation of the culture medium between embryo culture media with and without an oil layer after the removal from the incubator.

Results

Among the disinfectants examined, a negative effect on $d\phi$ or a reduction of the intensity of optical O_2 sensors could be found only with peracetic acid. In the case of hot steam sterilization, a reduction in intensity was measured for probes with a shorter fiber optic cable. When measuring O_2 in embryo culture media with and without an oil layer, a clear difference in O_2 accumulation could be determined. Ten minutes after the removal from the incubator, an O_2 concentration of 3.412 mg/L (\cong 50.40 % of the maximum value) was measured with oil layer, while a concentration of 5.104 mg / L (\cong 75.40 %) was detected in embryo culture without oil layer.

Conclusion

The findings of this thesis suggest that the majority of preparation methods can be carried out without negative consequences for optical oxygen probes. This includes the treatment of most common disinfectants (with the exception of peracetic acid) and hot steam sterilization. Moreover, it could be demonstrated that a mineral oil layer can maintain the reduced oxygen concentration in embryo cultures for a longer period after removal from the incubation. These measurement results go along with the findings of several studies and result from reduced oxygen diffusion through the oil layer.

1 Einleitung

1.1 Optische (Lumineszenz-basierte) Sensoren

Die in dieser Arbeit verwendeten Sensoren funktionieren auf Basis der Fluoreszenz- bzw. Phosphoreszenzspektroskopie und im engeren Sinne auf dem Phänomen der Fluoreszenzauslöschung. In diesem Kapitel werden die grundlegenden Mechanismen und Prinzipien dieser Phänomene beschrieben, um einen Überblick über die Funktionsweise der verwendeten Sensoren zu übermitteln.

1.1.1 Fluoreszenz und Phosphoreszenz

Die Phänomene der Fluoreszenz und Phosphoreszenz werden in der Fluoreszenzspektroskopie eingesetzt und sind eine mögliche Anwendungsart der Spektroskopie. Darunter fallen alle Methoden, die Strahlung anhand ihrer Eigenschaften (Wellenlänge, Energie, etc.) zerlegen und qualitativ und quantitativ analysieren. Grundsätzlich wird dabei der Analyt (der zu messende Stoff) durch elektromagnetische Strahlung „angeregt“. Beim Rückgang in den Grundzustand wird wiederum Energie (unter anderem in Form von elektromagnetischer Strahlung) freigesetzt und dadurch messbar gemacht (1,2).

1.1.1.1 Anregung von Elektronen

Bei der Anregung eines Atoms durch elektromagnetische Strahlung (einem Photon) können unterschiedliche Vorgänge beobachtet werden, die von der Energie der absorbierten Strahlung abhängig sind. Grundsätzlich wird bei der Absorption des Photons der Energiegehalt des Atoms gesteigert. Langwellige Strahlung (das heißt niederer Energie) wie die von Radiowellen bewirkt allenfalls eine Spin-Änderung im Atomkern. Kurzwellige Mikrowellenstrahlung versetzt ein Atom bei Absorption in eine Rotationbewegung während die bereits etwas energiereichere Infrarotstrahlung molekulinterne Vibrationen herbeiführt. Elektromagnetische Strahlung im Bereich des sichtbaren Lichts (Wellenlänge zwischen 380 und 780 nm) bewirken bereits, dass Elektronen aus einem günstigerem (niedrigerem) Orbital in ein energetisch höheres (ungünstigeres) Orbital versetzt werden. Man spricht in diesem Fall von einem „angeregten Zustand“. Ebenso versetzt kurzwelligere Röntgenstrahlung Elektronen in ein energetisch höheres Orbital, dies gilt nicht nur für Valenzelektronen, sondern auch für Atomkern-nahe Rumpfelektronen. Der hohe Energiegehalt von äußerst kurzwelliger γ -Strahlung reicht aus, um kovalente Bindungen zu zerstören, weshalb es nur wenige Anwendungen in der Spektroskopie mittels γ -Strahlung gibt.

In der Fluoreszenzspektroskopie wird der Analyt mit sichtbarem Licht bzw. mit etwas energiereicherer UV-Strahlung angeregt. Bei der Absorption eines Photons wird die Energie dabei auf das Molekül übertragen und der Energiegehalt steigt um den Betrag der Energie des Photons. Wie bereits beschrieben basiert diese Spektroskopie-Methode auf der Tatsache, dass die Energieaufnahme dazu führt, dass Valenzelektronen aus ihrem energetisch ungünstigsten noch besetzten Molekülorbital (HOMO – „highest occupied molecular orbital“) in das energetisch nächsthöhere Molekülorbital „gehoben“ werden (LUMO – „lowest unoccupied molecular orbital“) und sich damit in einem energetisch ungünstigerem Zustand befinden. Energiereichere Strahlung kann jene Elektronen auch in energetisch noch ungünstigere Zustände anregen; die Zustände werden dann als LUMO+1, LUMO+2, etc. bezeichnet. Neben der Anregung durch den Wechsel in höhere Orbitale spielt jedoch auch der Elektronenspin eine Rolle, da er sich bei der Absorption von Photonen ändern kann. Grundsätzlich können Elektronen zwei Spin-Werte annehmen: eine positive ($m_s = +1/2$ bzw. (\uparrow)) und eine negative magnetische Spinquantenzahl ($m_s = -1/2$ bzw. (\downarrow)). 1-Elektronen-Systeme können dabei zwei Werte (positiv und negativ) annehmen und werden demnach als Dublett (D) bezeichnet. Mehrelektronensysteme im gleichen Orbital können nur den Spinzustand $(\uparrow\downarrow)$ annehmen, sie werden daher als Singulett (S) bezeichnet. Befinden sich die Elektronen in unterschiedlichen Orbitalen sind die Varianten $(\uparrow)(\uparrow)$, $(\uparrow)(\downarrow)$ und $(\downarrow)(\downarrow)$ möglich (Reihenfolge: von energetisch günstig zu ungünstig) und werden demnach Triplett (T) genannt. Diese Zustände werden als Multiplicitätszustände bezeichnet.

Der Grundzustand eines Elektrons wird als (im Falle eines Singuletts) S_0 bezeichnet, der angeregte Zustand als S_1 . Zusätzlich zu dieser Anregung geschieht ebenso eine Anregung in Form eines höheren Vibrations/Rotations-Niveaus; der Zustand wird S_1^* oder S_1^{**} (je nach Höhe der Vib./Rot.-Anregung) genannt (1,2).

1.1.1.2 Energieabgabe

Da Systeme grundsätzlich den niedrigsten Energiezustand anstreben, geben Elektronen die oben beschriebene absorbierte Energie wieder ab. Die Energieabgabe kann dabei auf verschiedene Weisen erfolgen. Grundsätzlich stehen dem Elektron mehrere Möglichkeiten offen, von denen zwei am häufigsten beobachtet werden: Die Abgabe elektromagnetischer Strahlung in Form eines Photons, das sich als Emissionsspektrum messen lässt und der strahlungslose Übergang durch Wärmeabgabe. Die Wärmeabgabe erfolgt durch die spontane Abgabe der Vib./Rot.-Energie ($S_1^* \rightarrow S_1$). Der elektromagnetisch angeregte Zustand S_1 kehrt anschließend durch die Abgabe eines Photons in den Grundzustand S_0 zurück. Der

Energiegehalt des Photons ist dann jedoch geringer als beim „Anregungs-Photon“, da ein Teil der absorbierten Energie in Form von Wärme abgegeben wurde; die Wellenlänge nimmt also zu. Dieses Phänomen der Emission von Strahlung höherer Wellenlänge im Vergleich zu der Anregungs-Strahlung wird als Fluoreszenz bezeichnet.

Besitzt der Grundzustand eines Elektrons bereits eine starke Vib./Rot.-Anregung (S_0^{***}), kann dieses das gleiche Niveau wie ein angeregtes Elektron besitzen (S_1). Dabei kann es zum strahlungslosen Übergang $S_0^{***} \rightarrow S_1$ kommen, was man als interne Konversion (IC – internal conversion) bezeichnet. Die letzte Möglichkeit der Energieabgabe wird als „Intersystemcrossing“ (ISC) bezeichnet. Dabei wechselt das angeregte System S_1 den Spinzustand und ändert damit seinen Multiplicitätszustand. Die Energie kann schließlich durch ein weiteres ISC zu S_0^{***} oder direkt durch die Emission eines deutlich längerwelligen Photons abgegeben werden. Diese Emission versteht man als Phosphoreszenz. Die Tatsache, dass die emittierte Welle im Vergleich zur Anregungsstrahlung eine größere Wellenlänge zeigt, also von geringerer Energie ist, wird „Stokes-Verschiebung“ (engl. Stokes-Shift) genannt (1–3).

Zusammengefasst lassen sich die genannten Vorgänge der Energieabgabe im so genannten „Jablonski-Diagramm“ (Abbildung 1) graphisch dargestellt:

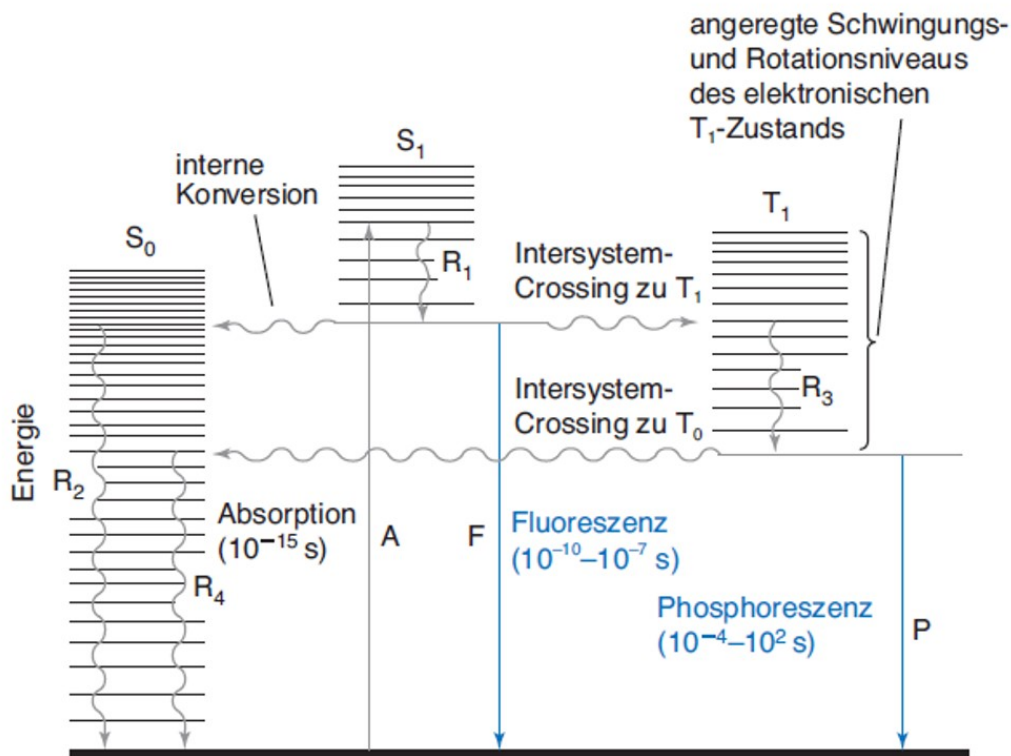


Abbildung 1 Jablonski-Diagramm (adaptiert von Harris 2014 (2))

1.1.2 Fluoreszenzlöschung

Die Intensität der vom Fluorophor (des zu Fluoreszenz fähigen Stoffes) emittierten Strahlung ist zum einen abhängig von der Intensität der Anregungsstrahlung und zum anderen von einer Vielzahl weiterer Faktoren, denen gemein ist, dass sie die Intensität vermindern und damit die sogenannte Quantenausbeute (pro Sekunde emittierte Photonen durch pro Sekunde absorbierte Photonen) vermindern. Einer dieser Faktoren ist die Fluoreszenzlöschung (engl. quenching). Dabei gibt es verschiedene Mechanismen des quenching, wovon eine das dynamische quenching ist. Es kommt dabei zu einer Kollision des angeregten Fluorophors mit dem Quencher-molekül, was bewirkt, dass der Fluorophor seine Anregung strahlungslos verliert und die Energie auf den Quencher abgibt und diesen somit um den gleichen Energiebetrag anregt. Eine Vielzahl an Verbindungen kann als Quencher fungieren; darunter fallen Sauerstoff, Halogene, Amine und Akrylamide. Über das Ausmaß der Fluoreszenzlöschung kann direkt auf die Konzentration des Quenchers geschlossen werden. Die Stern-Volmer-Gleichung stellt den Zusammenhang zwischen dem Quotient aus den Intensitäten in Abwesenheit (F_0) und in Anwesenheit (F) eines quenchers, der Stern-Volmer-Konstante (K_D) und der Konzentration des quenchers $[Q]$ dar. „ k_q “ und „ τ_0 “ bezeichnen die bimolekulare Quenchingkonstante beziehungsweise die Lebenszeit des Fluorophors in Abwesenheit eines Quenchers.

Stern-Volmer-Gleichung:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_D [Q]$$

Neben dem dynamischen gibt es weiters das statische quenching. Fluorophore können mit Stoffen, die nicht zur Fluoreszenz fähig sind, Komplexe bilden und ihr eigenes Potenzial zur Fluoreszenz verlieren oder zumindest vermindern. Die Komplexbildung geschieht jedoch auch im Grundzustand des Fluorophors, wodurch keine Rückschlüsse auf die Konzentration des Quenchers getroffen werden kann (2,4).

1.1.3 Faseroptische Fluoreszenzsensoren (Optroden)

Der Vorteil von faseroptischen Fluoreszenzsensoren liegt an der Tatsache, dass sich der Fluorophor und damit die Anregung und die Fluoreszenz und dessen weitere Vorgänge (wie quenching) in örtlicher Distanz zum von der Quelle der Absorptionsstrahlung und zum Detektor der Emissionsstrahlung befindet. Die Anregungsstrahlung gelangt hierbei von der Quelle über eine optische Faser zum Fluorophor. Dieser liegt am Ende der Faser immobilisiert in einer Matrix und kann somit zum Analysemedium gebracht werden. Am anderen Ende der optischen Faser befindet sich der Detektor, der verschiedene

Eigenschaften der vom Fluorophor emittierten Strahlung messen kann. Der Detektor wandelt das optische in ein elektrisches Signal um und macht es digital darstellbar. Zu den messbaren Eigenschaften zählen die Intensität, das Anregungsspektrum, das Emissionsspektrum, die Polarisation der Emissionsstrahlung, die „Lebenszeit“ des Fluorophors im angeregten Zustand und die Phasenverschiebung zwischen Anregungs- und Emissionsstrahlung. In vielen Fällen wird die Anregungsstrahlung nicht konstant ausgestrahlt sondern mit abwechselnder Intensität (Sinuswellenartig mit Frequenzen im Bereich von 100 MHz). Die entsprechende Emission wird mit einer bestimmten zeitlichen Verzögerung ebenfalls sinuswellenartig detektiert. Die zeitliche Verzögerung wird als Phasenverschiebung (φ) bezeichnet. Diese Phasenverschiebung ist im Zuge dieser Arbeit besonders wichtig, da die gemessenen φ -Werte im Kapitel „2“ diese Phasenverschiebung darstellen.

Dynamisches Quenching (z.B. durch Sauerstoff) bewirkt in diesem Zusammenhang eine Abnahme der Intensität oder der Lebenszeit des Anregungszustandes (engl. lifetime) und damit verbunden eine kleinere Phasenverschiebung. Als Fluorophore zur Detektion eignen sich aufgrund einer besonders langen lifetime Metallkomplexe (z.B. mit Platin, Palladium oder Ruthenium) eingebettet in eine Silikonmatrix. Lange Anregungszeiten sind wichtig, da die angeregte Lebenszeit direkt proportional zum Ausmaß des quenching ist, sodass Zeiten im Bereich von 5 ns zu wenig quenching ermöglichen, um die Sauerstoffkonzentration der Luft zu detektieren. Optimierte Fluorophore haben eine Lebenszeit im angeregten Zustand (ohne quenching) von etwa 5 μ s, was zu einer ausgeprägten Löschung durch Luftsauerstoff führt. Dieser Sonden Aufbau ist zudem optimal, da zum einen Sauerstoff leicht durch das Silikon diffundiert und damit zum Fluorophor gelangt und andererseits andere Moleküle, die ebenfalls mit dem Fluorophor interagieren würden, aufgehalten werden. Durch eine Optimierung dieser Vorgänge ist es möglich, äußerst geringe Mengen des Analyten zu ermitteln (4–6).

1.2 Desinfektion und Sterilisation

1.2.1 Definition und Grundlagen

Desinfektions- und Sterilisationsverfahren dienen in der Medizin, Lebensmitteltechnologie und vielen weiteren Bereichen der Reduktion der Anzahl an Mikroorganismen auf Oberflächen, in Flüssigkeiten, aber auch auf der Haut oder an Schleimhäuten (7,8).

Als Desinfektion versteht man die systematische Reduktion der Keimzahl auf einem Objekt, einer Oberfläche oder auf biologischen Materialien (wie der Haut) um zumindest 5 log-Stufen (das heißt 5 Zehnerpotenzen). Das Ziel der Desinfektion ist es, eine Übertragung der abgezielten Mikroorganismen zu verhindern, also nicht die Entfernung aller Erreger, sondern Verhinderung einer Infektion durch Keimreduktion. Desinfektionsmittel und Desinfektionsverfahren haben verschiedenste Mikroorganismen wie Bakterien (vegetative Erreger), Pilze, Pilzsporen und Viren zum Ziel, wogegen die meisten Bakteriensporen aufgrund ihrer Unempfindlichkeit gegen Austrocknung, Hitze, Strahlung und Chemikalien gegen Desinfektionsverfahren resistent sind und die Inaktivierung jener der Sterilisation vorbehalten ist (7).

Der Begriff Sterilisation bezeichnet Verfahren, die alle vermehrungsfähigen Mikroorganismen irreversibel inaktivieren. Der Begriff „Keimfreiheit“ sollte jedoch auch hier nicht verwendet werden, da zum einen die anwesenden Erreger nicht entfernt werden, sondern abgetötet oder inaktiviert werden. Das bedeutet, dass die inaktivierten „Reste“ der Mikroorganismen auf den Oberflächen verbleiben. Die verbliebenen abgetöteten Bakterien und deren Stoffwechselprodukte (der Lipidanteil von Lipopolysaccharid (LPS), Peptidoglykan, Teichonsäuren und Lipoteichonsäuren aus der Zellwand) bezeichnet man als exogene Pyrogene. Diese können, wenn sie in größeren Mengen in den Körper gelangen, über eine Bindung an CD14 Rezeptoren und TOLL-like-Rezeptor 4 und 2 an Makrophagen eine TNF- α und IL-1 Ausschüttung verursachen und somit eine Entzündungsreaktion und Fieber auslösen. Aus diesem Grund reicht es nicht aus, dass Produkte und Materialien, die direkt oder indirekt in den Körper eingebracht werden (Implantate, Venenkatheter, Infusionslösungen, etc.), steril sind, sie müssen auch pyrogenfrei sein (7).

Zum anderen sollte der Begriff der Keimfreiheit nicht in Verbindung mit der Sterilisation verwendet werden, da die üblichen Sterilisationsverfahren nur die Sporen von humanpathogenen Erregern (zum Beispiel *Bazillus* spp. und Clostridien) inaktivieren, nicht jedoch jene von thermophilen Bakterienarten. Diese haben jedoch kaum medizinische Relevanz (8).

Welche der angeführten Verfahren und Techniken in der Praxis zum Einsatz kommen, hängt einerseits vom Verwendungszweck des zu sterilisierenden beziehungsweise zu desinfizierenden Gegenstandes ab, andererseits muss auch auf die Zusammensetzung des Gegenstandes und die vorhandenen Materialien Rücksicht genommen werden, da nicht alle Methoden für alle Materialien und Oberflächen geeignet sind (7,8).

Die relevanten Faktoren, die die Art der Sterilisation oder Desinfektion bestimmen, beziehungsweise, die ihre Effektivität beeinflussen, sind:

- vorherige Reinigung von makroskopischen Verunreinigungen,
- die Last an organischem und anorganischem Material,
- die Zusammensetzung der Mikroorganismen,
- die Konzentration und Einwirkzeit der verwendeten Sterilisations- oder Desinfektionsmethode,
- der Aufbau und die Oberflächen des Objektes,
- das Vorhandensein von Biofilmen sowie
- die Temperatur und der pH-Wert während des Vorgangs (9).

Ein weiterer wichtiger Faktor für die Auswahl der richtigen Methoden ist die Produktverträglichkeit der Materialien, für die im Falle von Medizinprodukten, der Hersteller die angemessenen und überprüften Verfahren angeben muss und in Folge dessen auch für die Verträglichkeit haftet. Medizinprodukte werden zusätzlich anhand einer Risikobewertung in drei Gruppen eingeteilt, für die angegeben ist, ob, wie oft und mit welcher Methode das Medizinprodukt aufbereitet werden muss und welche zusätzlichen Schritte (Vorbereitung, Nachbereitung) vonnöten sind. Wenn ein Produkt nicht zweifelsfrei einer Klasse zugeteilt werden kann, soll es der nächst höheren (kritischeren) Stufe zugeordnet werden. Für diese Einteilung hat die Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) beim Robert Koch-Institut (RKI) eine Tabelle (in Abbildung 2 dargestellt) zur Hilfe erstellt (10).

Tab. 1 Risikobewertung und Einstufung von Medizinprodukten vor der Aufbereitung						
Einstufung	Medizinprodukt	Vorbereitung	Reinigung und Desinfektion	Spez. Kennzeichnung	Sterilisation	Kritische Verfahrensschritte, Besondere Anforderungen
Unkritisch	z. B. EKG-Elektroden		X			
Semikritisch						
A) ohne besondere Anforderungen an die Aufbereitung	z. B. Spekulum	(X)	X		(X)	Desinfektion (Wirkungsbereich bakterizid (einschließlich Mykobakterien), fungizid und viruzid)
B) mit erhöhten Anforderungen an die Aufbereitung	z. B. Flexibles Endoskop (Gastroskop)	X ¹	X		(X ²)	Zusätzlich: s. entsprechende spez. Anlage Nr. 8 „Anforderungen an die Hygiene bei der Aufbereitung flexibler Endoskope und endoskopischen Zusatzinstrumentariums“; bevorzugt maschinelle Reinigung und Desinfektion
Kritisch						
A) ohne besondere Anforderungen an die Aufbereitung	z. B. Wundhaken	(X)	X		X	Bevorzugt maschinelle Reinigung und Desinfektion (s. Text Nr. 1.3) Grundsätzlich Sterilisation mit feuchter Hitze
B) mit erhöhten Anforderungen an die Aufbereitung	z. B. MIC-Trokar	X ¹	X	(X)	X	Zusätzlich: - Nachweis einer anerkannten Ausbildung des mit der Aufbereitung Betrauten ⁴ - Grundsätzlich maschinelle Reinigung / thermische Desinfektion in Reinigungs- und Desinfektionsgeräten ⁵ (s. Text Nr. 1.3) - Sterilisation mit feuchter Hitze
C) mit besonders hohen Anforderungen an die Aufbereitung	z. B. ERCP-Katheter	X ¹	X	X	X ³	Geeignete Sterilisation ³ Zusätzlich: Zertifizierung des Qualitätsmanagementsystems (DIN EN ISO 13485) in Verbindung mit der Empfehlung „Anforderungen an die Hygiene bei der Aufbereitung von Medizinprodukten“ durch eine von der zuständigen Behörde anerkannte Stelle; Risikoanalyse DIN EN ISO 14971 (s. Text 1.4)

¹ Vorreinigung auch unmittelbar nach Anwendung
² Gegebenenfalls bei Endoskopen, die in sterilen Körperbereichen eingesetzt werden
³ Für nicht-thermische Verfahren der Sterilisation wurde der Nachweis der Inaktivierung von Prionen bisher nicht durchgängig erbracht. Dies ist bei Medizinprodukten dieser Gruppe, die bestimmungsgemäß in Kontakt mit eröffnetem lymphatischem Gewebe oder Nervengewebe kommen, zu beachten (s. auch Anlage 7).
⁴ s. Anlage 6 Sachkenntnis des Personals
⁵ In jedem Falle Sicherstellung einer standardisierten und reproduzierbaren Reinigung mit nachgewiesener Wirkung (einschließlich der inneren Oberflächen).
(X) Arbeitsschritt optional

Abbildung 2 Risikobewertung und Einstufung von Medizinprodukten vor der Aufbereitung (adaptiert von der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) 2012 (10))

1.2.2 Methoden der Sterilisation

1.2.2.1 Heißluftsterilisation

Bei der thermischen Sterilisation mit trockener Luft wird der zu sterilisierende Gegenstand auf 180°C erhitzt, was innerhalb von 30 Minuten zu einer Inaktivierung und Abtötung aller medizinisch relevanten Mikroorganismen führt. Heute wird jedoch empfohlen, die Heißluftsterilisation zugunsten vor allem der Sterilisation mit feuchter Luft zu unterlassen, da die Heißluftsterilisation weniger effektiv ist. Dies resultiert aus der Tatsache, dass bei der Heißluftsterilisation die Wärmeübertragung auf das Sterilgut langsamer erfolgt als beim Autoklavieren. Des Weiteren ist die Entstehung von Kälteinseln im Sterilgut möglich. Diese Methode ist nicht geeignet für Materialien wie Flüssigkeiten, Textilien und Kunststoffe, da

das Sterilgut selbst sowie die Behältnisse für das Sterilgut eine gute Hitzestabilität aufweisen müssen. Der Vorteil der Heißluftsterilisation ist jedoch ihre technisch einfache Durchführung (7).

