

DÜŞÜK SICAKLIK GAZ PLAZMA STERİLİZASYON YÖNTEMİ: HİDROJEN PEROKSİT GAZ PLAZMA STERİLİZASYONU

Bekir KOCAZEYBEK¹, Hüseyin ÇAKAN², Vecdet ÖZ³,
Bingür SÖNMEZ⁴

ÖZET

Yeni geliştirilen bir düşük sıcaklık sterilizasyon yöntemi olan "hidrojen peroksit (H₂O₂) gaz plazma sterilizasyon" sisteminin mikrobiyolojik sterilite etkinliği in-vitro olarak araştırılmıştır. Araştırma, konvansiyonel düşük sıcaklık sterilizasyon sistemi olan etilen oksit sterilizasyon sistemi ile karşılaştırılmalı olarak dört ayrı çalışma ile yürütülmüştür. Sonuç olarak, H₂O₂ gaz plazma sterilizasyon sisteminin mikrobiyolojik sterilite etkinliği etilen oksit ile aynı saptanmıştır. Döngü süresinin kısaltığı, nemsiz bir sistem olması, insan ve çevre sağlığına zararlı atığı olmaması, etilen oksite göre avantajlı yönler olarak değerlendirilirken, sistemin (çalıştırma maliyetini arttırabileceği düşüncesiyle) özel paketleme malzemesi gerektirmesi ise dezavantaj olarak değerlendirilmiştir.

SUMMARY

Low-temperature gas plasma sterilization method: Hydrogen peroxide gas plasma sterilization.

In-vitro research studies were made on the efficacy of microbiological sterility of hydrogen peroxide (H₂O₂) sterilization system, a new low temperature sterilization method. Research was executed based on 4 different studies and in comparison with ethylene oxide which is considered as a conventional low-temperature sterilization system. The results of our studies have revealed that the efficacy of microbiological sterility of hydrogen peroxide plasma sterilization system was the same as that of ethylene oxide. However, the shortness of the sterilization period, the absence of by-products with toxic effects on the environment and human beings and the fact that it does not require the presence of humidity have been rated as advantageous characteristics compared with etylene oxide while the fact that the system needs a special packaging material which increases the running cost can be considered as a disadvantage.

1 Florence Nightingale Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Çağlayan, İstanbul.

2 İstanbul Üniversitesi, Kardiyoloji Enstitüsü, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Haseki, İstanbul.

3 İstanbul Üniversitesi, Adli Tıp Enstitüsü, Cerrahpaşa, İstanbul.

4 Florence Nightingale Hastanesi, Kalp Damar Cerrahisi, Çağlayan, İstanbul.

GİRİŞ

Herhangi bir maddenin ve malzemenin birlikte bulunduğu tüm mikroorganizmaların her türlü canlı ve aktif şekillerinden temizlenmesi, kısaca mikroorganizmaların vejetatif ve spor şekillerinin öldürülmesine sterilizasyon denir. Sterilite kesinlik taşıyan bir kavram olup değerlendirilmesi yapılamaz. "Biraz steril; oldukça steril" gibi ifadeler herhangi bir anlam taşımaz (15,16). Klasik olarak hastane ortamında kullanılan tıbbi araç-gereçlerde bulunan tüm mikroorganizmaları yok eden, ancak sporları etkilemeyen bir yöntem olarak tarif edilen dezenfeksiyonun günümüzde tarifi, bakteri sporlarını da öldüren kimyasal maddeler yani sterilanların devreye girmesiyle değişmiştir (8,13). Mikrobiyal kontaminasyonu minimal düzeyde azaltmaktan, sterilizasyona kadar uzanan geniş bir kavram içinde yer alan maddelerden biri de oksidan bileşiklerden hidrojen peroksittir. Hidrojen peroksit (H_2O_2) çözeltisi renksiz, yakıcı bir sıvıdır. Işık ve metaller varlığında parçalanır veya su ve oksijen gazına katalize olur. Hücrede oluşturdukları serbest hidroksil radikalleri (HO^{\cdot} , OOH^{\cdot}), süperoksit radikalleri gibi hücrelere son derece reaktif ve toksiktirler. H_2O_2 bakterisit, virüs ve fungusittir; daha yüksek konsantrasyonlarda sporositir. Antiseptik olarak %3'lük çözeltileri deri-yara temizliğinde, ağız yıkama sularında kullanılır. Dezenfektan olarak yumuşak cerrahi implantlarının, plastik aletlerin vb. dezenfeksiyonunda kullanılır. %6-25'lik H_2O_2 çözeltileri sterilizasyon için yeterlidir (11).