1.2.2.2 Wasserdampfsterilisation

Im Gegensatz zur trockenen Hitze bei der Heißluftsterilisation wird bei der Wasserdampfsterilisation (=Autoklavieren) heißer Wasserdampf verwendet, da dieser viel effektiver als die trockene Hitze bei gleicher Temperatur ist. Der Grund dafür ist die größere Wärmekapazität des Wasserdampfes. Beim Autoklavieren muss zusätzlich zur hohen Temperatur und der hohen Luftfeuchtigkeit auch der Druck auf etwa 2 bar beziehungsweise 3 bar erhöht werden, um die Temperatur des gesättigten Wasserdampfes auf 121°C beziehungsweise 134°C zu erhöhen. Weiters verkürzt sich die benötigte Sterilisationszeit bei der Erhöhung des Druckes von 2 bar auf 3 bar von 10-20 Minuten auf 5 Minuten (7). Die genauen Vorgänge, wodurch Bakterien und deren Sporen durch Hitze oder Dampf inaktiviert werden, sind noch nicht genau erläutert. Fest steht, dass bei nicht sporenbildende Bakterien nach Erhitzung verschiedene Veränderungen geschehen. Dazu gehören das Austreten von niedermolekularen Substanzen aus der Zelle, Brüche der DNA und RNA, Koagulation von Proteinen, Veränderungen der Zellform sowie Strukturveränderungen der äußeren Zellwand (11).

Nicht alle Erreger sind jedoch gleich sensibel oder resistent gegenüber Hitze, aufgrund dessen hat sich in der Praxis eine Einteilung der Mikroorganismen in vier Resistenzstufen gegenüber Hitze – wie in Abbildung 3 ersichtlich – etabliert.

Resistenzstufe	Temperatur [°C]	Zeit	Erreger
I	100	sek–min	Vegetative Bakterien, Pilze einschließlich der Pilzsporen, Viren, Protozoen
II	105	5 min	Bakterielle Sporen niederer Resistenz (z. B. Milzbrandsporen)
III	100	5–10 h	Bakterielle Sporen höherer Resistenz (z. B. Clostridien der Gasbrandgruppe, Tetanuserreger)
	121	15 min	
	134	3 min	
IV	134	bis zu 6 h	Bakterielle Sporen hoher Resistenz (apathogene thermophile, native Erds sporen)

Abbildung 3 Resistenzstufen von Mikroorganismen gegenüber feuchter Hitze (adaptiert von Dettenkofer und Daschner 1997 (7,12))

Diese Einteilung trifft jedoch nur eingeschränkt auf andere Sterilisationsmethoden zu, da die Resistenzmechanismen anders sind. Die Resistenzstufe „IV“ hat für den medizinischen Alltag wenig Relevanz, da jene Mikroorganismen für den Mensch nicht pathogen sind. Streng genommen kann man nur dann von Sterilisation im engeren Sinne sprechen, wenn der Sterilisationsmechanismus Mikroorganismen der Stufe III oder höher irreversibel inaktiviert (7).

Im Gegensatz zur Heißluftsterilisation ist die Sterilisation mit Wasserdampf gut geeignet für Flüssigkeiten, Kunststoffe, Textilien sowie alle Materialien, für die auch die Heißluftsterilisation geeignet wäre. Aus diesem Grund und der Tatsache, dass das Autoklavieren ebenso wenig technischen Aufwand erfordert, hat sich diese Methode gegenüber der Heißluftsterilisation durchgesetzt (7).

Der Prozess der Sterilisation im Autoklaven erstreckt sich über vier Phasen. Er beginnt mit der Anheizzeit (Solltemperatur wird erreicht), worauf die Ausgleichszeit folgt, bei der das Thermometer des Autoklaven bereits die Solltemperatur angibt, diese jedoch noch nicht vollständig und gleichmäßig im Sterilgut erreicht wird. In der dritten Phase (Einwirkzeit) ist die Solltemperatur gleichmäßig im Sterilgut erreicht und Mikroorganismen werden inaktiviert. Zur Mindestdauer der Einwirkzeit wird ein Sicherheitszuschlag ergänzt, um zuverlässig alle Erreger zu inaktivieren. Nach der Kühlzeit und damit dem Abkühlen des Sterilgutes auf Raumtemperatur kann dieses aus dem Autoklaven entnommen werden (7).

1.2.2.3 Gassterilisation

Aufgrund der geringen Hitzebeständigkeit der Materialien vieler moderner medizinischer Instrumente wurde eine Alternative zur Heißluftsterilisation und zum Autoklavieren notwendig. Die niedrig-Temperatur Gassterilisation hat sich daher zu einer angemessenen Alternative entwickelt (13).

Unter mehreren Möglichkeiten der Sterilisation mit Gasen hat sich die Sterilisation mit dem farblosen und entflammbaren Gas Ethylenoxid (EO) etabliert, das zum einen sehr giftig und zum anderen äußerst reaktiv ist und mit Luft ein explosives Gemisch bildet. Aus diesen Gründen wird auch bei der Handhabung dieser Sterilisationsmethode besondere Kenntnis und Vorsicht erfordert (7).

Der antimikrobielle Effekt von Ethylenoxid beruht auf der Alkylierung (also dem Ersetzen eines Wasserstoffatoms durch eine Alkyl-Gruppe) von Proteinen, der DNA beziehungsweise der RNA. Dabei inaktiviert Ethylenoxid alle Mikroorganismen, wobei sich Bakteriensporen als eher resistent zeigen. Für die Sterilisation mit Ethylenoxid sind vier Parameter essentiell:

die Gas Konzentration von 450 bis 1200 mg/l, die Temperatur zwischen 37 °C und 63 °C, eine relative Luftfeuchtigkeit von 40 % bis 80 % sowie eine materialabhängige Einwirkzeit von einer bis sechs Stunden (9).

Eine Exposition gegenüber Ethylenoxid führt zu Augenschmerzen, Rachenentzündungen, Atemproblemen sowie Visuseinschränkungen. Weiters treten Benommenheit, Übelkeit, Kopfschmerzen, Krämpfe, Blasen, Erbrechen und Husten auf. Eine chronische Inhalation von größeren Mengen an EO bewirkt erhöhte Risiken für Katarakte, neurologische Ausfälle und kognitive Einschränkungen und wurde mit hämatologischen Veränderungen, Spontanaborten und verschiedenen Tumoren in Verbindung gebracht (13). In in-vitro und Tierstudien wurde zudem gezeigt, dass Ethylenoxid carcinogen wirkt. Die Occupational Safety and Health Administration (eine Bundesbehörde der USA) empfiehlt in diesem Zusammenhang eine Schwellenwertbelastung von 0,5 ppm über einen 8 Stunden Arbeitstag in einer 40 Stunden Arbeitswoche sowie 5 ppm für eine Kurzzeitbelastung (15 Minuten) (9). Aus diesen Gründen muss Sterilgut nach einer Sterilisation mit EO gründlich von jenem befreit werden. Dies wird nach der Sterilisation durch die Entlüftung gewährleistet, die bis zu zwei Wochen dauern kann. Diese Zeit kann durch die Erhöhung der Temperatur bei der Entlüftung von Raumtemperatur auf 50 °C bis 60 °C auf 8 bis 12 Stunden reduziert werden. Aufgrund dessen ist die Gassterilisation mit EO im klinischen Alltag wenig geeignet (vor allem für Medizinprodukte, die nicht für Dampf- oder Heißluftsterilisation geeignet sind) sondern eher für die industrielle Sterilisation großtechnisch hergestellter Einmalprodukte (7,9).

1.2.2.4 Strahlensterilisation

Als weitere Alternative zur Gassterilisation für hitzeinstabile Gegenstände, die nicht für das Autoklavieren geeignet sind, steht die Strahlensterilisation zur Verfügung. Theoretisch wären dafür elektromagnetische Strahlung (Röntgenstrahlung und Gammastrahlung), Betastrahlung und Elektronenstrahlung geeignet. Hauptsächlich werden jedoch nur Gammastrahlung aus ⁶⁰Co-Quellen (einem Isotop von Cobalt) und Elektronenstrahlung eingesetzt. Das liegt größtenteils an den hohen Kosten in der Anwendung, weshalb diese Methoden in der großtechnischen Sterilisation von Nahtmaterial, Verbandsmaterial und anderen Produkten aus Kunststoffen (zum Beispiel Prothesen) zur Anwendung kommt. Die empfohlene Strahlendosis beträgt 25 kGy. Die beste Alternative für thermolabile Produkte stellt jedoch nach wie vor die EO-Sterilisation dar, da vor allem bei der Strahlendsterilisation mit Gammastrahlung schädliche Auswirkungen für medizinisches Equipment beobachtet

wurden. Dazu zählen die Oxidation von Kunststoffen (Polyethylen) sowie das Abblättern der Oberfläche und das Entstehen von Rissen (7,9).

1.2.3 Desinfektionsmethoden

Wie im Kapitel 1.2.1 beschrieben dienen Desinfektionsmethoden der Keimreduktion mit dem Ziel, eine Übertragung der Mikroorganismen und damit eine Infektion zu verhindern. Diese Methoden sind bei Medizinprodukten vor allem für unkritische und semikritische Produkte geeignet (10). In Bezug auf die gezielten Mikroorganismen gibt es deutliche Unterschiede, weshalb man von Bakteriziden, Tuberkuloziden (*Mycobacterium tuberculosis*), Fungiziden (einschließlich Pilzsporen) und Viruziden spricht. Grundsätzlich stehen physikalische und chemische Verfahren zur Verfügung, wobei physikalische Methoden zu bevorzugen sind, da sie sicherer, zuverlässiger und ökologisch zumeist unbedenklicher sind. Aufgrund unterschiedlicher Materialansprüche sind in manchen Fällen (zum Beispiel Thermolabilität) jedoch nur chemische Verfahren möglich (7,10). Des Weiteren sind maschinelle Verfahren manuellen vorzuziehen, da sie einer validierten Prüfung unterliegen und für den Anwender sicherer sind. Für eine manuelle Desinfektion werden geprüfte und zertifizierte Desinfektionsmittel aus der „VAH-Liste der Desinfektionsmittel“ („Verbund für angewandte Hygiene e.V.“) empfohlen (10).

Besonders wichtig vor der eigentlichen Desinfektion mittels chemischer Verfahren ist die Reinigungsphase, da zum einen Eiweißrückstände auf den Oberflächen die Wirksubstanzen binden können und die darunter liegenden Mikroorganismen unbeschadet verbleiben (Eiweißfehler) und zum anderen, da die chemischen und physikalischen Eigenschaften der verwendeten Mittel verändert werden, zum Beispiel durch den pH-Wert oder durch Seifen (Seifenfehler) (7).

1.2.3.1 Thermische Desinfektionsverfahren

Medizinische Instrumente, Anästhesiezubehör, Essgeschirr und ähnliche Produkte werden im klinischen Alltag in so genannten Reinigungs- und Desinfektionsgeräten (RDG) aufbereitet, in denen diese zunächst gewaschen und von groben Verunreinigungen befreit werden und anschließend mittels 100 °C heißem Dampf oder heißem Wasser von Mikroorganismen befreit werden. Dabei ist es möglich bakterielle Erreger (einschließlich Mykobakterien), Pilze (samt Pilzsporen), Viren sowie die Sporen des *Bacillus anthracis* (dem Erreger des Milzbrandes) abzutöten beziehungsweise zu inaktivieren. Die Inaktivierung anderer Bakteriensporen bleibt (wie oben beschrieben) den Sterilisationsverfahren vorbehalten.

Die thermische Desinfektion mit Reinigungs- und Desinfektionsgeräten ist bei thermostabilen (bis 100°C) Produkten immer die bevorzugte Methode, da sie am einfachsten durchzuführen ist, am sichersten für den Anwender und im Vergleich zu anderen Methoden deutlich billiger und umweltschonender ist.

Neben der Desinfektion mit heißem Wasserdampf oder heißem Wasser gibt es die Möglichkeit Mikrowellen zur thermischen Desinfektion zu verwenden. Dieses Verfahren wird vor allem bei infektiösen Abfällen, die ausreichend Flüssigkeit enthalten, angewandt (7).

1.2.3.2 Chemische Desinfektionsverfahren

Wie bereits erwähnt teilt man chemische Desinfektionsverfahren (d. h. Desinfektionsmittel) anhand ihres Wirkspektrums ein:

- A. Inaktivierung von Bakterien (inklusive Mykobakterien) und Pilze samt Pilzsporen
- B. Wirksamkeit gegenüber Viren
- C. Geeignet für Sporen von *Bacillus anthracis*
- D. Inaktivierung der Sporen der Erreger des Gasbrandes und von Wundstarrkrampf (Clostridien)

Zur Inaktivierung der Erreger beziehungsweise der Sporen, die unter die Klasse „D“ fallen müssen in allen Fällen Sterilisationsverfahren angewandt werden (7).

In den folgenden Kapiteln werden einige ausgewählte Desinfektionsmittel, deren Wirkprinzip und Anwendungs- und Wirkungsbereiche näher beschrieben.

1.2.3.2.1 Alkohole

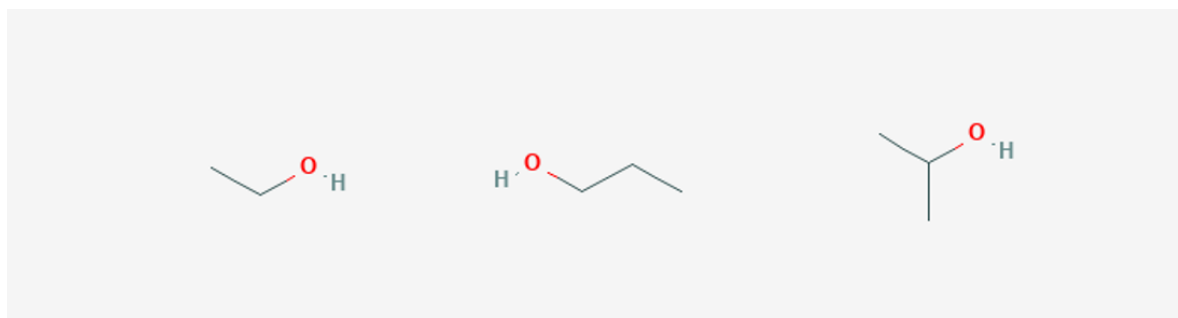


Abbildung 4 Ethanol, N-Propanol und Isopropanol (adaptiert von National Center for Biotechnology Information 2020 (14–16))

Wenn man im Zusammenhang mit Desinfektionsmittel über Alkohole spricht sind vor allem die klaren, farblosen und scharf riechenden Verbindungen Ethanol (Ethylalkohol) und Isopropanol und N-Propanol gemeint (siehe Abbildung 4) (7,9,14–16). Diese Substanzen werden zur Desinfektion in einer Konzentration zwischen 60 % und 90 % (als Lösung in Wasser) angewandt, da in diesem Bereich die größte bakterizide Aktivität erreicht wird.

Wird die Lösung auf unter 50 % verdünnt, so fällt die bakterizide Wirkung rapide ab. Reiner Alkohol (99 %) wirkt nicht nur schwächer bakterizid sondern verhindert sogar jegliche Desinfektion da die Zellwände von Bakterien durch Gerbung undurchlässig für Desinfektionsmittel werden. Alkohole werden allein oder oftmals auch in Kombination mit anderen Desinfektionsmitteln oder miteinander verwendet (7,9).

Der Wirkmechanismus der bakteriziden Aktivität liegt vor allem an der Denaturierung und Fällung von Proteinen sowie an den fettlöslichen Eigenschaften von höher konzentrierten Alkoholen (7,9,14). Die Proteindenaturierung ist vor allem im Beisein von Wasser am schnellsten und effektivsten, weshalb Alkohollösungen in Wasser reinem Alkohol in der Wirkung überlegen sind. Weitere Wirkungen von einwertigen Alkoholen liegen in der beobachteten Zerstörung von Dehydrogenasen in Bakterien (E. Coli) und der Produktionshemmung wichtiger für die Zellteilung notwendiger Metaboliten (9,17).

Gegenüber Viren gibt es Unterschiede unter den verschiedenen Alkoholen was ihre viruzide Effektivität betrifft. So gilt Ethanol in Konzentrationen zwischen 60 % und 80 % als potentes viruzides Desinfektionsmittel gegenüber allen lipophilen Viren (z.B. Herpesviren, Vacciniaviren und Inflenzaviren) sowie vielen hydrophilen Viren (z.B. Adenoviren, Enteroviren, Rhinoviren, and Rotaviren), nicht jedoch gegenüber Hepatitis-A-Viren (HAV) oder Polioviren. Bereits bei einer Konzentration von 25 % zeigt Ethanol suffiziente viruzide Eigenschaften gegenüber Viren, die mit Lymphadenopathie-Erkrankungen in Verbindung stehen (7,9,18).

Isopropylalkohol ist nicht aktiv gegenüber nicht-lipophilen Enteroviren oder Adenoviren, jedoch stark viruzid auf lipophile Viren. Studien haben weiters gezeigt, dass Ethyl- und Isopropylalkohol teilweise fähig sind, Hepatitis-B-Viren (HBV) zu inaktivieren (9,19).

Das Haupteinsatzgebiet von Alkoholen in der Desinfektion ist die Hände- und Hautdesinfektion. Für die Desinfektion von chirurgischen und medizinischen Instrumenten sind Alkohole allein aufgrund der fehlenden Effektivität gegenüber Bakteriensporen weniger geeignet. Ein weiterer limitierender Faktor ist die Tatsache, dass Alkohole proteinreiche Materialien weniger stark penetrieren. Wenn Alkohole zu Hautdesinfektion eingesetzt werden, müssen diese zuvor sterilisiert werden, um eine Kontamination mit Bakteriensporen (zum Beispiel von Clostridien) auszuschließen. Dies ist vor allem bei invasiven Interventionen äußerst wichtig, um eine Infektion zu verhindern.

Ein Vorteil von Alkoholen in der Händedesinfektion ist der schnelle Wirkungseintritt. Dieser kann jedoch verzögert sein bei stark mit Talgdrüsen besetzter Haut (Stirn, Rücken, etc.) (7). Die Instrumentendesinfektion mit Alkohol ist nur für unkritische und semikritische

Instrumente (etwa EKG-Elektroden, Stethoskope, etc.) empfohlen. Ursprünglich wurden auch kritisch Instrumente wie gastroenterologische Endoskope mit Alkoholen desinfiziert (9). Studien haben jedoch gezeigt, dass es in Folge dessen vermehrt zu klinisch relevanten Infektionen (Cholangitis) gekommen ist. Des Weiteren ist die viruzide Wirkung gegenüber Hepatitis-B-Viren zu gering und das Risiko einer Kontamination mit folgender Ansteckung zu groß.

Letztendlich ist der Handhabung mit Alkoholen (vor allem in höheren Konzentrationen) nicht einfach und ungefährlich, da sie volatil und entflammbar sind (20).

1.2.3.2.2 Aldehyde

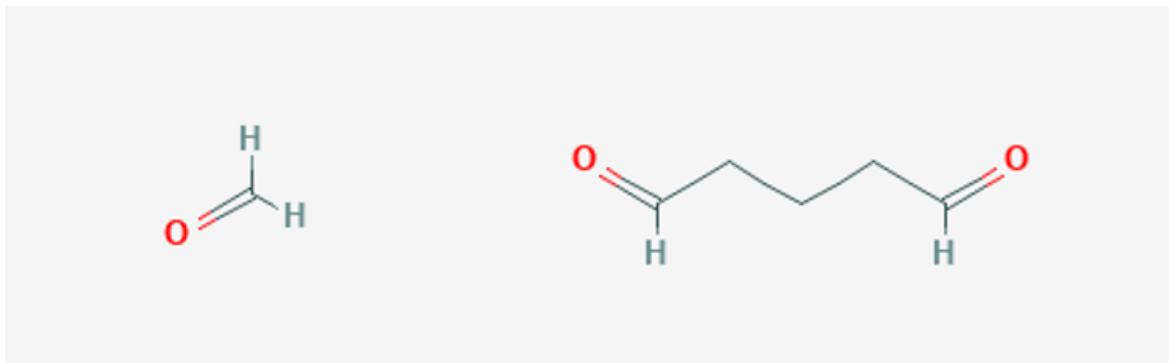


Abbildung 5 Formaldehyd und Glutaraldehyd (adaptiert von National Center for Biotechnology Information 2020 (21,22))

Die zwei wichtigsten Vertreter der Aldehyde bei Desinfektionsmittel sind Formaldehyd und Glutaraldehyd (siehe Abbildung 5). Formaldehyd ist bei Raumtemperatur ein farbloses Gas, das, da es sehr gut wasserlöslich ist, gewöhnlich in einer wässrigen Lösung vorliegt. Als wässrige Lösung wird Formaldehyd als Formalin bezeichnet und wird sowohl mit einer ca. 10 prozentigen Lösung als Desinfektionsmittel und Fixiermittel für biologische Proben verwendet als auch gasförmig als Oberflächendesinfektionsmittel eingesetzt (21). Die wässrige Lösung von Formaldehyd wirkt bakterizid, tuberculozid, fungizid, viruzid und sporizid. Aufgrund der potentiell kanzerogenen Eigenschaften von Formaldehyd, ist es zumindest restriktiv zu verwenden. Die CDC (Centers for Disease Control and Prevention) gibt als Grenzwerte eine maximale Durchschnittsbelastung von 0.75 ppm für einen Arbeitstag (acht Stunden) an, beziehungsweise zwei ppm als maximale Kurzzeitbelastung (15 Minuten). Die antimikrobielle Wirkung von Formaldehyd liegt an der Alkylierung von Amino-Gruppen von Proteinen. Dabei wirkt es sehr effektiv und in kurzer Zeit auf eine Vielzahl von Erregern (inkl. *M. tuberculosis*). Die sporiziden Eigenschaften sind jedoch denen von Glutaraldehyd deutlich unterlegen und werden nur bei deutlich längerer Desinfektion (zwei Stunden bei einer vier prozentigen wässrigen Lösung) erreicht (9,23).

Der Einsatz von Formaldehyd ist auch dadurch begrenzt, da die Verwendung mit einer starken Geruchsbelastung (auch unterhalb der oben beschriebenen Grenzwerte) einhergeht. Des Weiteren ist neben den vermeintlich kanzerogenen Eigenschaften auch eine potenziell allergene Wirkung und eine Schleimhautreizung gegeben (7).

Glutaraldehyd ist eine farblose, ölige und stark beißend riechende Flüssigkeit, die ähnlich wie Formaldehyd fixierend wirkt und als Desinfektionsmittel eingesetzt wird (22). Das Wirkspektrum ist ebenso ähnlich dem von Formaldehyd, hat jedoch den großen Vorteil der wesentlich höheren sporiziden Aktivität. So wurde gezeigt, dass zweiprozentige wässrige Glutaraldehydlösungen mit einem pH-Wert von 8 99,99 % (Reduktion um 10^4) der Sporen von *B. anthracis* und *Clostridium tetani* innerhalb von 15 respektive 30 Minuten inaktivieren konnten. Für eine ähnliche Wirkung benötigt, wie oben beschrieben, eine vierprozentige Formalinlösung zumindest zwei Stunden. Dabei wurde evident, dass die zwei Aldehyd-Gruppen von Glutaraldehyd für die erhöhte sporizide Wirkung verantwortlich sind (23).

Wässrige Lösungen von Glutaraldehyd sind grundsätzlich jedoch nicht wirksam gegenüber Bakteriensporen. Erst in basischen Lösungen (pH-Wert zwischen 7,5 und 8,5) zeigt Glutaraldehyd eine sporizide Wirkung. Die minimale bakterizide Konzentration liegt bei etwa 0,02 %, für die Desinfektion von semikritischem Equipment sollte jedoch die Konzentration von Glutaraldehyd zumindest bei 1 bis 1,5 % liegen, besser jedoch bei 2 % und höher. Aufgrund der genannten Eigenschaften, der hohen Wirksamkeit in Anwesenheit von organischem Material sowie der geringen Aggressivität gegenüber Oberflächen (zum Beispiel Endoskopen) eignet es sich bestens als Desinfektionsmittel für semikritische medizinische Mehrweginstrumente. Die FDA (Food and Drug Administration) empfiehlt dafür zweiprozentige (oder höherprozentige) Glutaraldehydlösungen bei 20°C und einer Desinfektionszeit von 20 Minuten. Für unkritische Instrumente ist Glutaraldehyd aufgrund des hohen Preises nicht empfohlen (24).

1.2.3.2.3 Phenole

Als Phenole werden die Derivate des meist in wässriger Lösung gehaltenen, typisch süßlich und teerig riechenden Phenols bezeichnet.

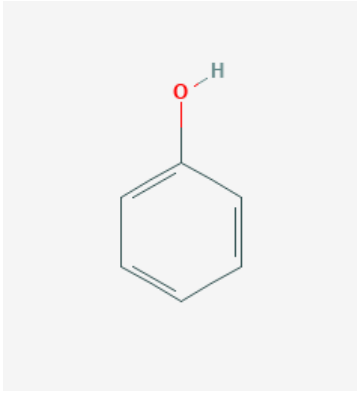


Abbildung 6 Strukturformel von Phenol (adaptiert vom National Center for Biotechnology Information 2020 (25))

Verschiedene Phenolderivate wurden bereits seit Mitte des 19. Jahrhunderts als Desinfektionsmittel in der Chirurgie eingesetzt. Phenolabkömmlinge entstehen, wenn unterschiedliche funktionelle Gruppen ein Wasserstoffatom des aromatischen Ringes ersetzen (Grundstruktur in Abbildung 6). In der modernen Hygiene haben sich vor allem aufgrund von Nebenwirkungen und Unverträglichkeiten anderer Derivate die Abkömmlinge 2-Phenylphenol und ortho-Benzyl-para-chlorphenol als potente Desinfektionsmittel durchgesetzt (9,24).

In höheren Konzentrationen zerstören Phenole Bakterienzellwände und bewirken ein Ausfällen der Plasmaproteine. Zusätzlich wurde vor allem in niedrigeren Konzentrationen nachgewiesen, dass es zu einem Austritt von intrazellulären Bestandteilen (zum Beispiel K^+) bei E.coli kommt sowie, dass der Zelltod von Bakterien durch den Funktionsverlust wichtiger Enzymsysteme entsteht.

Phenole wirken nachweislich antibakteriell, antifungal und antiviral, haben jedoch keine Wirkung auf Bakteriosporen. Die geringste Wirkung wird jedoch offensichtlich gegenüber behüllten Viren erzielt (9,26).

Aufgrund des geringeren Spektrums und der Toxizität werden Phenole nicht bei semikritischen Gegenständen eingesetzt oder zumindest nur als Vorreinigung beziehungsweise zur Dekontamination. Phenolderivate sind jedoch nicht anfällig für Eiweißfehler und werden deshalb bevorzugt als Bestandteil von Flächendesinfektionsmittel eingesetzt (7).

1.2.3.2.4 Chlorverbindungen

Eine große Anzahl an antimikrobiell aktiven Chlorverbindungen ist kommerziell erhältlich. Dazu gehören die sogenannten Hypochlorite (Natriumhypochlorit und Calciumhypochlorit), flüssiges Chlor, Chlordioxid (gasförmig) und anorganische und organische Chloramine. Theoretisch hätte elementares Chlorgas auch gute antimikrobielle Eigenschaften, ist jedoch

extrem toxisch aufgrund der oxidierenden Eigenschaften und wird deshalb nicht zur Desinfektion eingesetzt. Chlordioxid wird hauptsächlich zur Chlorierung von Trinkwasser aufgrund der Elimination von Cyaniden, Sulfiden, Aldehyden und Mercaptanen eingesetzt. Anorganische Chloramine entstehen bei der Reaktion von Chlor mit stickstoffhaltigen Verbindungen. Sie besitzen jedoch geringere antimikrobielle Eigenschaften verglichen mit Hypochloriten. Um die gleiche bakterizide Wirkung zu erzielen werden etwa 25-mal höhere Konzentrationen an Chloraminen gegenüber Hypochlorsäure benötigt.

Hypochlorite sind die Salze der Hypochlorsäure (HClO), das Natriumsalz bildet flüssige Lösung, während das Calciumsalz ein festes Pulver darstellt. Die antimikrobiell wirkende Substanz dieser Verbindungen ist dabei nicht das Chlor an sich, sondern die undissoziierte Hypochlorsäure. Die Dissoziation der Säure in weniger antimikrobiell wirkende Hypochloritionen (OCl^-) ist jedoch abhängig vom vorliegenden pH-Wert. Bei steigendem pH-Wert dissoziiert mehr Säure in ihre Ionen und verliert damit an antimikrobieller Kraft. Die größte antimikrobielle Aktivität wird bei einem pH-Wert von 6 beobachtet, was mit einer minimalen Dissoziation der Säure einhergeht. 1-15 prozentige Natriumhypochloritlösungen sind Bestandteil vieler Haushaltsreiniger und werden als Haushaltsbleiche bezeichnet. Alkalische Salze und Puffer sorgen für einen optimalen Wirkungsbereich und maximale Stabilität der Säure (27).

Der exakte antimikrobielle Wirkmechanismus von Chlor und Chlor freisetzenden Verbindungen ist nicht genau bekannt. Man geht jedoch von einer Kombination folgender Mechanismen aus:

- Oxidation von Enzymen und Aminosäuren
- Chlorierung von Aminosäuren
- Verlust intrazellulärer Bestandteile von Erregern
- Proteinsynthesehemmung
- Verminderte Sauerstoffaufnahme
- DNA-Brüche (9,26).

Chlorverbindungen sind potent antimikrobiell wirksam gegenüber Bakterien und Pilzen (9,24,26). Weiters wurde ein sporizider Effekt bei Chlor freisetzenden Verbindungen nachgewiesen. So bewirkt Natriumhypochlorit eine Inaktivierung von 99,9 % von *Bacillus subtilis* Sporen innerhalb von fünf Minuten (28). Ebenso wurde die viruzide Aktivität verschiedener Chlorverbindungen in zahlreichen Studien nachgewiesen, wobei vor allem

Natriumhypochlorit potent viruzide Eigenschaften gegenüber Polioviren und Hepatitis-A-Viren zeigt (29–31).

1.2.3.2.5 Wasserstoffperoxid

Wasserstoffperoxid (H_2O_2) ist eine farblose Flüssigkeit (bei Raumtemperatur) mit bitterem Geschmack. Es ist recht instabil und zerfällt leicht in Wasser und Sauerstoff und ist damit nicht umweltschädlich. Auch wenn es nicht entflammbar ist, wirkt es dennoch stark oxidativ (32). Um den Zerfall zu verhindern, werden den meisten Desinfektionsmittel, die Wasserstoffperoxid enthalten stabilisierende Verbindungen beigefügt. Herkömmliche Desinfektionsmittel enthalten, je nach Einsatzgebiet, Wasserstoffperoxid in einer Konzentration zwischen 3 % und 90 % (26).

In der Literatur werden die zahlreichen Anwendungsgebiete sowie die gute antimikrobielle Wirkung angeführt. Das Wirkspektrum von Wasserstoffperoxid schließt Bakterien, Viren, Pilze, Bakteriensporen, Amöben und Prionen ein. Um eine angemessene Wirkung gegenüber Bakteriensporen zu erzielen werden zumindest Konzentrationen zwischen zehn und 30% und längere Desinfektionszeiten benötigt. Auch bei einigen Bakterien reichen geringere Konzentrationen und Einwirkzeiten nicht aus (Mykobakterien oder thermophile Bakterien). Zusätzlich zum dennoch großen Spektrum der antimikrobiellen Aktivität kommt eine sehr gute Materialverträglichkeit für die meisten Oberflächen sowie die geringe Toxizität im Vergleich zu anderen sporizid wirkenden Desinfektionsmitteln (24,26,33–35). Die antimikrobielle Wirkung liegt an der Bildung von freien Radikalen, die Membranlipide, DNA, und andere wichtige Zellbestandteile zerstören. Manche Erreger (Staphylokokkus aureus oder Proteus mirabilis) können sich durch Enzymsysteme (Catalase) vor freien Sauerstoffradikalen schützen und Wasserstoffperoxid in Sauerstoff und Wasser spalten. Diesen Vorgang kann man durch höhere Konzentrationen jedoch unterbinden (9,26).

Wasserstoffperoxid wird in Konzentrationen zwischen 3 % und 6 % zur Desinfektion von weichen Kontaktlinsen, Stoffen und semikritischen Gegenständen (etwa Endoskopen) eingesetzt (9,36).

1.2.3.2.6 Peroxyessigsäure

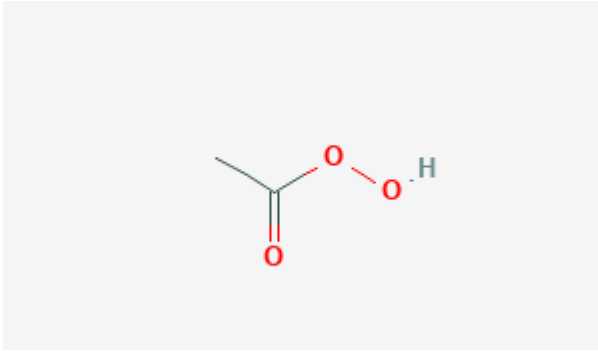


Abbildung 7 Peroxyessigsäure (adaptiert von PubChem 2020 (37))

Peroxyessigsäure gehört zur Gruppe der Peroxycarbonsäuren (organische Säuren) liegt bei Raumtemperatur als farblose flüssige Lösung mit stark beißendem Geruch vor (siehe Abbildung 7) (37). Bereits im frühen 20. Jahrhundert wurden die antibakteriellen Eigenschaften bereits bei einer Konzentration von 0,001 %, fungizide Eigenschaften bei 0,003 % und ihre Sporizidität und Viruzidität bei 0,3 % beschrieben. Als schwache Säure ist ihre antimikrobielle Effektivität in saurer Umgebung ($\text{pH} < 7$) aufgrund der geringeren Säuredissoziation deutlich höher. Ähnlich wie Wasserstoffperoxid (beide sind Peroxide) zerfällt Peroxyessigsäure in ungefährliche Verbindungen (Essigsäure und Sauerstoff), ihre antimikrobielle Aktivität übertrifft jene von Wasserstoffperoxid jedoch deutlich. Ein weiterer Vorteil gegenüber Wasserstoffperoxid ist die größere Wirkung in Anwesenheit von organischem Material (z.B. Serum) und die Tatsache, dass Peroxyessigsäure nicht anfällig für den enzymatischen Abbau durch Peroxidasen. Der große Nachteil von Peroxyessigsäure (und anderen oxidierenden Verbindungen) und oftmals der limitierende Faktor ist der korrosive Effekt auf verschiedenen Oberflächen (26,38,39).

Über die genauen Hintergründe der antimikrobiellen Eigenschaften von Peroxyessigsäure ist wenig bekannt. Man geht jedoch davon aus, dass (ähnlich zu anderen oxidierenden Verbindungen) sie Proteine denaturiert, die Permeabilität an der Bakterienzellwand erhöht wird und Proteine, Enzyme und andere Metaboliten oxidiert. Die Permeabilitätssteigerung der Zellwand liegt dabei an einer Oxidation (und die damit verbundene Zerstörung) von Thiol- (S-H) und Disulfidbrücken (S-S) (9,26,39).

Wie oben beschrieben, inaktiviert Peroxyessigsäure gram-positive und gram-negative Bakterien und Pilze bereits in Konzentrationen unter 100 ppm, in Anwesenheit von organischem Material sind jedoch Konzentrationen zwischen 200 und 500 ppm nötig, um eine ähnliche Wirkung zu erzielen. Im Besonderen wirkt Peroxyessigsäure auch gegen mykobakterielle Erreger wie Mykobakterium tuberculosis und Mykobakterium avium-intracellulare. Hierbei wird eine Reduktion von mehr als 5 \log_{10} -Stufen bei einer 20

minütigen Desinfektion erreicht, was einer ähnlichen antimykobakteriellen Aktivität wie Glutaraldehyd entspricht, dem bisher die größte Effektivität gegenüber Mykobakterien zugesprochen wurde. Gegenüber Viren werden höhere Konzentrationen benötigt. Dabei wurde gezeigt, dass Adeno- und Noroviren bereits bei 400 ppm (bei 20 °C), Polioviren jedoch erst bei einer Konzentration von 1500 ppm (bei 35°C und einer Einwirkzeit von fünf Minuten) inaktiviert werden (9,40,41). In einer anderen Studie wurde der viruzide Effekt von Peroxyessigsäure gegenüber Adenovirus 8 überprüft und es wurde gezeigt, dass 0,2 prozentige (entspricht 2000 ppm) unter extremen Bedingungen (Einwirkzeit von einer Minute und Anwesenheit von 5 % Kalbsserum) eine Virusreduktion um drei log₁₀-Stufen erreicht (19). Zusätzlich zu den beschriebenen Eigenschaften wurde die sporizide Aktivität von Peroxyessigsäure in vielen Studien nachgewiesen. Dabei wurde evident, dass zum einen eine höhere Konzentration notwendig ist, als zur Inaktivierung von Bakterien und Viren und zum anderen, dass eine adäquate sporizide Aktivität nur in saurem Milieu (bei minimaler Säuredissoziation) gegeben ist (39,42–44).

Peroxyessigsäure wird in vielen automatischen Aufbereitungsanlagen zur Desinfektion von semikritischen Instrumenten wie Endoskope, chirurgischen und zahnmedizinischen Instrumenten aufgrund des hohen Wirkspektrums und der guten Umweltverträglichkeit verwendet. Wegen dem großen antimikrobiellen Spektrum wird Peroxyessigsäure oft mit Glutaraldehyd in der Desinfektion von semikritischen Instrumenten verglichen, wobei sich herausstellte, dass ähnlich gute Ergebnisse erzielt werden und kein klinisch relevanter Unterschied unter den beiden Desinfektionsmittel besteht. Glutaraldehyd wird jedoch in vielen Bereichen aufgrund der geringeren Kosten in der Anwendung verwendet. Ein weiterer Nachteil von Peroxyessigsäure ist ihre Instabilität und der korrosive Effekt auf metallische Oberflächen. Auch wenn es ein gut antimikrobiell wirksames Desinfektionsmittel ist, so ist es doch recht instabil und sollte innerhalb von 24 Stunden nach Erstanwendung verworfen werden (9).

1.2.3.2.7 Quartäre Ammoniumverbindungen

Quartäre Ammoniumverbindungen, QAVs (englisch oft QUATs) sind eine große Anzahl an verschiedenen Verbindungen, die allesamt chemische Ammoniakabkömmlinge (NH₃) sind. Dabei sind vier Valenzen des Stickstoffatoms (N) durch verschiedene Reste gebunden. Da Stickstoff fünf freie Elektronen besitzt, wird es zu einem einwertig-positiven Kation und bildet mit verschiedenen Anionen (zumeist Br⁻ und Cl⁻) Salze. Als Salze liegen QAVs in

fester Form vor und sind aufgrund ihrer ionischen Eigenschaften gut in polaren Lösungsmitteln wie Wasser löslich (Grundstruktur in Abbildung 8) (45).

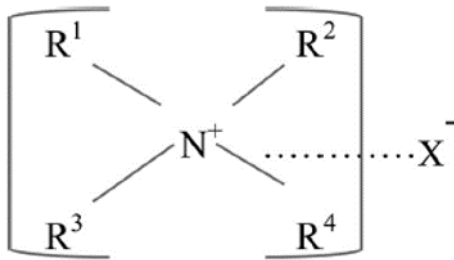


Abbildung 8 Grundstruktur von Quartären Ammoniumverbindungen (adaptiert von Gerba 2015 (46))

Die erste Synthese erfolgte bereits vor fast 100 Jahren und es wurden sogleich ihre antimikrobiellen Eigenschaften erkannt. Ihre größere Verbreitung als Desinfektionsmittel und Antiseptikum erfolgte jedoch erst nach dem zweiten Weltkrieg, sodass quartäre Ammoniumverbindungen heute Bestandteil zahlreicher Desinfektionsmittel und industrieller Reiniger im medizinischen- und lebensmitteltechnischen Bereich. QAVs sind ionische Detergenzien (Tenside) und bewirken eine Reduktion der Oberflächenspannung des Mediums (Wasser) und zählen damit zu den oberflächenaktiven Substanzen (Surfactants). Dadurch bilden sich Mizellen, das heißt kleinste zusammengelagerte Molekülkomplexe, deren polarer Teil nach außen (zum Medium) und der unpolare Anteil nach innen gerichtet ist. QAVs werden aufgrund der vier Reste am Stickstoffatom (R¹-R⁴) unterschieden. Diese beinhalten fast immer eine langkettige Kohlenwasserstoffverbindung sowie aromatische Verbindungen, bilden den unpolaren Anteil und haben großen Einfluss auf die mikrobiellen Eigenschaften der Verbindung. Kohlenwasserstoffketten mit 12 bis 16 Kohlenstoffatomen haben dabei die größte Effektivität gezeigt. Aufgrund der großen Anzahl an verschiedenen Varianten ist es möglich QAVs so anzupassen, dass sie auf bestimmte Erreger besonders effektiv sind. Aufgrund dessen wurden in den vergangenen 100 Jahren große Bemühungen unternommen, quartäre Ammoniumverbindungen möglichst kosteneffizient, effektiv und mit einer geringen Toxizität herzustellen (46).

Der antimikrobielle Effekt von quartären Ammoniumverbindungen beruht in erster Linie auf einer Kette von Ereignissen. Zunächst heften sich QAVs an die Zellwand von Bakterien und zerstören diese, dann erfolgt die Auflösung Plasmamembran, die aufgrund der lipophilen Anteile von QAVs äußerst anfällig ist. Schließlich treten intrazelluläre, niedrigmolekulare Zellbestandteile aus, Proteine und Nukleinsäuren werden zersetzt und die Zelle stirbt durch autolytische Vorgänge. Zusätzlich zu den beschriebenen Mechanismen liegt auch eine Inaktivierung von Energie produzierenden Enzymsystemen nahe (9,46).

Produzenten von quartären Ammoniumverbindungen sprechen ihnen einen generellen fungiziden, bakteriziden, und bedingt viruziden (nur gegen lipophile, behüllte Viren) zu. In allen Fällen sind QAVs wirkungslos gegenüber hydrophile, unbehüllte Viren, gegenüber Mykobakterien und Bakteriensporen. Verschiedene Studien haben jedoch gezeigt, dass es dennoch Lücken im antimikrobiellen Spektrum gibt. So wurde zum einen die fehlende Aktivität gegenüber unbehüllte Viren gezeigt sowie auch nur eine geringe Aktivität (3 log₁₀-Reduktion) gegenüber einen getesteten behüllten Virus (Vacciniavirus) (47,48). In einer weiteren Studie wurde die Wirklosigkeit gegenüber Mykobakterien bewiesen, da eine QAV Verbindung keine zufriedenstellende Inaktivierung von *M. tuberculosis* erreichte (<1 log₁₀-Reduktion) (49). Gegen Pilze werden auf jeden Fall höhere Konzentrationen an QAVs benötigt, was gegenüber verschiedenen *Candida* Spezies bewiesen wurde (50). Anderen Pilzen (*Trichophyton mentagrophytes*, *Epidermophyton floccosum*, *Aspergillus niger* und *Aspergillus fumigatus*) gegenüber blieben verschiedene quartäre Ammoniumverbindungen wirkungsarm bis -los (51).

Aufgrund der amphoteren, oberflächenaktiven Eigenschaften als Tenside sind quartäre Ammoniumverbindungen gut geeignet, um in Anwesenheit von organischem Material zu wirken. Als Desinfektionsmittel werden sie jedoch aufgrund ihres eingeschränkten Wirkspektrums nur für unkritische Oberflächen zum Beispiel als Bestandteil von Boden- und Oberflächenreiniger in Krankenhäusern verwendet. Zusätzlich zum geringen Wirkspektrum kommen als Nachteile ein hohes Potenzial für Seifen- und Eiweißfehler, lange Einwirkzeiten sowie eine beobachtete Häufung an Asthmafällen bei vermehrter Exposition gegenüber QAVs (7,9). Auch ihre Verwendung als Bestandteil von Reinigern ist umstritten, da gezeigt wurde, dass quartäre Ammoniumverbindungen in Anwesenheit von Baumwoll- oder Mikrofasertüchern ihre antimikrobielle Aktivität verlieren und es zu einem bis zu 85,3 prozentigem Konzentrationsabfall kommt (52). QAVs wurden in der Vergangenheit trotz einiger Warnungen als Desinfektionsmittel und Antiseptikum eingesetzt, was vermehrt zu klinischen Problemen wie Infektionen mit Pseudomonaden (gramnegative Stäbchen) führte (53).

1.3 Embryokultur

In den letzten Jahren der Reproduktionsmedizin hat sich gezeigt, dass der Embryotransfer im Blastocystenstadium (dritter bis fünfter Tag nach der Befruchtung) bezüglich der Embryoentwicklung, der Schwangerschaftsentstehung und der Aufrechterhaltung jener einen Vorteil gegenüber einem früherem Embryotransfer (zum Beispiel zweiter Tag – 4-Zell-Stadium) birgt. Aus dieser Tatsache folgt der Schluss, dass geeignete Kulturbedingungen für zunächst die Zygote und in weiterer Folge bis hin zur Blastocyste geschaffen werden müssen, um möglichst hohe Raten an transferfähigen Blastocysten zu ermöglichen. Dementsprechend unterlagen die Kultursysteme und Kulturmedien in den letzten Jahren einer andauernden Veränderung. Verbesserungen der Kulturbedingungen führten zu deutlich gesteigerten Implantationsraten, weniger Schwangerschaftsverlusten und damit zu höheren Erfolgsraten in der Reproduktionsmedizin (54–56).

In diesem Kapitel sollen aus diesem Grund die Grundprinzipien der Embryokultur erklärt werden und anschließend genauer die Sauerstoffreduktion und die Verwendung einer Ölschicht für die Kultur erläutert werden.

1.3.1 Kulturprinzipien

Neben der genauen Zusammensetzung und den dadurch resultierenden Unterschieden der verschiedenen Kulturmedien spielt auch etwa die Menge des Mediums und das damit verbundene Volumen-zu-Embryo – Verhältnis eine Rolle in der Reifung des Embryos; so wurde gezeigt, dass kleinere Volumina mit einer größeren Entwicklungsfähigkeit des Embryos in Verbindung stehen (54).

Unter den Kulturmedien lassen sich grundsätzlich zwei Prinzipien unterscheiden: ein Kulturmedium („monoculture“) und wechselnde Kulturmedien („sequential culture“) (57–59).

1.3.1.1 Einzelmedium

Im „single-medium“ Protokoll als Kulturprinzip wird lediglich ein Kulturmedium während der gesamten Kulturzeit verwendet. Auch wenn dieses Prinzip den physiologischen Ansprüchen des Embryos in einigen Bereichen widerspricht, birgt es dennoch einige Vorteile. Wird nur ein Kulturmedium bis zum Blastocystenstadium verwendet, so verhindert man den potentiellen Stress für den Embryo, der durch die Exposition gegenüber einem anderen Kulturmedium entsteht, da der Wechsel des Mediums mit einem zusätzlichen osmotischem Stress einher geht. Zusätzlich werden durch den Wechsel autokrine und parakrine Faktoren, die während der frühen Kulturphase in der 4-Zell-Phase bis hin zur

reifen Morula gebildet werden entfernt. Zusätzlich zu diesen Faktoren bedeutet das Einzelmedium-Prinzip einfachere Laborprotokolle, verbunden mit einem geringeren Risiko für Laborfehler sowie geringere Kosten.

Für dieses Prinzip stehen zwei Möglichkeiten zur Verfügung: die ununterbrochene Kultur mit einem Kulturmedium und eine Variante, in der am dritten Tag der Kultur (6- bis 8-Zell-Stadium) das Kulturmedium gewechselt wird, jedoch die gleiche Zusammensetzung beibehalten wird. Der Vorteil des Wechsels auf ein frisches Kulturmedium ist die Entfernung metabolischer Abfälle, die in der frühen Embryogenese anfallen. Damit werden jedoch, gleich wie in sequenziellen Kultur, vom Embryo sezernierte Wachstumsfaktoren entfernt (57,58).

1.3.1.2 Sequential Media

Als physiologischste Methode hat sich die Kultur mit wechselnden Medien herausgestellt. Dabei wird die Zygote bis hin zum Morulastadium am dritten Tag nach der Befruchtung in einem eigenen Medium kultiviert und anschließend in ein Medium mit anderer Zusammensetzung transferiert und in diesem bis zum fünften Tag kultiviert (57,58). Dieser Ansatz verfolgt die Annahme, dass in vivo die Zygote und die Morula einem anderen Milieu (dem der Tuba uterina) als die Blastocyste im cavum uteri ausgesetzt ist. Zudem unterliegt das Furchungsstadium anderen physiologischen Bedürfnissen als die Blastocyste unmittelbar vor der Implantation. Die Physiologie der Morula ist charakterisiert durch ein relativ geringes Ausmaß an Biosynthese und dem entsprechend eine geringe Fähigkeit, Glukose als Energiequelle zu nutzen. Nach der Bildung der Blastocyste steigen die Biosynthese-Raten, was mit einem Glukosebedarf einhergeht. Ebenso besteht in der frühen Embryogenese ein deutlich geringerer Bedarf an Aminosäuren im Vergleich mit späteren Phasen, in denen aufgrund der gesteigerten Proteinsynthese von differenzierteren Zellen ein höherer Bedarf besteht.

Mit der Bildung der Blastocystenöhle ist der Embryo zusätzlich fähig, Ionengradienten selbstständig zu regulieren; im Gegensatz dazu muss jede Zelle der Morula als eigenständige Entität betrachtet werden, für die eigenständige Homöostasebedingungen gelten. All diese Vorgänge müssen in der Auswahl der Kulturmedien berücksichtigt werden, weshalb man grundsätzlich die Kulturmedien in zwei Phasen einteilt (engl.: pre- und post-compaction) (54,60).

Welche dieser beiden Kulturregime angewandt wird, hängt von der verfolgten Philosophie ab; ein signifikanter Vorteil für das Einzelmedium oder sequenzielle Kulturmedien für den Embryotransfer am dritten Tag konnte nicht nachgewiesen werden (61,62).

1.3.2 Zusammensetzung von Embryokulturmedien

Wie in den Kapiteln zuvor beschrieben unterliegt die Zusammensetzung der Embryokulturmedien dem jeweiligen Regime, weshalb verschiedene Medien kommerziell erhältlich sind, die sich in der genauen Komposition der Bestandteile unterscheiden. Grundsätzlich sind folgende Bestandteile enthalten: Wasser, Ionen, Kohlenhydrate, Aminosäuren, Vitamine, Nukleinsäuren (-vorstufen), Proteine, Makromoleküle, Chelatoren, Antioxidantien, Antibiotika, Hormone, Cytokine, Wachstumsfaktoren und verschiedene Puffersysteme. Die Bedeutung einzelner Komponenten ist in den meisten Fällen schwierig zu interpretieren, da die Bestandteile miteinander in Interaktion stehen und im gesamten Medium in Studien getestet werden (55).

In den folgenden Kapiteln sollen die ausgewählte Bestandteile und deren Bedeutung für die Embryokultur kurz erörtert werden.

1.3.2.1 Wasser

Für Wasser – den Hauptbestandteil aller Embryokulturen – ist die Reinheit der Wichtigste Faktor. In Mausembryo-Studien wurde bereits 1986 gezeigt, dass dreifach destilliertes Wasser einen Vorteil gegenüber einer zweifachen oder einfachen Destillation besitzt. Aufgrund verschiedener Faktoren (zum Beispiel das Vorhandensein von Pyrogenen) wird heute zumeist ultrafiltriertes Wasser eingesetzt (55,63).

1.3.2.2 Ionen

Ursprünglich wurden für Embryokulturmedien die gleichen Salze in gleicher Konzentration wie für die Kultur somatischer Zellen verwendet. Die bedeutendsten anorganischen Ionen sind Natrium, Chlorid, Kalium, Calcium, Phosphat und Magnesium. Konzentrationen anorganischer Ionen ähnlich jenen von Kulturen somatischer Zellen verursachen allerdings eine erhöhte osmotische Konzentration, was zu einer Akkumulation von anorganischen Ionen in den Zellen und damit zu einem erhöhten osmotischen Stress führt. Die optimale Osmolarität für die Entwicklung menschlicher Embryos in Kulturen wurde noch nicht genau ermittelt, in Tierstudien wurde jedoch eine optimale osmotische Konzentration von 200 bis 350 mosmol/kg – je nach Spezies – ermittelt, dementsprechend wurden die herkömmlichen Kulturmedien für menschliche Embryos auf eine Osmolalität zwischen 275 bis 295

mosmol/kg eingestellt. Zusätzlich zu anorganischen Ionen haben auch organische Ionen (zum Beispiel Betain und Glycin) einen Einfluss auf den osmotischen Druck ohne einen erhöhten osmotischen Stress auf die einzelnen Zellen auszuüben (55,57,64,65).

1.3.2.3 Kohlenhydrate

Kohlenhydrate dienen gemeinsam mit Aminosäuren in Zellkulturen als Energiesubstrate für den zellulären Metabolismus. Die wichtigsten energieliefernden Kohlenhydrate in Kulturmedien sind Pyruvat, Laktat und Glucose. Die frühe Embryogenese benötigt geringere Mengen an Glucose, dafür ist diese Phase gekennzeichnet durch einen höheren Verbrauch von Pyruvat und Laktat. Dieser Wechsel des Metabolismus der Morula hin zur Blastocyste spiegelt ebenso das Vorhandensein jener Kohlenhydrate in vivo wider: Im Eileiter wurden höhere Konzentrationen an Pyruvat und Laktat gemessen als im Uterus und vice versa.

Aus diesem Grund beinhalten Kulturmedien für frühere Phasen (bei wechselnden Kulturmedien) höhere Konzentrationen an Pyruvat und Laktat als Medien für die Kultur von Blastocysten (in diesen dominiert der Glucosemetabolismus) (55,57,66–68).

1.3.2.4 Aminosäuren

In Embryokulturen werden Aminosäuren ein positiver Effekt bezüglich der Embryoentwicklung und ein höheres Überleben des Embryos in der Kultur nachgewiesen. Diese Effekte gelten jedoch nicht für alle üblichen Aminosäuren; mehrere Zellkulturstudien (von verschiedenen Tieren) zeigten, dass vor allem nicht essentielle und einige essentielle Aminosäuren (Alanin, Arginin, Asparaginsäure, Asparagin, Cystin, Glutaminsäure, Glutamin, Glycin, Histidin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Threonin, Tryptophan, Tyrosin, Valin) einen Vorteil für die Entwicklung der Zygote zur Blastocyste darstellen. Der Vorteil wurde jedoch nur für die frühe Embryogenese (bis zum 8-Zell-Stadium) nachgewiesen, im Blastocystenstadium bewirken jene Aminosäuren eine gesteigerte Teilung des Trophektoderm. Im Gegensatz dazu scheinen die meisten essentiellen Aminosäuren die Zellanzahl von Blastocysten zu reduzieren, was vor allem auf eine Inhibition der Zellteilung bis zum 8-Zell-Stadium zurückzuführen ist. Danach führen essentielle Aminosäuren zu einer gesteigerten Zellteilungsrate der inneren Zellmasse. Diese Effekte werden durch die Tatsache bekräftigt, dass im Eileiter geringere Konzentrationen jener Aminosäuren gemessen wurden. Aufgrund der speziellen Gegebenheiten sollten für Aminosäuren in der Embryokulturen die Begriffe „cleavage amino acids“ und „ICM amino acids“ verwendet werden. Die positiven Effekte der Aminosäuren resultieren nicht nur aus

der Funktion als Energielieferanten, sondern auch als intrazellulärer Osmolyten, Regulatoren auf den intrazellulären pH-Wert.

Die unterschiedlichen Ansprüche während der Embryogenese bezüglich Aminosäuren bekräftigen das Kulturregime mit wechselnden Medien. Zusätzlich wurde gezeigt, dass beim Wechsel der Kulturmedien akkumuliertes Ammoniak, das beim Abbau von Aminosäuren entsteht und für den Embryo toxisch wirkt, aus dem Medium eliminiert wird (55,57,69–72).

1.3.2.5 Makromoleküle

Die wichtigsten Makromoleküle in Embryokulturmedien sind Proteine und Glykosaminoglykane wie Hyaluronsäure. Historisch betrachtet war als wichtigstes Protein Serumalbumin Bestandteil von Zellkulturen; nicht nur aus *in vivo* Messungen, sondern auch in Studien konnte allerdings gezeigt werden, dass Serum verschiedenste nachteilige Effekte Embryos gegenüber besitzt, weshalb es in modernen Medien keine Anwendung mehr findet. Vielmehr werden nun Humanalbumin und synthetisch hergestelltes „recombinant albumin“ aufgrund ihrer Eigenschaften verwendet. Aufgrund ihrer Oberflächenladung verursacht Albumin eine Haftung des Embryos an anderen Oberflächen, wodurch eine Manipulation und damit das Handling erleichtert werden. Darüber hinaus verändert Albumin die Oberflächenspannung des Kulturmediums und trägt zum gesamten kolloidosmotischen Druck bei. In diesen Eigenschaften gibt es keinen Unterschied zwischen Humanalbumin und recombinant albumin (55,57,73).

1.3.3 Sauerstoffreduktion

In den Anfängen der assistierten Reproduktionsmedizin waren Kulturbedingungen unter atmosphärischen Sauerstoffkonzentrationen (~20 %) der Standard, aus Überlegungen und Messungen der Sauerstoffkonzentration in den Tuben und intrauterin sowie aus Tierstudien resultierte jedoch die Hypothese einer Sauerstoffreduktion während der Embryokultur. *In vivo* Messungen verschiedener Tiere aber auch des Menschen zeigten, dass die Sauerstoffkonzentration der Tuben nur ca. 2 % bis 8 % beträgt und auf etwa unter 2% intrauterin abfällt. Dies geht mit der Tatsache einher, dass die frühe Embryogenese – wie oben beschrieben – von einem aeroben Metabolismus geprägt ist. Aus diesen Gründen werden seit den frühen 70er Jahren Inkubatoren verwendet, die Kulturbedingungen unter Sauerstoffreduktion ermöglichen. Atmosphärische Werte bedeuten für den Embryo einen erhöhten oxidativen Stress durch die Bildung freier Radikale (reactive oxygen species – ROS), die als Nebenprodukt bei jedem aeroben Metabolismus anfallen. Diese führen zur Oxidation verschiedener Zellbestandteile, besonders anfällig sind jedoch Nukleinsäuren, wo

Oxidationen zu Mutationen führen können. Andere Angriffspunkte für ROS sind Lipide, wo Oxidationsreaktionen zu Veränderungen der Membranstabilität und -permeabilität führt, sowie Proteine, die durch Oxidation in ihrer Funktion beeinträchtigt werden.

Auf der anderen Seite zeigten Sauerstoffkonzentrationen von 5 % vor allem in Tierstudien verschiedene Vorteile. Darunter fallen eine frühere erste, zweite und dritte Zellteilung, weniger apoptotische Zellen, eine bessere ICM Proportion und mehr Embryos, die das Blastocystenstadium erreichen. Klinisch ergaben Embryokulturen unter Sauerstoffreduktion einheitlich positive Ergebnisse für die Embryoentwicklung und IVF Ergebnisse, während Menschenstudien uneinheitliche Daten diesbezüglich lieferten. Dies resultiert aus verschiedenen Kulturmedien und verschiedenen Kulturdauern (frühe Embryos vs. Blastocysten) der Studien. In allen Fällen konnte kein negativer Effekt einer Embryokultur unter Sauerstoffreduktion nachgewiesen werden (55,74–77). Die Ergebnisse zahlreicher dieser Studien wurden in systematic reviews und Metaanalysen zusammengefasst, von denen eine zeigt, dass reduzierte Sauerstoffbedingungen (5 % - 6 %) bessere Ergebnisse für Lebendgeburtsraten (ca. 5 %) und anhaltende Schwangerschaften liefert (im Vergleich mit 20 % Sauerstoff), jedoch keinen Unterschied in der Fertilisation oder den Zellteilungsraten. Der Evidenzgrad dieser Studien ist jedoch gering, da in den Studien verschiedene Inkubatoren und verschiedene Systeme der Sauerstoffreduktion verwendet wurden (78). In einem weiteren review wurden ähnliche Ergebnisse beschrieben: Lebendgeburtsraten konnten von 30 % (bei atmosphärischem Sauerstoff) auf 32 % bis 43 % (bei Sauerstoffreduktion) gehoben werden. Ähnliche Ergebnisse wurden für den Parameter der klinischen Schwangerschaftsraten erzielt (79).

Um eine Sauerstoffreduktion in der Embryokultur zu erzielen, gibt es verschiedene Möglichkeiten: klassische CO₂ Inkubatoren (mit CO₂ und N₂ oder mit CO₂, N₂ und O₂), Einzel-Schalen-Inkubatoren (mit Kammern für einzelne Schälchen mit eigener Gasversorgung), verschlossene Kammern, die mit einem Gasmisch befüllt und fest verschlossen werden und kombinierte Inkubatoren mit Arbeitsflächen (große Hauben, die sowohl als Inkubator als auch als Arbeitsfläche dienen). Die empfohlenen Gaskonzentrationen für eine Embryokultur unter Sauerstoffreduktion sind 5 % für O₂, 6 % für CO₂ und 89 % für N₂ (74).

1.3.4 Ölschicht

Die gängigste Methode zur Kultur von Embryos ist derzeit, diesen in einem Schälchen innerhalb eines kleinen Tropfens (microdrop: 20 bis 50 µl) des Kulturmediums zu bringen.

Aufgrund der geringen Menge des Kulturmediums im Vergleich zum Embryo, ist die Evaporation des Mediums ein großes Problem, das mit einem signifikanten Anstieg der osmotischen Konzentration einhergeht. Aus diesem Grund wird üblicherweise eine Schicht aus Mineralöl über den microdrop gegeben. Diese verhindert nicht nur die Evaporation des Mediums, sondern auch starke Fluktuationen des pH-Wertes (durch geringeren Verlust von CO₂) und der Temperatur. Weiters soll die Ölschicht einen Schutz vor Bakterien bieten sowie toxische lipophile Substanzen im Medium absorbieren.

Für die Ölschicht über microdrops werden Mineralöle (Produkt aus der Destillation aus Rohöl) verwendet, die chemisch gesehen ein Gemisch aus verschiedenen acyclischen, cyclischen und aromatischen Kohlenwasserstoffen darstellen und anhand ihrer Viskosität klassifiziert werden. Von äußerster Wichtigkeit ist die Reinheit des Produktes, da unentdeckte toxische Substanzen im Mineralöl schädlich gegenüber dem Embryo wirken können. Einen ebenso nachteiligen Effekt stellt die Oxidation des Öls dar, bei der Aldehyde anfallen können, weshalb Öle für Embryokulturen bei 4 °C und an dunklen Orten (je nach Herstellerangabe) gelagert werden sollen. Letztendlich können Kohlenwasserstoffe die Lipidstrukturen der Zellmembranen verändern und dadurch die Toleranz gegenüber dem Einfrieren reduzieren (80–83).

2 Material und Methoden

2.1 Desinfektion und Sterilisation optischer Sonden

Für die Messungen im Rahmen der Desinfektion und Sterilisation optischer Sonden wurden *Bare Fiber Oxygen Microsensors* (PyroScience AT GmbH, Graz, Österreich) beziehungsweise *Bare Fiber Temperature Minisensors* (PyroScience AT GmbH, Graz, Österreich) verwendet. Diese wurden über das dazugehörige *FireSting-O2* mit einem Computer verbunden, um die Messergebnisse aufzuzeichnen.

Als Desinfektionslösungen kam eine Auswahl an Bestandteilen üblicher Desinfektionsmittel zur Anwendung:

- Wasserstoffperoxid (3 %, 15 %, 30 %)
- Peroxyessigsäure (1 %)
- Natriumhypochlorit (10 %)
- Chloramin T (1 %)
- Glutaraldehyd (3 %)
- Ethanol (96 %)
- 1-Propanol (60 %)
- 2-Propanol (60 %)
- Cetyltrimethylammoniumbromid (10 %)
- Triclosan (2 % - Lösungsmittel Ethanol)
- 2-Phenylphenol (4 % - Lösungsmittel Ethanol)

2.1.1 Desinfektion und Sterilisation optischer Sauerstoffsonden

Um Veränderungen an optischen Sauerstoffsonden nachweisen zu können, die durch den Vorgang der Desinfektion bzw. der Sterilisation entstehen könnten, wurden die Sonden in zwei verschiedenen Lösungen getaucht. Zum einen – um den Sauerstoffgehalt der Atmosphäre zu simulieren – wurde mit Luft gesättigtes Wasser verwendet. Hierzu wurde ein verschließbares Glas mit ca. 150 ml Wasser gefüllt und anschließend für 30 Sekunden geschüttelt, um das Wasser mit Sauerstoff zu sättigen. Zum andern – um eine verminderte Sauerstoffkonzentration in der Lösung zu erzeugen – wurden die Sonden in eine drei prozentige Natriumsulfitlösung getaucht. Natriumsulfit entzieht in diesem Zusammenhang den Sauerstoff aus der Lösung durch die Oxidation zu Natriumsulfat.

In beiden Lösungen wurden die Änderung des Phasenwinkels sowie die Intensität des Emissions-Signals gemessen. Anschließend wurden die Sonden einerseits für eine Minute

sowie andererseits für eine Stunde in die Desinfektionslösung getaucht und daraufhin, wie oben genannt, erneut drei Mal die Änderung des Phasenwinkels sowie die Intensität in beiden Messlösungen gemessen. Zusätzlich wurden die Sonden in einem Messdurchgang anstelle einer Desinfektionslösung in Wasser „desinfiziert“, um Veränderungen, die im Zuge des Desinfektionsvorgangs, nicht aber durch die Desinfektionslösung selbst, geschehen, auszuschließen.

Des Weiteren wurden die verwendeten Sonden in einem Autoklav für 20 min bei 120 °C und einem Druck von 2 bar sterilisiert. Um Intensitätsverminderungen aufgrund einer Beeinträchtigung der Lichtleiterkabel durch den Dampf im Autoklav auszuschließen, wurden die Messlösungen zunächst unmittelbar nach der Sterilisation gemessen und zusätzlich nach einem Trocknungsvorgang in einem Ofen bei 100 °C für 30 min. Im Übrigen wurde der Sterilisationsvorgang zusätzlich mit Sonden mit einer kürzeren Länge des Lichtleiterkabels durchgeführt, um eine mögliche Veränderung der gemessenen Werte aufgrund des Kabels zu zeigen. Da bei der Wasserdampfsterilisation vor allem Bedenken in Bezug auf den Intensitätsverlust bestehen, wurde lediglich in drei prozentiger Natriumsulfidlösung gemessen und besonderer Augenmerk auf einen potentiellen Intensitätsverlust gelegt.

Alle Messungen wurden drei Mal durchgeführt und in der Auswertung der Daten das arithmetische Mittel daraus berechnet, um Abweichungen zu minimieren.

2.1.2 Desinfektion und Sterilisation optischer Temperatursonden

Ähnlich den Sauerstoffsonden wurden zwei Lösungen für die Messungen herangezogen. Auf der einen Seite wurde in 150 ml Wasser bei Raumtemperatur (25 °C) und auf der anderen Seite in 150 ml auf 40 °C erwärmten Wasser gemessen. Nach drei Messungen wurde die Sonde ebenso sowohl für eine Minute, sowie für eine Stunde in der Desinfektionslösung desinfiziert und daraufhin in beiden Messlösungen drei Mal gemessen. Im Unterschied zu den Messungen der Sauerstoffsonden wurden die Temperatur und erneut die Intensität gemessen. Auch im Fall der Temperatursonden wurde ein „Desinfektionsvorgang“ mit Wasser als Referenz durchgeführt.

Die Temperatur der Messlösungen wurde dabei mithilfe eines externen Thermometers (*Pt100 Temperature Probe*; PyroScience AT GmbH, Graz, Österreich) überprüft und dokumentiert. Abschließend wurden in der Auswertung der Daten die Mittelwerte der (mit den optischen Sonden gemessenen) Temperaturen von den Werten der externen Messung abgezogen.

2.2 Sauerstoffmessungen in Kulturmedien mit und ohne Ölschicht

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Sauerstoffmessungen in Embryokulturmedien wurden *Retractable Fiber Oxygen Microsensors* (PyroScience AT GmbH, Graz, Österreich) verwendet, die zuvor gemäß den Herstellerangaben kalibriert wurden. Gemessen wurde im Kulturmedium *GM508 CultActive* (GYNEMED GmbH & Co. KG, Lensahn, Deutschland), welches in einem *Geri*-Inkubator von (Genea BIOMEDX, Sydney, Australien) unter Sauerstoffreduktion inkubiert wurde. Unmittelbar nach der Entnahme der Kulturschälchen wurden diese auf einer Heizplatte (37 °C) positioniert, die Sonden in das Medium eingebracht und die Messung, bei der in jeder Sekunde ein Sauerstoffwert ermittelt wurde, gestartet. Die korrekte Lage der Sensorspitze wurde unter einem Mikroskop kontrolliert. In diesem Rahmen wurden je drei Messungen über 90 Minuten von unabhängig inkubierten Kulturmedien mit und ohne Mineralölschicht (GM501 Mineral Oil, GYNEMED GmbH & Co. KG, Lensahn, Deutschland) über dem Kulturmedium durchgeführt. Aus den jeweils drei Messungen mit bzw. ohne Ölschicht wurde das arithmetische Mittel berechnet und die Sauerstoffverläufe graphisch dargestellt und miteinander verglichen.

3 Ergebnisse – Resultate

3.1 Desinfektion und Sterilisation optischer Sonden

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der Messungen in den Tabellen 2 bis 16 ausgeführt sowie in den Abbildungen 9 bis 24 graphisch dargestellt. Für das bessere Verständnis der Tabellen und Graphiken sollen die folgenden Begriffe in Tabelle 1 erläutert werden:

Tabelle 1 Erklärung

\bar{x}_{\min_VOR}	Mittelwert vor einminütiger Desinfektion
\bar{x}_{\min_NACH}	Mittelwert nach einminütiger Desinfektion
\bar{x}_{h_VOR}	Mittelwert vor einstündiger Desinfektion
\bar{x}_{h_NACH}	Mittelwert nach einstündiger Desinfektion

3.1.1 Wasser (Referenzmessung)

Tabelle 2 Referenzmessung mit Wasser

Sauerstoff				
	Luft gesättigtes Wasser [dφ]	Luft gesättigtes Wasser (Intensität)	Na ₂ SO ₃ [dφ]	Na ₂ SO ₃ (Intensität)
\bar{x}_{\min_VOR}	21,260	165,767	53,217	402,567
\bar{x}_{\min_NACH}	21,257	166,800	53,247	403,233
\bar{x}_{h_VOR}	21,223	165,367	53,187	401,967
\bar{x}_{h_NACH}	21,233	166,133	53,180	401,067

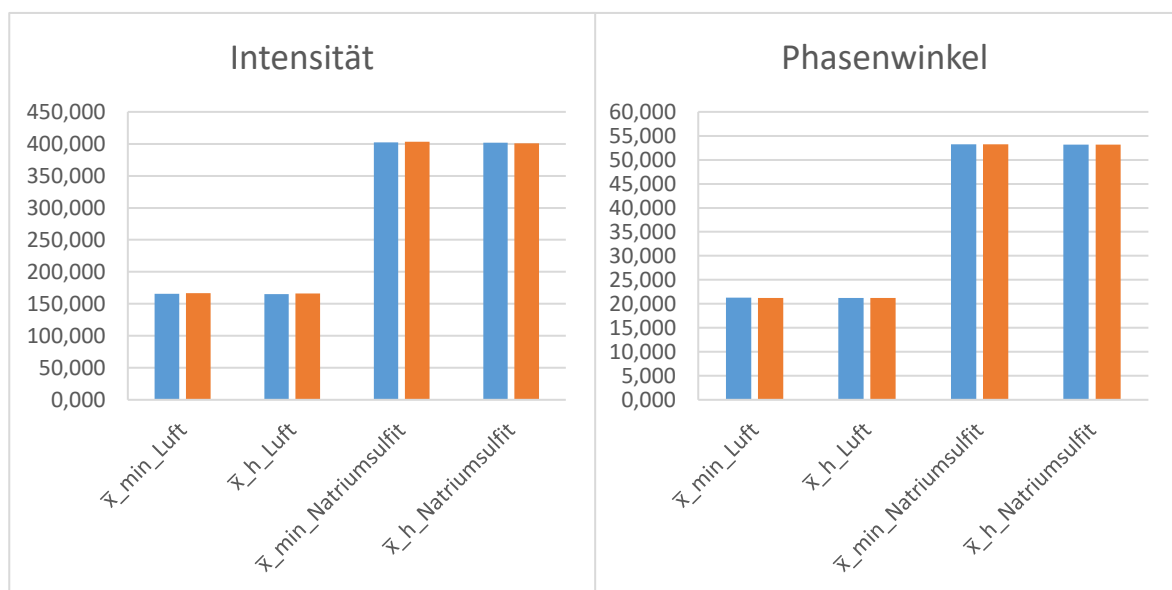


Abbildung 9 Änderung der Intensität und des Phasenwinkels aufgrund der "Desinfektion" mit Wasser (blau: vor Desinfektion; orange: nach Desinfektion)

3.1.2 Ethanol (96 %)

Tabelle 3 Desinfektion mit Ethanol (96 %)

Sauerstoff				
	Luft gesättigtes Wasser [dφ]	Luft gesättigtes Wasser (Intensität)	Na ₂ SO ₃ [dφ]	Na ₂ SO ₃ (Intensität)
\bar{x}_{\min_VOR}	21,770	174,700	53,257	404,233
\bar{x}_{\min_NACH}	21,753	173,567	53,243	407,767
\bar{x}_{h_VOR}	21,777	166,033	53,603	402,133
\bar{x}_{h_NACH}	21,880	174,167	53,543	434,233

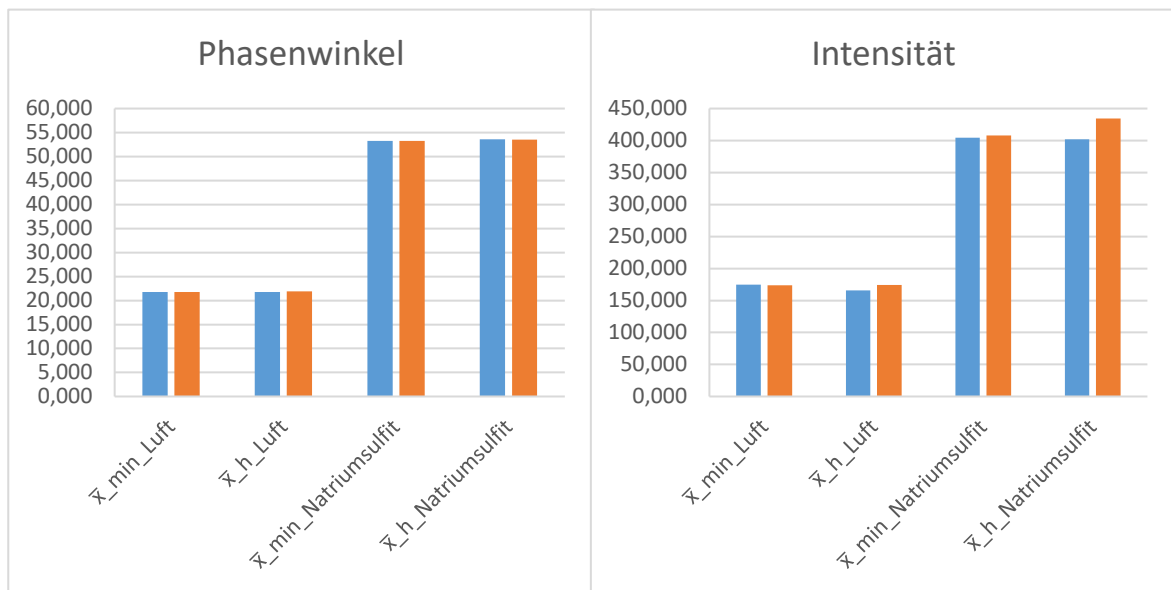


Abbildung 10 Änderung der Intensität und des Phasenwinkels aufgrund der Desinfektion mit 96 prozentigem Ethanol (blau: vor Desinfektion; orange: nach Desinfektion)

3.1.3 Wasserstoffperoxid 3 %

Tabelle 4 Desinfektion mit Wasserstoffperoxid (3 %)

Sauerstoff				
	Luft gesättigtes Wasser [dφ]	Luft gesättigtes Wasser (Intensität)	Na ₂ SO ₃ [dφ]	Na ₂ SO ₃ (Intensität)
\bar{x}_{\min_VOR}	21,577	190,100	53,587	452,600
\bar{x}_{\min_NACH}	21,610	189,700	53,587	451,033
\bar{x}_{h_VOR}	21,610	189,733	53,653	322,200
\bar{x}_{h_NACH}	21,653	196,700	53,573	401,033

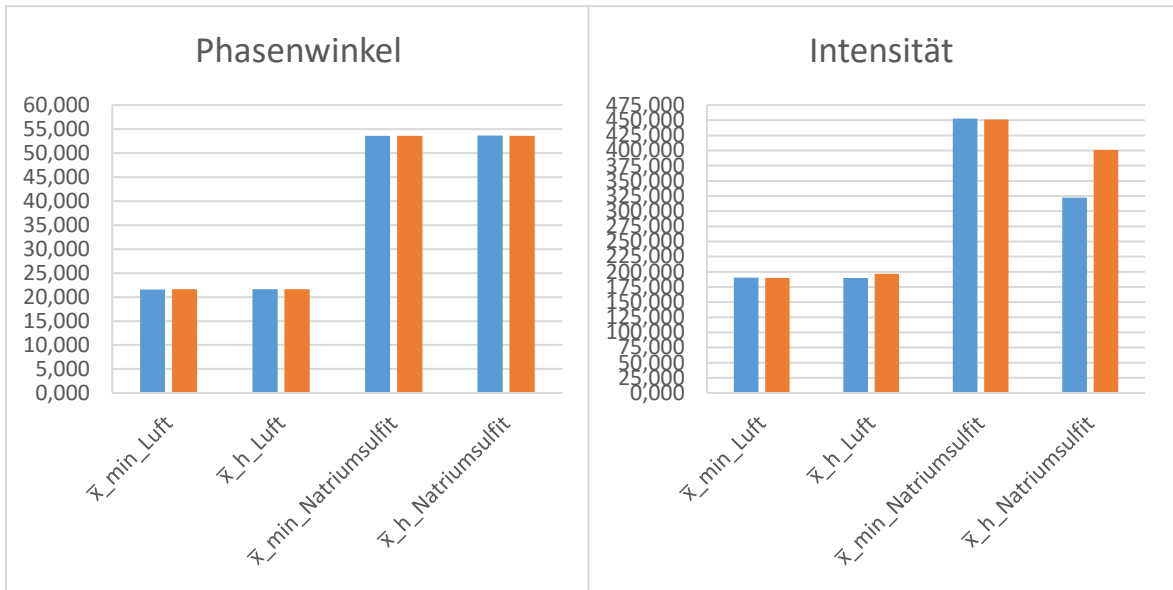


Abbildung 11 Änderung der Intensität und des Phasenwinkels aufgrund der Desinfektion mit 3 Prozentigem Wasserstoffperoxid (blau: vor Desinfektion; orange: nach Desinfektion)

3.1.4 Wasserstoffperoxid 15 %

Tabelle 5 Desinfektion mit Wasserstoffperoxid (15 %)

Sauerstoff				
	Luft gesättigtes Wasser [dφ]	Luft gesättigtes Wasser (Intensität)	Na ₂ SO ₃ [dφ]	Na ₂ SO ₃ (Intensität)
\bar{x}_{\min_VOR}	21,787	175,167	53,480	414,800
\bar{x}_{\min_NACH}	21,773	175,100	53,483	414,600
\bar{x}_{h_VOR}	21,723	174,567	53,443	412,867
\bar{x}_{h_NACH}	21,723	175,067	53,420	408,067

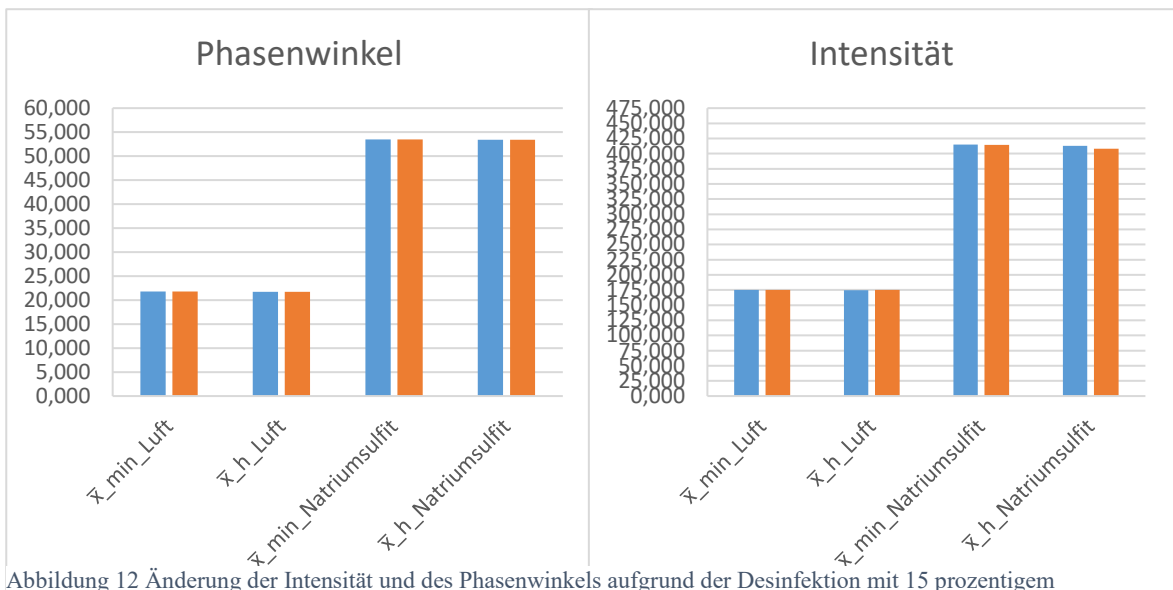


Abbildung 12 Änderung der Intensität und des Phasenwinkels aufgrund der Desinfektion mit 15 Prozentigem Wasserstoffperoxid (blau: vor Desinfektion; orange: nach Desinfektion)

3.1.5 Wasserstoffperoxid 30 %

Tabelle 6 Desinfektion mit Wasserstoffperoxid (30 %)

Sauerstoff				
	Luft gesättigtes Wasser [dφ]	Luft gesättigtes Wasser (Intensität)	Na ₂ SO ₃ [dφ]	Na ₂ SO ₃ (Intensität)
\bar{x}_{\min_VOR}	21,720	173,000	53,413	413,400
\bar{x}_{\min_NACH}	21,730	171,967	53,410	413,667
\bar{x}_{h_VOR}	21,777	171,900	53,390	403,367
\bar{x}_{h_NACH}	21,797	173,300	53,347	403,933

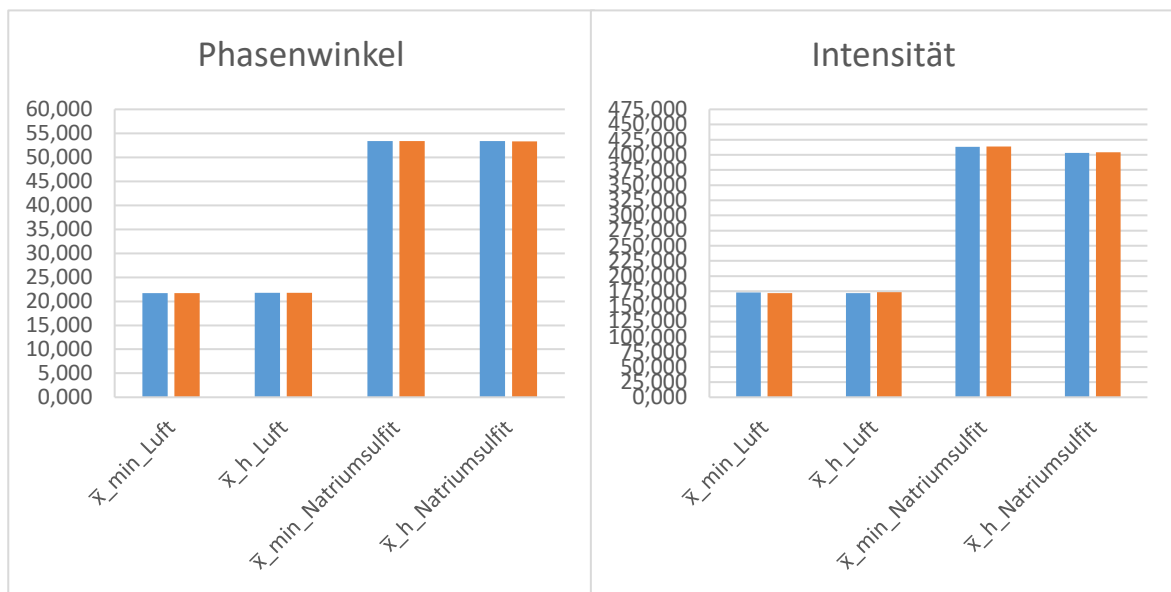


Abbildung 13 Änderung der Intensität und des Phasenwinkels aufgrund der Desinfektion mit 30-prozentigem Wasserstoffperoxid (blau: vor Desinfektion; orange: nach Desinfektion)

3.1.6 1-Propanol (60 %)

Tabelle 7 Desinfektion mit 1-Propanol (60 %)

Sauerstoff				
	Luft gesättigtes Wasser [dφ]	Luft gesättigtes Wasser (Intensität)	Na ₂ SO ₃ [dφ]	Na ₂ SO ₃ (Intensität)
\bar{x}_{\min_VOR}	21,900	170,233	53,087	394,167
\bar{x}_{\min_NACH}	21,957	169,867	52,997	387,133
\bar{x}_{h_VOR}	22,053	172,400	52,980	391,433
\bar{x}_{h_NACH}	22,040	168,633	52,950	396,967

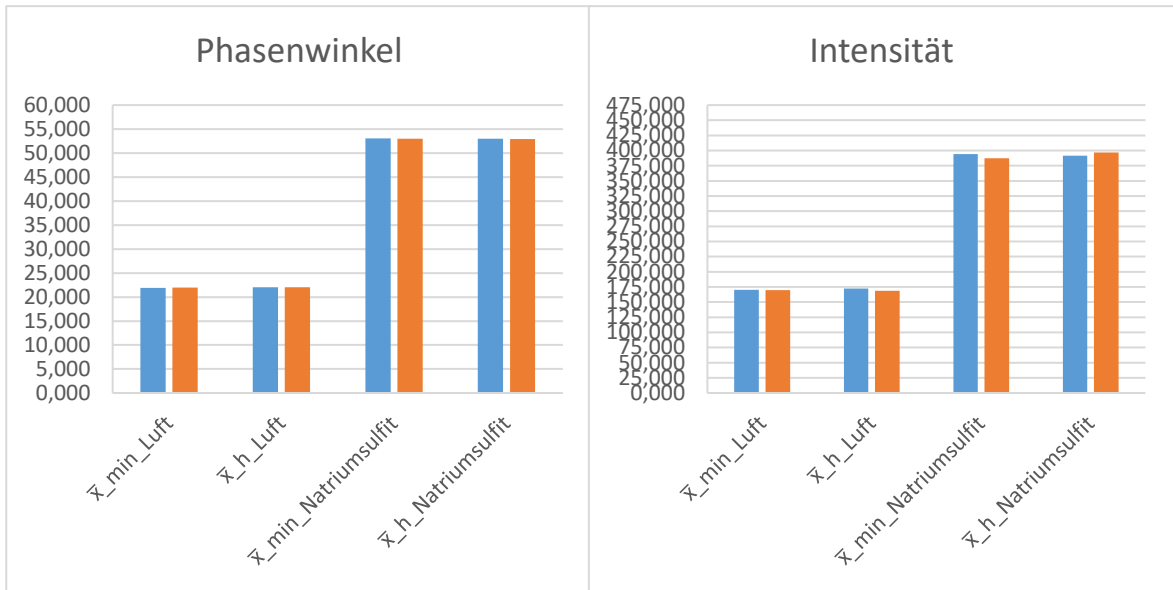


Abbildung 14 Änderung der Intensität und des Phasenwinkels aufgrund der Desinfektion mit 60 prozentigem 1-Propanol (blau: vor Desinfektion; orange: nach Desinfektion)

3.1.7 2-Propanol (60 %)

Tabelle 8 Desinfektion mit 2-Propanol (60 %)

Sauerstoff				
	Luft gesättigtes Wasser [dφ]	Luft gesättigtes Wasser (Intensität)	Na ₂ SO ₃ [dφ]	Na ₂ SO ₃ (Intensität)
\bar{x}_{\min_VOR}	21,577	170,333	53,120	405,633
\bar{x}_{\min_NACH}	21,663	174,267	53,103	407,733
\bar{x}_{h_VOR}	21,643	172,467	53,067	406,467
\bar{x}_{h_NACH}	21,713	177,067	53,040	404,267

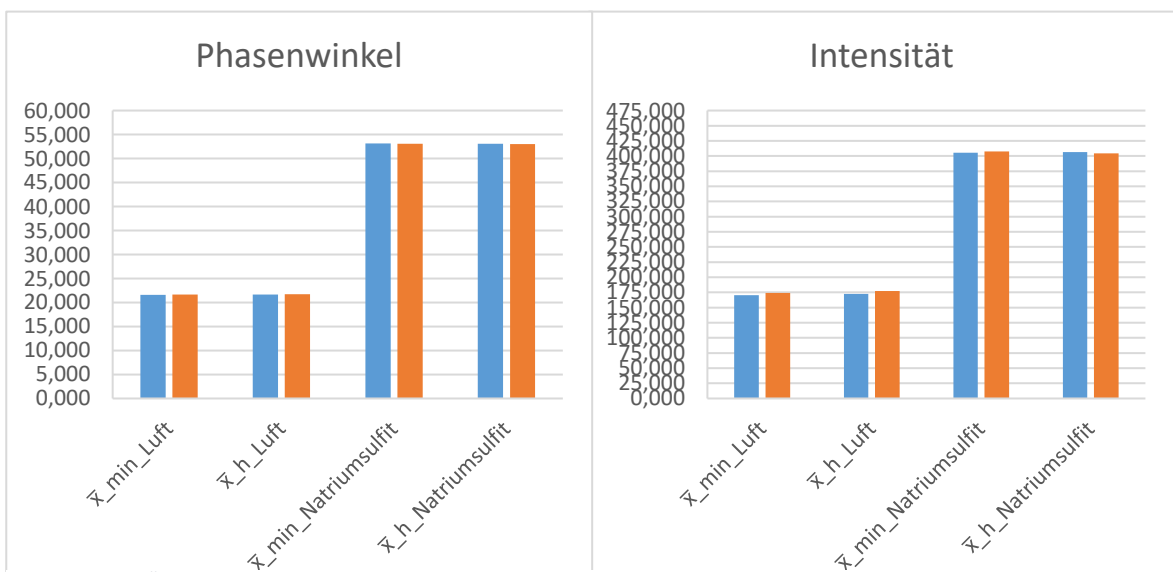


Abbildung 15 Änderung der Intensität und des Phasenwinkels aufgrund der Desinfektion mit 60 prozentigem 2-Propanol (blau: vor Desinfektion; orange: nach Desinfektion)

3.1.8 Peroxyessigsäure (0,5 %)

Tabelle 9 Desinfektion mit Peroxyessigsäure (0,5 %)

Sauerstoff				
	Luft gesättigtes Wasser [dφ]	Luft gesättigtes Wasser (Intensität)	Na ₂ SO ₃ [dφ]	Na ₂ SO ₃ (Intensität)
\bar{x}_{\min_VOR}	20,217	132,467	45,627	246,500
\bar{x}_{\min_NACH}	20,243	131,500	45,527	260,667
\bar{x}_{h_VOR}	21,437	151,083	52,997	413,567
\bar{x}_{h_NACH}	20,080	123,867	48,047	317,567

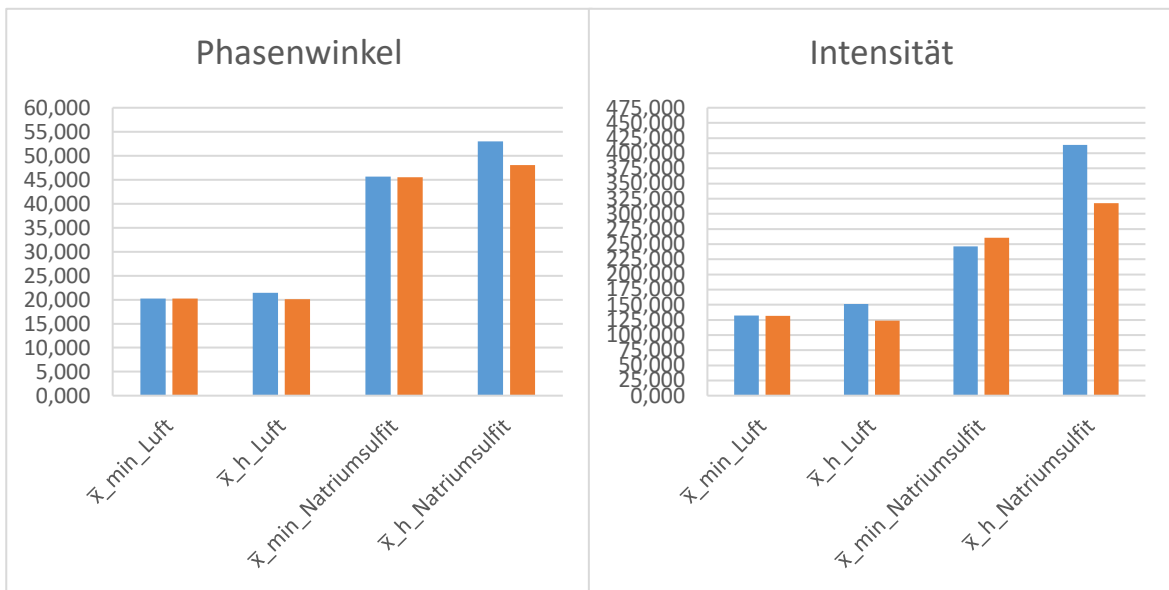


Abbildung 16 Änderung der Intensität und des Phasenwinkels aufgrund der Desinfektion mit 0,5-prozentiger Peroxyessigsäure (blau: vor Desinfektion; orange: nach Desinfektion)

3.1.9 Natriumhypochlorit (5 %)

Tabelle 10 Desinfektion mit Natriumhypochlorit (5 %)

Sauerstoff				
	Luft gesättigtes Wasser [dφ]	Luft gesättigtes Wasser (Intensität)	Na ₂ SO ₃ [dφ]	Na ₂ SO ₃ (Intensität)
\bar{x}_{\min_VOR}	20,970	153,533	49,050	341,267
\bar{x}_{\min_NACH}	20,963	153,833	48,950	335,733
\bar{x}_{h_VOR}	20,877	148,500	48,437	321,100
\bar{x}_{h_NACH}	20,957	142,767	48,910	339,500

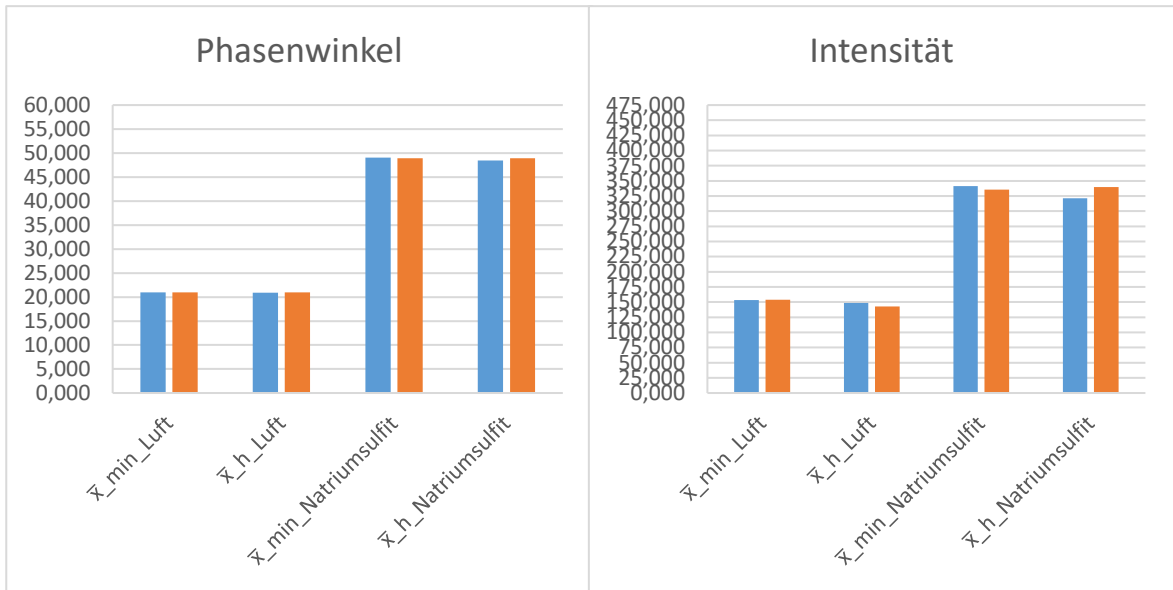


Abbildung 17 Änderung der Intensität und des Phasenwinkels aufgrund der Desinfektion mit 5 Prozentigem Natriumhypochlorit (blau: vor Desinfektion; orange: nach Desinfektion)

3.1.10 Glutaraldehyd (3 %)

Tabelle 11 Desinfektion mit Glutaraldehyd (3 %)

Sauerstoff				
	Luft gesättigtes Wasser [dφ]	Luft gesättigtes Wasser (Intensität)	Na ₂ SO ₃ [dφ]	Na ₂ SO ₃ (Intensität)
\bar{x}_{\min_VOR}	21,250	157,067	49,017	336,367
\bar{x}_{\min_NACH}	21,227	154,500	49,023	333,767
\bar{x}_{h_VOR}	21,247	155,100	48,980	337,800
\bar{x}_{h_NACH}	21,257	158,733	49,003	337,900

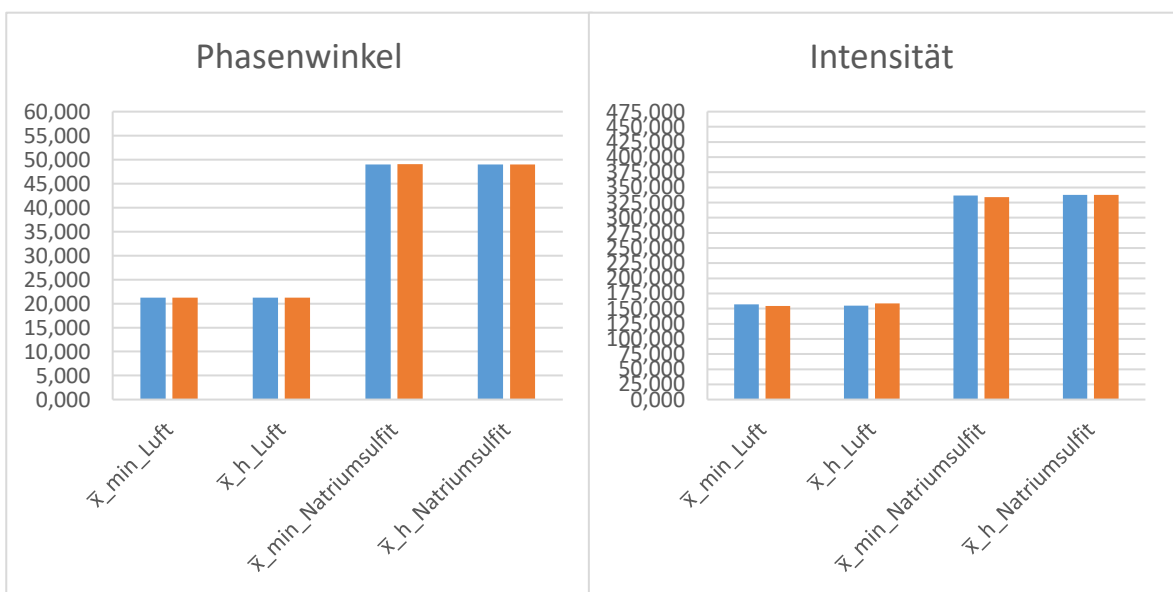


Abbildung 18 Änderung der Intensität und des Phasenwinkels aufgrund der Desinfektion mit 3 Prozentigem Glutaraldehyd (blau: vor Desinfektion; orange: nach Desinfektion)

3.1.11 Triclosan (2 %)

Tabelle 12 Desinfektion mit Triclosan (2 %)

Sauerstoff				
	Luft gesättigtes Wasser [dφ]	Luft gesättigtes Wasser (Intensität)	Na ₂ SO ₃ [dφ]	Na ₂ SO ₃ (Intensität)
$\bar{x}_{\text{min_VOR}}$	20,880	152,233	49,513	336,167
$\bar{x}_{\text{min_NACH}}$	20,870	149,767	49,543	339,900
$\bar{x}_{\text{h_VOR}}$	20,880	154,933	49,233	341,600
$\bar{x}_{\text{h_NACH}}$	20,620	147,200	49,337	348,600

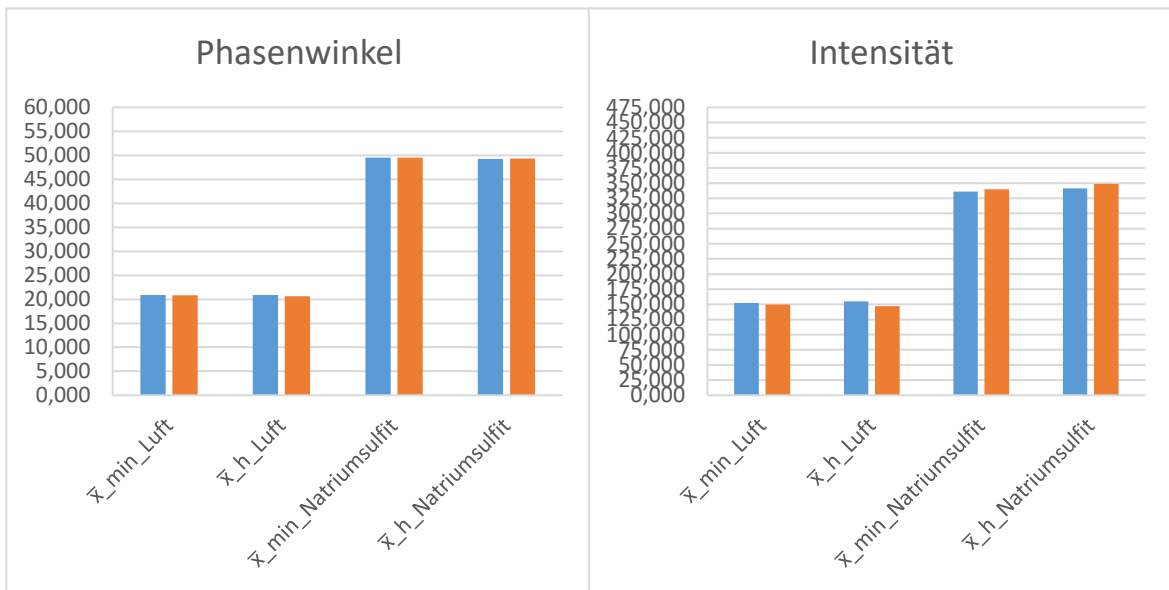


Abbildung 19 Änderung der Intensität und des Phasenwinkels aufgrund der Desinfektion mit 2 prozentigem Triclosan (blau: vor Desinfektion; orange: nach Desinfektion)

3.1.12 Chloramin T (1 %)

Tabelle 13 Desinfektion mit Chloramin T (1 %)

Sauerstoff				
	Luft gesättigtes Wasser [dφ]	Luft gesättigtes Wasser (Intensität)	Na ₂ SO ₃ [dφ]	Na ₂ SO ₃ (Intensität)
$\bar{x}_{\text{min_VOR}}$	21,550	159,400	49,523	349,167
$\bar{x}_{\text{min_NACH}}$	21,557	159,433	49,520	348,833
$\bar{x}_{\text{h_VOR}}$	21,407	157,567	49,493	343,633
$\bar{x}_{\text{h_NACH}}$	21,553	160,300	49,523	348,500

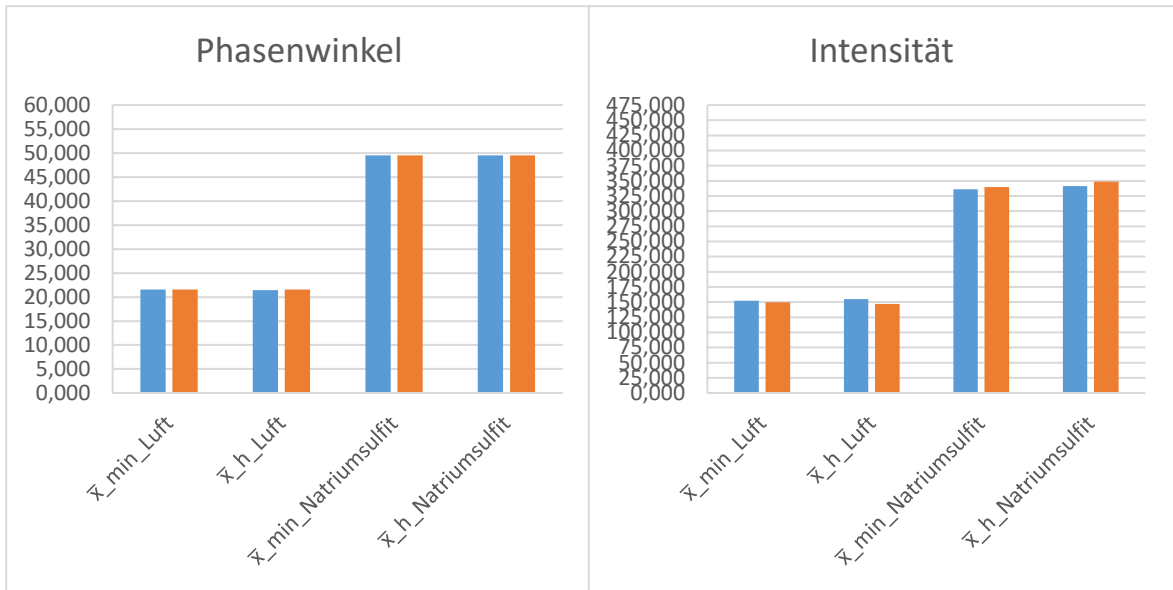


Abbildung 20 Änderung der Intensität und des Phasenwinkels aufgrund der Desinfektion mit 1 prozentigem Chloramin T (blau: vor Desinfektion; orange: nach Desinfektion)

3.1.13 CTAB (10 %)

Tabelle 14 Desinfektion mit CTAB (10 %)

Sauerstoff				
	Luft gesättigtes Wasser [dφ]	Luft gesättigtes Wasser (Intensität)	Na ₂ SO ₃ [dφ]	Na ₂ SO ₃ (Intensität)
\bar{x}_{min_VOR}	20,490	142,767	49,670	336,467
\bar{x}_{min_NACH}	20,553	137,467	49,657	330,933
\bar{x}_{h_VOR}	20,517	143,300	49,533	340,100
\bar{x}_{h_NACH}	20,387	143,767	49,670	337,467

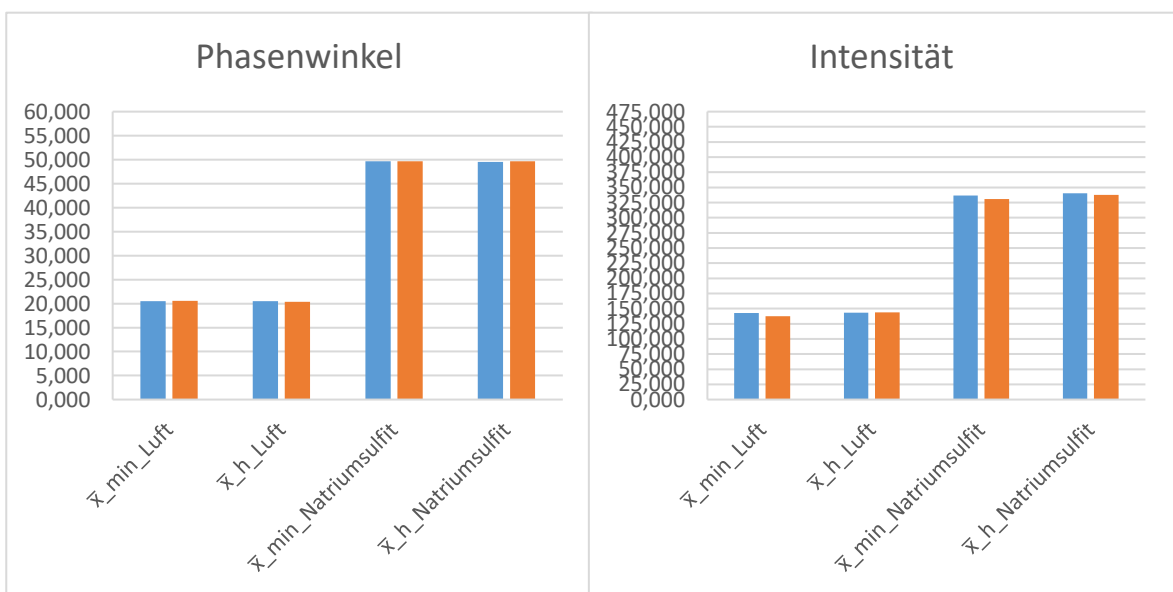


Abbildung 21 Änderung der Intensität und des Phasenwinkels aufgrund der Desinfektion mit 10 prozentigem CTAB (blau: vor Desinfektion; orange: nach Desinfektion)

3.1.14 2-Phenylphenol (4 %)

Tabelle 15 Desinfektion mit 2-Phenylphenol (4 %)

Sauerstoff				
	Luft gesättigtes Wasser [dφ]	Luft gesättigtes Wasser (Intensität)	Na ₂ SO ₃ [dφ]	Na ₂ SO ₃ (Intensität)
\bar{x}_{\min_VOR}	20,393	128,133	49,700	334,567
\bar{x}_{\min_NACH}	20,290	126,767	49,540	344,100
\bar{x}_{h_VOR}	20,303	126,867	49,720	332,867
\bar{x}_{h_NACH}	19,793	121,333	49,710	336,000

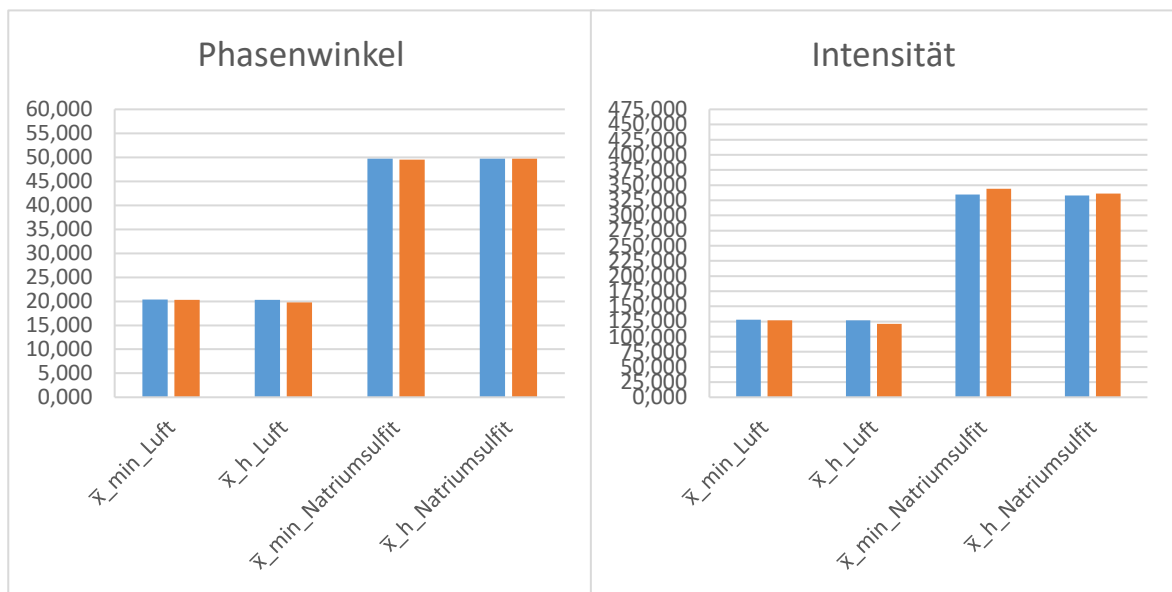


Abbildung 22 Änderung der Intensität und des Phasenwinkels aufgrund der Desinfektion mit 4 Prozentigem 2-Phenylphenol (blau: vor Desinfektion; orange: nach Desinfektion)

3.1.15 Wasserdampfsterilisation

Tabelle 16 Heißdampfsterilisation im Autoklav

	kurze Sonde_1		kurze Sonde_2	
	Sauerstoff		Sauerstoff	
	Na ₂ SO ₃ [dφ]	Na ₂ SO ₃ (Intensität)	Na ₂ SO ₃ [dφ]	Na ₂ SO ₃ (Intensität)
\bar{x}_{VOR}	52,357	321,033	51,093	201,033
\bar{x}_{NACH}	52,287	155,500	51,033	131,400
$\bar{x}_{NACH_trocknen}$	52,273	139,367	51,140	129,667
	lange Sonde_1		lange Sonde_2	
	Sauerstoff		Sauerstoff	
	Na ₂ SO ₃ [dφ]	Na ₂ SO ₃ (Intensität)	Na ₂ SO ₃ [dφ]	Na ₂ SO ₃ (Intensität)
\bar{x}_{VOR}	51,067	323,900	46,760	259,433
\bar{x}_{NACH}	50,530	325,433	48,000	247,700

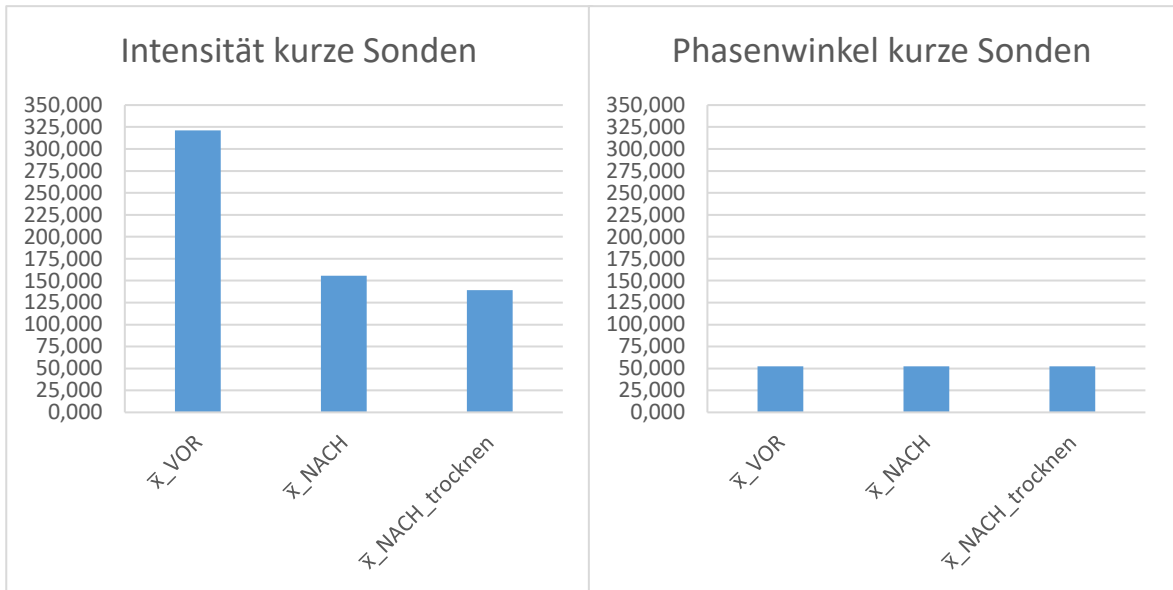


Abbildung 23 Änderung der Intensität (links) und des Phasenwinkels (rechts) optischer Sauerstoffsonden mit kurzem Kabel infolge der Heißdampfsterilisation im Autoklav (\bar{x}_{VOR} : Mittelwert der Intensität vor der Sterilisation; \bar{x}_{NACH} : Mittelwert der Intensität nach der Sterilisation; $\bar{x}_{\text{NACH_trocknen}}$: Mittelwert der Intensität nach der Sterilisation und nach dem Trocknen)

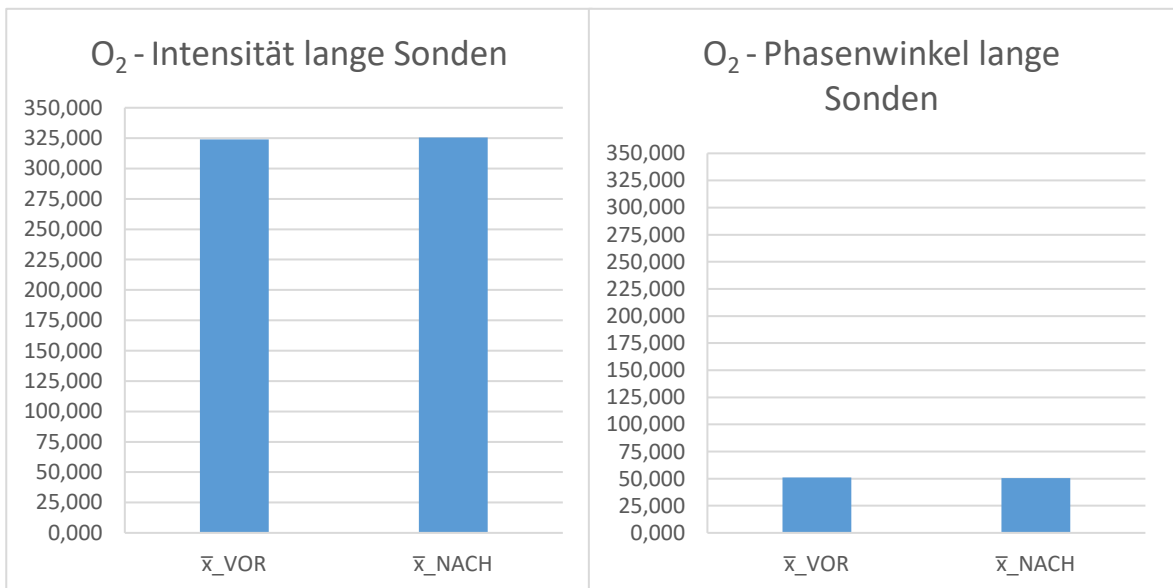


Abbildung 24 Änderung der Intensität (links) und des Phasenwinkels (rechts) optischer Sauerstoffsonden mit langem Kabel infolge der Heißdampfsterilisation im Autoklav (\bar{x}_{VOR} : Mittelwert der Intensität vor der Sterilisation; \bar{x}_{NACH} : Mittelwert der Intensität nach der Sterilisation)

3.2 Desinfektion und Sterilisation optischer Temperatursonden

Von der Darstellung der genauen Messergebnisse der Änderungen der Intensität sowie der Temperatur aufgrund einer Desinfektion und Sterilisation optischer Temperatursensoren – ähnlich der optischen Sauerstoffsensoren – soll in diesem Punkt Abstand genommen werden. Zum einen konnte bei keiner der Messungen ein Nennenswerter Intensitätsverlust nachgewiesen werden und zum anderen wurde bei allen Messungen eine große Fluktuation der gemessenen Werte beobachtet werden. Dass diese Fluktuationen nicht auf den Vorgang der Desinfektion oder der Sterilisation zurückzuführen ist, konnte – wie in Abbildung 25 ersichtlich – mit der Referenzmessung mit dem „Desinfektionsmittel“ Wasser dargestellt werden, bei der eine große Änderung der Temperatur resultierte:

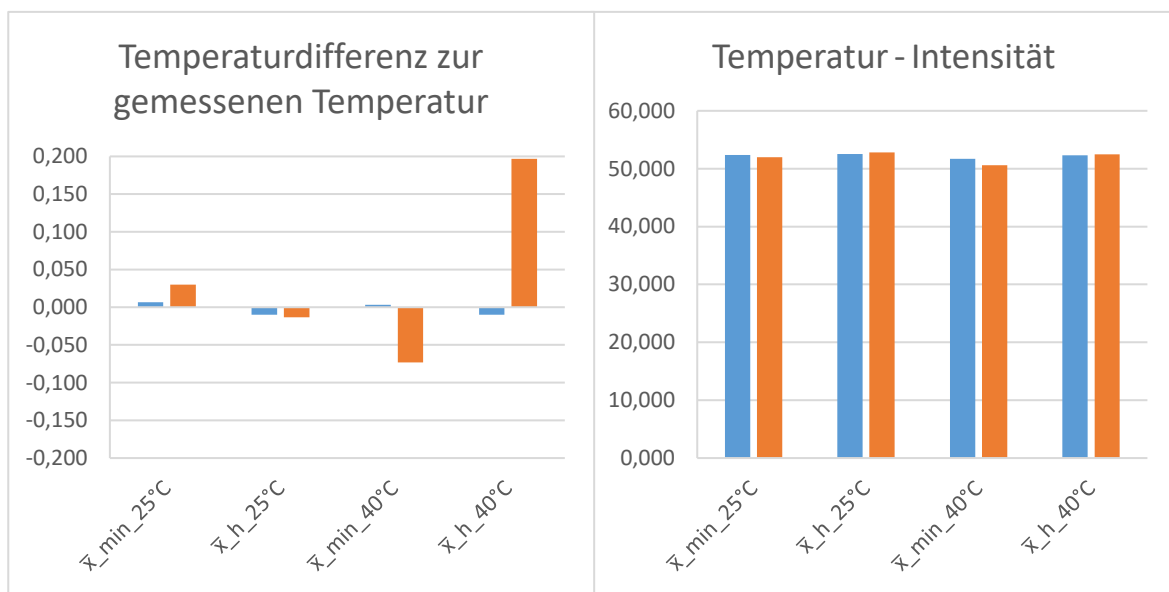


Abbildung 25 Temperaturdifferenz zur extern gemessenen Temperatur und Änderung der Intensität aufgrund der „Desinfektion“ mit Wasser (blau: vor Desinfektion; orange: nach Desinfektion)

3.3 Sauerstoffmessungen in Kulturmedien mit und ohne Ölschicht

Im Folgenden wird die Sauerstoffanreicherung in Embryokulturmedien (im Anschluss an eine Inkubation unter Sauerstoffreduktion) für Kulturmedien mit bzw. ohne Mineralölschicht dargestellt (Abbildung 26). Des Weiteren wird die gleiche Graphik mit Augenmerk auf die ersten zehn Minuten gezeigt (Abbildung 27).

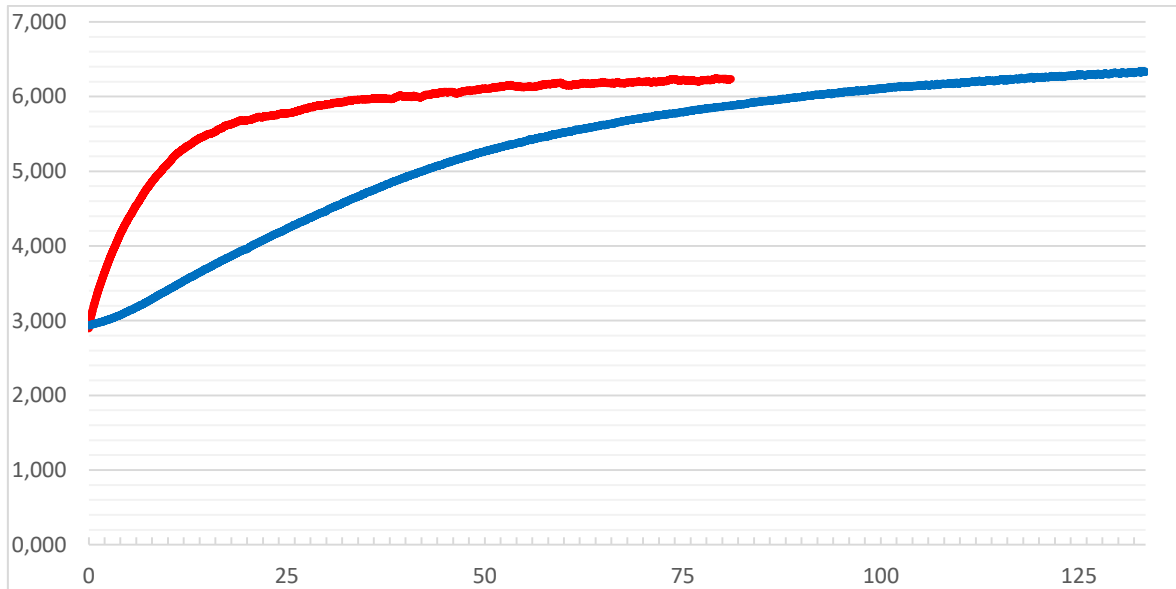


Abbildung 26 Vergleich der Änderung der Sauerstoffkonzentration in einem Embryokulturmedium bei Vorhandensein einer Mineralölschicht (blau) und ohne Mineralölschicht (rot); x-Achse = [min]; y-Achse = [mg/L]

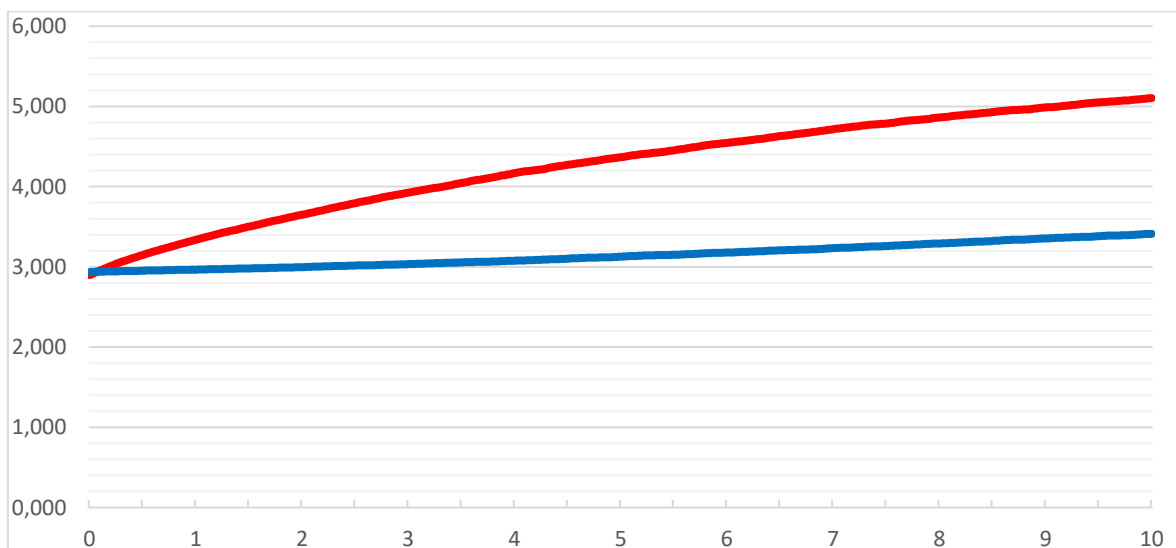


Abbildung 27 Vergleich der Änderung der Sauerstoffkonzentration in einem Embryokulturmedium bei Vorhandensein einer Mineralölschicht (blau) und ohne Mineralölschicht (rot) während der ersten 10 Minuten nach Entnahme aus dem Inkubator; x-Achse = [min]; y-Achse = [mg/L]

Neben der Betrachtung der unterschiedlichen Sauerstoffdynamiken in Bezug auf das Vorhandensein einer Mineralölschicht wurde ein zweiter Effekt der Mineralölschicht augenscheinlich, der bei der Darstellung von Einzelmessungen auffällt. Während es bei der

Einzelmessung der Sauerstoffanreicherung unter der Verwendung einer Mineralölschicht kaum zu temporären Schwankungen kommt, sind kurzfristige Fluktuationen bei der Messung ohne Mineralölschicht deutlich sichtbar. Diese Effekte werden in den Abbildungen 28 und 29 dargestellt.

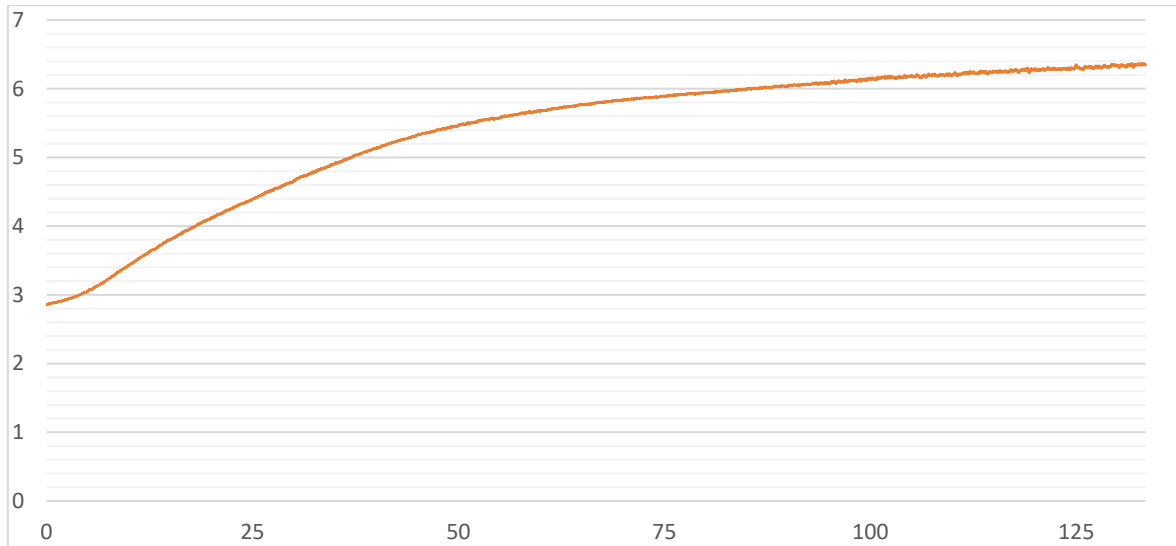


Abbildung 28 Änderung der Sauerstoffkonzentration in einem Embryokulturmedium bei Vorhandensein einer Mineralölschicht (Einzelmessung); x-Achse = [min]; y-Achse = [mg/L]

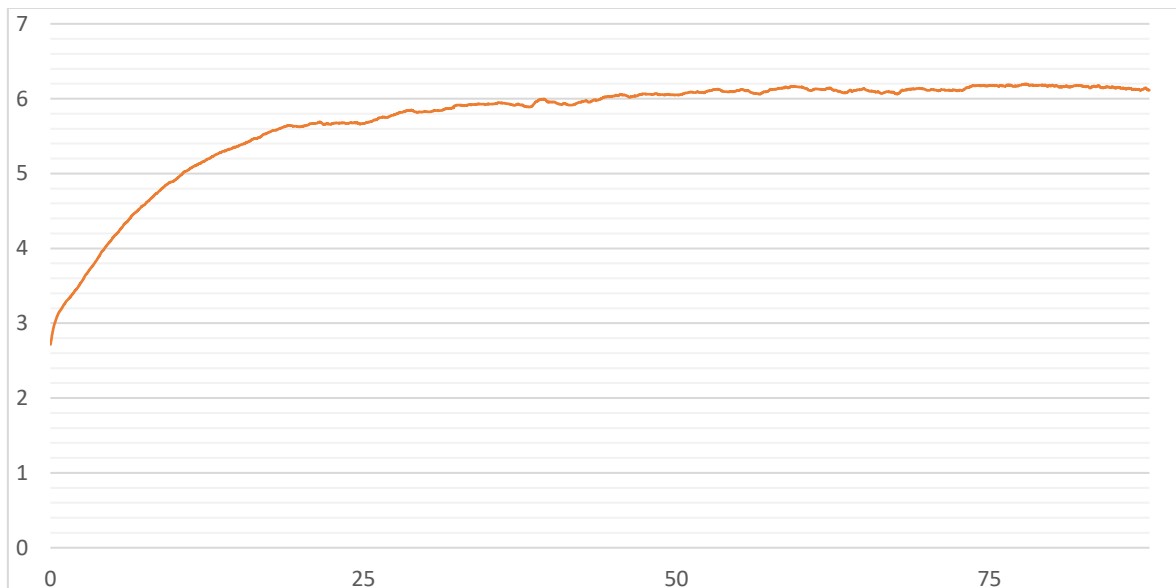


Abbildung 29 Änderung der Sauerstoffkonzentration in einem Embryokulturmedium ohne Vorhandensein einer Mineralölschicht (Einzelmessung); x-Achse = [min]; y-Achse = [mg/L]

4 Diskussion

4.1 Desinfektion und Sterilisation optischer Sonden

Für Sensoren, die in der Medizin eingesetzt werden und für biochemische Untersuchungen im Einsatz sind, besteht die Notwendigkeit der Aufbereitung – sei es das Ziel der Sterilität oder der Keimarmut durch eine Desinfektion. Diese Ziele sind nicht immer einfach zu bewerkstelligen, da der Prozess der Aufbereitung eine Schädigung einzelner Sensorbestandteile oder des gesamten Sensors, die die Leistung des Sensors einschränkt, zur Folge haben kann.

Für eine routinemäßige Verwendung optischer Sensoren – die keine Einmalprodukte darstellen – muss eine Risikobewertung und Einstufung vor der Aufbereitung bezüglich des Infektionsrisikos vorgenommen werden. Für diese Bewertung ist grundsätzlich der Hersteller verantwortlich, in Zweifelsfällen sollte jedoch die Einstufung in die nächst höhere Risikokategorie erfolgen. In allen Fällen erfordert die Einstufung eines Produktes in die Klassen „semikritisch“ sowie „kritisch“ nach der Vorbereitung sowohl Reinigung und Desinfektion als auch die Sterilisation des Produktes. Die *CDC* sowie die *Kommission für Krankenhaushygiene Infektionsprävention (KRINKO)* gibt für kritische Produkte als Mittel der Wahl die Wasserdampfsterilisation an (9,10). Diese Methode ist, wie in Abbildung 23 und Abbildung 24 ersichtlich, für optische Sauerstoffsonden ohne eine erneute Kalibrierung nach der Sterilisation möglich. Bezüglich der Intensität wurden unterschiedliche Ergebnisse dargestellt; bei einem Teil der Sensoren (mit kurzem Lichtleiterkabel) kam es infolge der Sterilisation zu einem Intensitätsabfall. Für hitzeinstabile Produkte empfiehlt die *CDC* eine Sterilisation mittels Ethylenoxid, Wasserstoffperoxid-Gasplasma oder wenn diese Methoden ungeeignet erscheinen, eine chemische Desinfektion mit Desinfektionsmittel auf Glutaraldehydbasis ($\geq 2,4$ %), Glutaraldehyd (0,95 %) mit Phenol (1,64 %) und Wasserstoffperoxid (7,53 %) mit Peroxyessigsäure (0,23 %). Eine Sterilisation mit diesen Desinfektionsmitteln kann unter Berücksichtigung der (laut Hersteller) angemessenen Konzentration, Einwirkzeit, Temperatur und pH-Wert verlässlich erreicht werden (9).

In den oben gezeigten Tabellen und Abbildungen wird ersichtlich, dass die Behandlung optischer Sauerstoffsensoren in diesem Zusammenhang vor allem mit Glutaraldehyd, Phenol, und Wasserstoffperoxid ohne negative Auswirkung auf die Funktion der Sensoren durchgeführt werden kann. Bei Peroxyessigsäure wurden eine Änderung des Phasenwinkels und eine Abnahme der Intensität aufgrund der Behandlung mit Peroxyessigsäure beobachtet. Daraus resultiert auf der einen Seite eine falsche Sauerstoffmessung nach der Behandlung,

die mit einer erneuten Kalibrierung der Sonde aufgehoben werden kann, und auf der anderen Seite eine herabgesetzte Haltbarkeit.

Für die manuelle Desinfektion bei Produkten der Risikoklasse „semikritisch“ und „kritisch“ sollte laut Empfehlungen der *KRINKO* und der *Österreichischen Gesellschaft für Sterilgutversorgung* (ÖGSV) von der *Österreichischen Gesellschaft für Hygiene, Mikrobiologie und Präventivmedizin* (ÖGHMP), dem *Verbund für angewandte Hygiene* (VAH) oder vom *Robert Koch Institut* (RKI) zertifizierte Desinfektionsmittel verwendet werden (10,84).

4.2 Embryokulturmedien mit und ohne Mineralölschicht und dessen Auswirkungen auf das Sauerstoffverhalten

Wie die Abbildungen 26 und 27 zeigen, liegt der gemessene Ausgangswert der Konzentration des gelösten Sauerstoffes im Embryokulturmedium bei 2,898 mg/L (ohne Mineralölschicht) bzw. bei 2,936 mg/L (mit Mineralölschicht). Diese Werte entsprechen 42,80 % respektive 43,36 % des von der *U.S. Geological Survey* gemessenen Wertes für gelösten Sauerstoff in Wasser bei 37 °C und dem Luftdruck von Graz (1022 hPa), der bei 6,77 mg/L liegt (85). Dieser Maximalwert wurde im Rahmen der Messungen in Embryokultur nicht erreicht. Bei einer Einzelmessung (mit Ölschicht) konnte dieser Wert nach einer Messzeit von 2 Stunden und 39 Minuten annähernd gemessen werden (6,68 mg/L) weshalb davon auszugehen ist, dass sich bei längerer Messdauer ein Äquilibrium in diesem Bereich einstellen würde.

In den Abbildungen 26 und 27 ist ebenso ersichtlich, dass die Sauerstoffanreicherung nach der Entnahme aus dem Inkubator beim Vorhandensein der Mineralölschicht deutlich verzögert verläuft im Vergleich zur Messung ohne Ölschicht. So liegt der durchschnittliche Wert des gelösten Sauerstoffes nach zehn Minuten bei Vorhandensein der Ölschicht bei 3,412 mg/L (\cong 50,40 %) und bei fehlender Mineralölschicht bei 5,104 mg/L (\cong 75,40 %). Auch nach einer Messzeit von 81 Minuten konnte noch ein Unterschied festgestellt werden (5,876 mg/L \cong 86,80 % vs. 6,235 mg/L \cong 92,10 %).

Wie in Kapitel 1.3.3 bereits erläutert, hat die Sauerstoffkonzentration als ein Parameter der Kulturbedingungen in der Inkubation von Embryos einen großen Einfluss auf die Entwicklung der Zellen. Mehrere Studien haben gezeigt, dass diese Tatsache vor allem im Zusammenhang mit der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies steht, die mit DNA-Schäden, Lipidperoxidation, mitochondrialen Störungen und Apoptose-Induktion einhergeht (86,87). Es ist grundsätzlich bekannt, dass jeder aerobe Organismus ständig kleine Mengen an ROS produziert, zu denen (als wichtigster Vertreter) das Hydroperoxid-Anion ($O_2^{\cdot-}$), Wasserstoffperoxid, Hydroxyl-Radikal (HO^{\cdot}) gehören. Diese werden als Nebenprodukt bei oxidativen Phosphorylierung im Rahmen der ATP-Bereitstellung durch die Atmungskette (vor allem im Blastocystenstadium) produziert. Neben der endogenen ROS-Produktion können diese auch durch exogene Faktoren beeinflusst werden. Als wichtigster exogener Faktor sollte hier die Sauerstoffkonzentration genannt werden. Oxidasen (die für die endogene Produktion von ROS mitverantwortlich sind) funktionieren Sauerstoffabhängig, sodass hyperoxische Bedingungen die Enzymaktivität steigern und die ROS Produktion

beschleunigen. Darüber hinaus wurde ein gesteigerter Abbau von Glutathion (einem Protektionsmechanismus gegenüber ROS) bei atmosphärischen Sauerstoffbedingungen nachgewiesen. Als weitere exogene ROS-Quellen sollten ebenso das Vorhandensein von metallischen Kationen (Eisen und Kupfer), elektromagnetische Strahlung (auch in Form von sichtbarem Licht), Aminosäureoxidasen (die in Serum – einem Bestandteil vieler Kulturmedien) und Spermatozoen genannt werden. Letztere könnten ein Argument für kurze Inseminationszeiten darstellen (88). Die genannten exogenen ROS-Quellen wurden auch von einer Japanischen Studie bestätigt, die verschiedene Kulturparameter mit der H₂O₂-Konzentration im Kulturmedium von Mausembryos in Zusammenhang setzte. Dabei konnten niedrigere H₂O₂-Konzentrationen bei 5 % Sauerstoff gemessen werden als bei 20 %, respektive 40 %. Genauso wurden höhere Konzentrationen in Kulturmedien, die Eisen- und Kupfer-Ionen enthalten, sowie infolge einer Lichtexposition von länger als 5 Minuten (89).

Dass eine verminderte Sauerstoffkonzentration zu einer geringeren ROS-Produktion führt konnte in weiteren Studien mit verschiedenen Methoden nachgewiesen werden. So konnte Belli et al. (2019) zeigen, dass es mit steigender Sauerstoffkonzentration zu einer vermehrten ROS-Produktion bei Mausembryos kommt. Zusätzlich konnte diese Studie verdeutlichen, dass es bei atmosphärischen Sauerstoffbedingungen zu einer verminderten Genexpression von Glutathion gegenüber O₂-reduzierten Bedingungen kommt (86). In einer weiteren Studie von Ma et al. (2017) konnte ebenso der direkte Zusammenhang zwischen einer höheren ROS-konzentration (H₂O₂) und der Inkubation bei 20 % Sauerstoff (im Vergleich mit 3 % Sauerstoff) nachgewiesen werden. Diese Studie wies darüber hinaus, in der 20 % O₂-Gruppe signifikant mehr apoptotische Zellen nach (87). Ähnlich Ergebnisse konnte bereits eine Studie aus 1999 erzielen, die bei der Kultur von Mausembryos eine höhere Entwicklungsrate unter 5 % Umgebungssauerstoff nachwies und diese mit einer verminderten H₂O₂-Konzentration in Verbindung brachte (90).

Die genannten Studien haben den Zusammenhang der Konzentration des Umgebungssauerstoffes im Inkubator mit der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies und die damit verbundene klinischen Auswirkungen und Therapie-outcomes hergestellt. Da aus praktischen Gründen die Sauerstoffreduktion nur innerhalb des Inkubators aufrechterhalten werden kann, ist ein konsekutiver Anstieg der Sauerstoffkonzentration nach der Entnahme aus dem Inkubator unabwendbar. Eine Methode um den Anstieg der Sauerstoffreduktion

und damit auch der ROS-Konzentrationen könnte dabei die Verwendung einer Ölschicht darstellen.

Bisherige Studien haben ergeben, dass eine Mineralölschicht für Kulturen von reduzierten Volumina (20 μL – 50 μL) notwendig ist, um eine Evaporation der Flüssigkeit und damit einen Anstieg des osmotischen Druckes zu verhindern. Ebenso wurde ein stabilisierender Effekt auf den pH-Wert aufgrund eines verminderten Verlustes an CO_2 nachgewiesen (55,80). In Bezug auf das Sauerstoffverhalten schreibt Bavister 1995, dass es anzunehmen ist, dass es bei der Kultur von Embryos in kleinen Volumina unter einer Mineralölschicht zu lokalen Regionen verminderter Sauerstoffkonzentration (ohne die Kultur unter Sauerstoffreduktion) kommen kann. Dies wird durch die Sauerstoffaufnahme der Zellen in Kombination mit einer verzögerten Sauerstoffzufuhr aufgrund einer verminderten Diffusion durch die Ölschicht erklärt. Diese Annahmen wurden jedoch nicht durch Messungen bestätigt, sondern durch mathematische Modelle errechnet (91).

Eine weitere Studie untersuchte 1990 die Umgebungsvariablen der Kultur von Hamster Embryos. Hier wurde eine vermehrte Blastozystenentwicklung infolge einer Kultur unter einer Silikonölschicht unabhängig von der Sauerstoffkonzentration (5 %, 10 % oder 19 %) gezeigt. Dieser Vorteil wurde dabei nicht auf den osmotischen Druck oder die Evaporation von Kulturmedium zurückgeführt, da sich die Osmolarität in den unterschiedlichen Kulturmedien nicht signifikant unterschieden hat. Für diese Messungen wurden Sauerstoffsensoren verwendet, die eine wesentlich geringere Auflösung bereitstellen, als die in der vorliegenden Arbeit verwendeten optischen Sauerstoffsonden. Diese Studie impliziert einen bedeutenden Effekt einer Ölschicht auf den Sauerstoffpartialdruck im Kulturmedium: Unter der Annahme, die Sauerstoffkonzentration im Medium sei nur abhängig von der „Dicke“ der Schicht des Mediums, von der Löslichkeit und der Diffusionsrate im Medium, kann die unterschiedlich gemessene Konzentration nur aufgrund einer verminderten Diffusion durch die Ölschicht erklärt werden, da die zusätzliche „Dicke“ der Ölschicht vernachlässigbar gering ist. Wenn die Diffusion von Sauerstoff durch eine Ölschicht vermindert bzw. verzögert ist, kann angenommen werden, dass diese für eine günstige geringere Sauerstoffkonzentration im Kulturmedium verantwortlich ist (92,93).

Die Diffusion eines Gases in einer Flüssigkeit, wie in diesem Fall, ist bestimmt durch den jeweiligen Diffusionskoeffizienten, der proportional zur Temperatur und zur Boltzmann-Konstante, sowie indirekt proportional unter anderem zur Viskosität des Lösungsmittels ist, sodass für Lösungsmittel höherer Viskosität ein niedrigerer Diffusionskoeffizient und damit

ein niedrigeres Potenzial zur Diffusion entsteht. Aus diesem theoretischen Ansatz folgt, dass die Sauerstoffdiffusion durch ein Medium von der Viskosität abhängt. Für Wasser (bei 37 °C) wird eine Viskosität von deutlich unter 1 mPa*s angegeben, woraus ein Diffusionskoeffizient (für die Diffusion von Sauerstoff) von ca. $1,67 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ resultiert. Im Falle einer Studie von Stokes (aus 2009), bei der der Sauerstoffverbrauch von Mausembryos im Beisein einer Paraffinölschicht untersucht wurde, konnte für das verwendete Paraffinöl ein Diffusionskoeffizient von etwa zwei Drittel dessen von Wasser ermittelt, was mit einer verminderten Diffusion aufgrund der Ölschicht einhergeht (94).

In einer anderen Studie von Baltz und Biggers, die ebenso den Sauerstofftransport in microdrop Kulturen mit einer Ölschicht untersucht, wurde ein höherer Diffusionskoeffizient für Silikonöl beschrieben. Die gesteigerte Diffusion von Sauerstoff durch das Silikonöl lag jedoch an dem festen Aggregatzustand des Öls bzw. Fettes. Die Autoren beurteilen damit eine Bewertung der Ölschicht mit einer gesteigerten Diffusion als ungültig. Sie erklären sogar, dass Silikonöle mit geringem Molekulargewicht oder Mineralöle eine wesentlich geringere Diffusionskapazität besitzen und der diffundierende Sauerstoff die höhere Viskosität des Öls überwinden muss, während er bei festem Silikon und Silikonölen höheren Molekulargewichtes wesentlich einfacher die Polymermoleküle passieren kann. Es wird für Mineralöle eine Viskosität von etwa 100 mPa*s angenommen, was mit einem Diffusionskoeffizienten von $2 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ und damit einer hundertfach langsameren Diffusion gegenüber Wasser einhergeht (95).

Aus den genannten Studien geht hervor, dass die gemessene Änderung der Konzentration des gelösten Sauerstoffes im Wesentlichen durch eine verminderte Sauerstoffdiffusion durch die Verwendung einer Ölschicht über dem Kulturmedium bedingt ist. Dabei spielt vor allem der Diffusionskoeffizient des verwendeten Öls eine große Rolle. Dieser scheint bei Mineralölen besonders niedrig (im Vergleich mit Paraffin- oder Silikonölen) zu sein, sodass eine deutlich langsamere Diffusion stattfindet. Diese Tatsachen stimmen mit den Messungen dieser Arbeit überein, in denen die langsamere Diffusion durch eine verzögerte Steigerung der Sauerstoffkonzentration nach Inkubation in Sauerstoffreduktion dargestellt werden konnte. Damit konnte abschließend gezeigt werden, dass die Zeit bis zum Auftreten höherer Sauerstoffkonzentrationen durch die Verwendung einer Ölschicht verlängert werden, eine daraus resultierende potentiell gesteigerte ROS-Produktion verzögert werden und dadurch das klinische Outcome von klassischen Behandlungen wie der IVF und ICSI gesteigert werden kann.

5 Literaturverzeichnis

1. Ritgen U. Analytische Chemie I. 1st ed. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag GmbH; 2019.
2. Harris DC. Lehrbuch der quantitativen Analyse. 8th ed. Werner G, Werner T, editors. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag GmbH; 2014.
3. Ritgen U. Analytische Chemie II. 1st ed. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag GmbH; 2020.
4. Lakowicz JR. Principles of fluorescence spectroscopy. 3rd ed. Boston: Springer-Verlag US; 2006.
5. Skoog DA, Leary JJ. Instrumentelle Analytik. Grundlagen - Geräte - Anwendungen. 1st ed. Berlin Heidelberg; 1996.
6. Skoog DA, Holler JF, Crouch SR. Principles of Instrumental Analysis. 7th ed. Boston: Cengage Learning; 2016.
7. Hof H, Schlüter D, Dörries R, editors. Medizinische Mikrobiologie [Internet]. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2019. Available from: <https://eref.thieme.de/10.1055/b-006-163249>
8. Suerbaum S, Burchard G-D, Kaufmann SHE, Schulz TF, editors. Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2016. (Springer-Lehrbuch). Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-48678-8>
9. Rutala WA, Weber DJ. Disinfection and sterilization in healthcare facilities. Bennett Brachman's Hosp Infect Sixth Ed. 2013;(May).
10. Kommission für Krankenhaushygiene und I. Anforderungen an die Hygiene bei der Aufbereitung von Medizinprodukten: Empfehlung der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) beim Robert Koch-Institut (RKI) und des Bundesinstitutes für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfAr. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz. 2012;55(10):1244–310.
11. Russell AD. Principles of Antimicrobial Activity and Resistance. In: Block SS, editor. Disinfection, Sterilization, and Preservation. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p. 31–57. Principles of Antimicrobial Activity and Resistan. In: Block SS, editor. Disinfection, Sterilization, and Preservation. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p. 31–57.
12. Dettenkofer M, Daschner F. Umweltschonende Sterilisation und Desinfektion. In:

- Praktische Krankenhaushygiene und Umweltschutz [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1997. p. 201–21. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-09401-3_13
13. Dusseau J-Y, Duroselle P, Freney J. Gaseous Sterilization. In: Russell, Hugo & Ayliffe's [Internet]. Oxford, UK: Wiley-Blackwell; 2012. p. 306–32. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/9781118425831.ch15c>
 14. National Center for Biotechnology I. PubChem Compound Summary for CID 702, Ethanol [Internet]. 2020 [cited 2020 Sep 6]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/702>
 15. National Center for Biotechnology I. PubChem Compound Summary for CID 1031, Propanol [Internet]. 2020 [cited 2020 Sep 6]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1031>
 16. National Center for Biotechnology I. PubChem Compound Summary for CID 3776, Isopropyl alcohol [Internet]. 2020 [cited 2020 Sep 6]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3776>
 17. Sykes G. The influence of germicides on the dehydrogenases of *Bact. coli*: I. The succinic acid dehydrogenase of *Bact. coli*. *J Hyg.* 1939;39(4):463–9.
 18. Spire B, Montagnier L, Barré-Sinoussi F, Chermann JC. INACTIVATION OF LYMPHADENOPATHY ASSOCIATED VIRUS BY CHEMICAL DISINFECTANTS. *Lancet* [Internet]. 1984 Oct;324(8408):899–901. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673684906573>
 19. Rutala WA, Peacock JE, Gergen MF, Sobsey MD, Weber DJ. Efficacy of hospital germicides against adenovirus 8, a common cause of epidemic keratoconjunctivitis in health care facilities. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(4):1419–24.
 20. O'Connor HJ, Axon AT. Gastrointestinal endoscopy : infection and disinfection. *Gut.* 1983;24(11)(February):1067–77.
 21. National Center for Biotechnology I. PubChem Compound Summary for CID 712, Formaldehyde [Internet]. 2020 [cited 2020 Sep 16]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/712>
 22. National Center for Biotechnology I. PubChem Compound Summary for CID 3485, Glutaraldehyde [Internet]. 2020 [cited 2020 Sep 16]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3485>
 23. Rubbo SD, Gardner JF, Webb RL. Biocidal Activities of Glutaraldehyde and Related Compounds. *J Appl Bacteriol.* 1967;30(1):78–87.

24. Rutala WA, Weber DJ. Disinfection, Sterilization, and Control of Hospital Waste. Mand Mand Douglas, Bennett's Princ Pract Infect Dis 7th ed [Internet]. 2009;(January):3677–95. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-443-06839-3.00301-5>
25. National Center for Biotechnology I. PubChem Compound Summary for CID 996, Phenol [Internet]. 2020 [cited 2020 Sep 22]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/996>
26. McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. Clin Microbiol Rev [Internet]. 1999 Jan;12(1):147–79. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9880479>
27. Rutala WA, Weber DJ. Uses of inorganic hypochlorite (bleach) in health-care facilities. Clin Microbiol Rev. 1997;10(4):597–610.
28. Bloomfield SF, Arthur M. Interaction of Bacillus subtilis spores with sodium hypochlorite, sodium dichloroisocyanurate and chloramine-T. J Appl Bacteriol. 1992;72(2):166–72.
29. Best M, Springthorpe VS, Sattar SA. Feasibility of a combined carrier test for disinfectants: studies with a mixture of five types of microorganisms. AJIC Am J Infect Control. 1994;22(3):152–62.
30. Wigginton KR, Kohn T. Virus disinfection mechanisms: The role of virus composition, structure, and function. Curr Opin Virol. 2012;2(1):84–9.
31. Mbithi JN, Springthorpe VS, Sattar SA. Chemical disinfection of hepatitis A virus on environmental surfaces. Appl Environ Microbiol. 1990;56(11):3601–4.
32. National Center for Biotechnology I. PubChem Compound Summary for CID 784, Hydrogen peroxide [Internet]. 2020 [cited 2020 Sep 23]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/784>
33. Maillard J. Innate resistance to sporicides and potential failure to decontaminate q. J Hosp Infect [Internet]. 2011;77(3):204–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2010.06.028>
34. Rogers J V, Sabourin CLK, Choi YW, Richter WR, Rudnicki DC, Riggs KB. Decontamination assessment of Bacillus anthracis , Bacillus subtilis , and Geobacillus stearothermophilus spores on indoor surfaces using a hydrogen peroxide gas generator. J Appl Microbiol. 2005;99:739–48.
35. Klapest NA, Vesley D. Vapor-Phase Hydrogen Peroxide as a Surface Decontaminant and Sterilant. Appl Environ Microbiol. 1990;56(2):503–6.

36. Vesley D, Norlien KG, Nelson B, Ott B, Streifel AJ. Significant factors in the disinfection and sterilization of flexible endoscopes. *AJIC Am J Infect Control*. 1992;20:291–300.
37. National Center for Biotechnology I. PubChem Compound Summary for CID 6585, Peracetic acid [Internet]. 2020. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6585>
38. Crow S. Peracetic Acid Sterilization: A Timely Development for a Busy Healthcare Industry. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1992;13(2):111–3.
39. Malchesky PS. Peracetic Acid and Its Application to Medical Instrument Sterilization. *Artif Organs*. 1993;17(3):147–52.
40. Becker B, Brill FHH, Todt D, Steinmann E, Lenz J, Paulmann D, et al. Virucidal efficacy of peracetic acid for instrument disinfection. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2017;6(1):1–6.
41. Martro E, Puzo C, Matas L, Burgue C, Castella J, Ausina V. In-use evaluation of Perasafe compared with Cidex in fiberoptic bronchoscope disinfection. *J Hosp Infect*. 2003;54:46–51.
42. Sagripanti J, Bonifacino A. Comparative Sporicidal Effects of Liquid Chemical Agents. *Appl Environ Microbiol*. 1996;62(2):545–51.
43. Bradley CR, Babb JR, Ayliffe GA. Evaluation of the Steris Endoscope System 1 Peracetic Processor Acid. *J Hosp Infect*. 1995;29:143–51.
44. Baldry MGC. The bactericidal , fungicidal and sporicidal properties of hydrogen peroxide and peracetic acid. *J Appl Bacteriol*. 1983;54:417–23.
45. Flexikon D. Quartäre Ammoniumverbindung [Internet]. 2020 [cited 2020 Sep 30]. Available from: https://flexikon.doccheck.com/de/Quartäre_Ammoniumverbindung
46. Gerba CP. Quaternary ammonium biocides: Efficacy in application. *Appl Environ Microbiol*. 2015;81(2):464–9.
47. Sattar SA, Springthorpe VS, Karim Y, Loro P. Chemical disinfection of non-porous inanimate surfaces experimentally contaminated with four human pathogenic viruses. *Epidemiol Infekt*. 1989;102:493–505.
48. Eterpi M, McDonnell G, Thomas V. Disinfection efficacy against parvoviruses compared with reference viruses. *J Hosp Infect*. 2009;73(1):64–70.
49. Best M, Sattar SA, Springthorpe VS, Kennedy ME. Efficacies of Selected Disinfectants against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*. 1990;28(10):2234–9.

50. Silverman J, Vazquez JA, Sobel JD, Zervos MJ. Comparative in vitro Activity of Antiseptics and Disinfectants versus clinical isolates of *Candida* Species. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2014;20(10):676–84.
51. Terleckyj B, Axler DA. Quantitative Neutralization Assay of Fungicidal Activity of Disinfectants. *Antimicrob Agents Chemother*. 1987;31(5):794–8.
52. Engelbrecht K, Ambrose D, Sifuentes L, Gerba C, Weart I, Koenig D. Decreased activity of commercially available disinfectants containing quaternary ammonium compounds when exposed to cotton towels. *Am J Infect Control* [Internet]. 2013;41:908–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajic.2013.01.017>
53. Dixon RE, Kaslow RA, Mackel DC, Fulkerson CC, Mallison GF. Aqueous Quaternary Ammonium Antiseptics and Disinfectants Use and Misuse. *J Am Med Assoc*. 1976;236(21):2415–7.
54. Gardner DK, Lane M. Culture and transfer of viable blastocysts: A feasible proposition for human IVF. *Hum Reprod Update*. 1997;3(4):367–382.
55. Gardner DK, Lane M. *Handbook of In Vitro Fertilization*. 4th ed. Gardner DK, Carlos S, editors. Boca Raton: CRC Press; 2017.
56. Scholtes MCW, Zeilmaker GH. A prospective, randomized study of embryo transfer results after 3 or 5 days of embryo culture in in vitro fertilization. *Fertil Steril* [Internet]. 1996;65(6):1245–8. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)58349-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0015-0282(16)58349-6)
57. Gruber I, Klein M. Embryo culture media for human ivf: Which possibilities exist? *J Turkish Ger Gynecol Assoc*. 2011;12(2):110–7.
58. Machtinger R, Racowsky C. Culture Systems: Single Step. In: Smith GD, Swain JE, Pool TB, editors. *Embryo Culture Methods and Protocols*. 1st ed. Totowa: Humana Press; 2012. p. 199–210.
59. Quinn P. Culture Systems: Sequential. In: Smith GD, Swain JE, Pool TB, editors. *Embryo Culture Methods and Protocols*. 1st ed. Totowa: Humana Press; 2012. p. 211–30.
60. Pool TB. Development of culture media for human assisted reproductive technology. *Fertil Steril*. 2004;81(2):287–9.
61. Reed ML, Hamic A, Thompson DJ, Caperton CL. Continuous uninterrupted single medium culture without medium renewal versus sequential media culture: a sibling embryo study. *Fertil Steril* [Internet]. 2009;92(5):1783–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.05.008>

62. Hardarson T, Bungum M, Conaghan J, Meintjes M, Chantilis SJ, Molnar L, et al. Noninferiority, randomized, controlled trial comparing embryo development using media developed for sequential or undisturbed culture in a time-lapse setup. *Fertil Steril*. 2015;104(6):1452–9.
63. Fukuda A, Noda Y, Tsukui S, Matsumoto H, Yano J, Mori T. Influence of water quality on in vitro fertilization and embryo development for the mouse. *J Vitro Fertil Embryo Transf*. 1986;4(1):40–5.
64. Baltz JM. Media Composition: Salts and Osmolality. In: Smith GD, Swain JE, Pool TB, editors. *Embryo Culture Methods and Protocols*. 1st ed. Totowa: Humana Press; 2012. p. 61–80.
65. Biggers JD, Lawitts JA, Lechene CP. The Protective Action of Betaine on the Deleterious Effects of NaCl on Preimplantation Mouse Embryos In Vitro. *Mol Reprod Dev*. 1993;34:380–90.
66. Wales RG, Whittingham DG. The metabolism of specifically labelled lactate and pyruvate by two-cell mouse embryos. *J Reprod Fertil*. 1973;33:207–22.
67. Gardner DK. Changes in requirements and utilization of nutrients during mammalian preimplantation embryo development and their significance in embryo culture. *Theriogenology*. 1998;49:83–102.
68. Gardner DK, Lane M, Calderon H, Leeton J. Environment of the preimplantation human embryo in vivo: metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells. *Fertil Steril*. 1996;65(2):349–53.
69. Gardner DK. Dissection of culture media for embryos: The most important and less important components and characteristics. *Reprod Fertil Dev*. 2008;20:9–18.
70. Perkins JL, Goode L. Free amino acids in the oviduct fluid of the ewe. *J Reprod Fertil*. 1967;14:309–11.
71. Gardner DK, Lane M. Amino acids and ammonium regulate mouse embryo development in culture. *Biol Reprod*. 1993;48:377–85.
72. Lane M. Nonessential amino acids and glutamine decrease the time of the first three cleavage divisions and increase compaction of mouse zygotes in vitro. *J Assist Reprod Genet*. 1997;14(7):398–403.
73. Bungum M. Articles Recombinant human albumin as protein source in culture media used for IVF: a prospective randomized study. *Reprod Biomed Online* [Internet]. 2002;4(3):233–6. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)61811-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1472-6483(10)61811-1)

74. Kovačič B. Culture Systems: Low-Oxygen Culture. In: Smith GD, Swain JE, Pool TB, editors. *Embryo Culture Methods and Protocols*. 1st ed. Totowa: Humana Press; 2012. p. 249–72.
75. Bahçeci M, Çiray HN, Karagenc L, Uluğ U, Bener F. Effect of oxygen concentration during the incubation of embryos of women undergoing ICSI and embryo transfer: A prospective randomized study. *Reprod Biomed Online*. 2005;11(4):438–43.
76. Kirkegaard K, Hindkjaer JJ, Ingerslev HJ. Effect of oxygen concentration on human embryo development evaluated by time-lapse monitoring. *Fertil Steril* [Internet]. 2013;99(3):738–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.11.028>
77. Catt JW, Henman M. Toxic effects of oxygen on human embryo development. *Hum Reprod*. 2000;15:199–206.
78. Nastri CO, Nóbrega BN, Teixeira DM, Amorim J, Diniz LMM, Barbosa MWP, et al. Low versus atmospheric oxygen tension for embryo culture in assisted reproduction: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2016;106(1):95–104.
79. Mantikou E, Bontekoe S, van Wely M, Seshadri S, Repping S, Mastenbroek S. Low oxygen concentrations for embryo culture in assisted reproductive technologies. *Cochrane database Syst Rev*. 2012;(7).
80. Morbeck DE, Leonard PH. Culture Systems: Mineral Oil Overlay. In: Smith GD, Swain JE, Pool TB, editors. *Embryo Culture Methods and Protocols*. 1st ed. Totowa: Humana Press; 2012. p. 325–32.
81. Martinez CA, Martinez EA, Gil MA. Importance of oil overlay for production of porcine embryos in vitro. *Reprod Domest Anim*. 2018;53(2):281–6.
82. Wale PL, Gardner DK. The effects of chemical and physical factors on mammalian embryo culture and their importance for the practice of assisted human reproduction. *Hum Reprod Update*. 2016;22(1):2–22.
83. Labied S, Jouan C, Wenders F, Ravet S, Gaspard O, Thonon F, et al. Comparison between paraffin and mineral oil covering on early human embryo culture: a prospective randomized study. *Syst Biol Reprod Med* [Internet]. 2019;65(1):81–6. Available from: <https://doi.org/10.1080/19396368.2018.1492645>
84. Österreichische Gesellschaft für S. Leitlinie Überprüfung der standardisierten manuellen Aufbereitung von Medizinprodukten der Risikogruppe semikritisch A

- [Internet]. Leitlinie 15. 2019. p. 1–11. Available from:
<https://oegsv.com/wp/guidelines/>
85. U.S. Geological S. Dissolved oxygen: U.S. Geological Survey Techniques and Methods [Internet]. Reston; 2020. Available from:
<https://pubs.er.usgs.gov/publication/tm9A6.2>
 86. Belli M, Zhang L, Liu X, Donjacour A, Ruggeri E, Palmerini MG, et al. Oxygen concentration alters mitochondrial structure and function in in vitro fertilized preimplantation mouse embryos. *Hum Reprod.* 2019;34(4):601–11.
 87. Ma YY, Chen HW, Tzeng CR. Low oxygen tension increases mitochondrial membrane potential and enhances expression of antioxidant genes and implantation protein of mouse blastocyst cultured in vitro. *J Ovarian Res.* 2017;10:1–11.
 88. Guérin P, El Mouatassim S, Ménézo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update.* 2001;7(2):175–89.
 89. Goto Y, Noda Y, Mori T, Nakano M. Increased Generation of reactive oxygen species in Embryos cultured in vitro. *Free Radic Biol Med.* 1993;15:69–75.
 90. Kwon H, Yang H, Hwang K, Yoo J, Kim M, Lee C, et al. Effects of Low Oxygen Condition on the Generation of Reactive Oxygen Species and the Development in Mouse Embryos Cultured in vitro *. *J Obstet Gynaecol Res.* 1999;25(5):359–66.
 91. Bavister BD. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Hum Reprod Update.* 1995;1(2):91–148.
 92. McKiernan SH, Bavister BD. Environmental Variables Influencing in Vitro Development of Hamster 2-Cell Embryos to the Blastocyst Stage. *Biol Reprod.* 1990;43(3):404–13.
 93. McLimans WF. The gaseous environment of the mammalian cell in culture. In: Cristofalo VJ, Norman C, Charles T, editors. *Growth, Nutrition and Metabolism of Cells in Culture.* 1st ed. New York: Academic Press; 1972. p. 137–70.
 94. Stokes YM. Quantifying oxygen diffusion in paraffin oil used in oocyte and embryo culture. *Mol Reprod Dev.* 2009;76:1178–87.
 95. Baltz JM, Biggers JD. Oxygen transport to embryos in microdrop cultures. *Mol Reprod Dev.* 1991;28(4):351–5.