Bu çalışmada %58'lik H_2O_2 moleküllerinin radyofrekans enerjisiyle parçalanması sonucu meydana gelen (OOH^{\cdot}) peroksi ve (OH^{\cdot}) hidroksil serbest radikallerini de içeren H_2O_2 gaz plazmasının mikrobiyolojik sterilizasyon açısından in-vitro etkinliği araştırılmıştır. Yukarıda adı geçen plazma, gaz moleküllerinin bir enerji vasıtasıyla uyarıldığında meydana gelen, uyarılmış gaz molekülleri, elektronlar ve serbest radikalleri içeren oluşuma denir ve maddenin katı, sıvı ve gazdan sonra 4. hali olarak nitelendirilir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Florence Nightingale Hastanesi Mikrobiyoloji laboratuvarında 1.11.1996 tarihi ile 1.1.1997 tarihi arasında etkin maddesi H_2O_2 plazması olan ve Johnson&Johnson firmasının geliştirilen STERRAD 100 model cihaz vasıtasıyla yeni bir sterilizasyon işleminin mikrobiyolojik yönden etkinliği, bilinen ve halen rutin kullanımda olan etilen oksitle (EtO) karşılaştırılarak araştırılmıştır. Bu amaçla 30 ayrı çalışma yapılmış, her bir çalışmada kardiyovasküler cerrahide kullanılan 9 malzemenin (aspiratör ucu, aort kanülü, ven kanülü, ven adaptörü, plastik buldok, kalın greft, pens, klip, sam ucu) 3 değişik yöntemle kültürü yapılmış ve izlenmiştir. Ayrıca firmanın önerdiği şekilde *B.subtilis var. niger* sporları ile biyolojik kontrol yapılmıştır.

A) H_2O_2 gaz plazma sterilizasyon sistemi

H_2O_2 gaz plazma sistemi 44°C'de sterilizasyon yapar. Cihazın sterilizasyon safhaları vakum, enjeksiyon, difüzyon, plazma ve ventilasyondur. Toplam döngü süresi 75 dakikadır. Cihaz 100 litre hacimlidir, %58'lik H_2O_2 çözeltisi içeren ve 10 kullanımlık olan kasetler kullanır. Kaset cihaza yerleştirilir. Start düğmesine basıldıktan sonra cihaz ilk önce, sterilanın malzemelere nüfuz etmesi için bir vakum yapar. Bu vakum yaklaşık 5 dakika sürer. Daha sonra kasette bulunan H_2O_2 bir valf vasıtasıyla bir hazneye alınıp gaz haline dönüştürülür. Bu işlem 6 dakika sürer. Gaz

haline dönüşen H₂O₂ molekülleri difüzyon safhasında malzemelere nüfuz eder. Bu aşama 44 dakika sürer. Daha sonra malzemelere nüfuz etmiş H₂O₂ gaz molekülleri 13.56 MHz'de radyo-frekans enerjisiyle uyarılarak plazma haline dönüştürülür. H₂O₂ plazması, elektronlar, peroksi serbest radikalleri (OOH⁻), hidroksil serbest radikalleri (OH⁻) ve uyarılmış H₂O₂ moleküllerini içerir. Sterilizasyon bu safhada gerçekleşir. Bu aşama 15 dakika sürer daha sonra 5 dakikalık ventilasyon safhası ile atmosferik basınca dönülür ve sterilizasyon tamamlanmış olur.

B) Mikrobiyolojik çalışma yöntemleri

H₂O₂ gaz plazma sterilizasyon sisteminin etkinliğinin araştırılması 4 ayrı yöntemle yapılmıştır (Tablo).

Tablo. H₂O₂ gaz plazma ve EtO sterilizasyon çalışmasında kullanılan malzemelerin mikrobiyolojik çalışma yöntemlerine göre dağılımı.

Sürüntü kültürü	Direkt inokülasyon	Bakteri inoküle edilmiş malzeme	Biyolojik indikatör
Aspiratör ucu (30)	Ven adaptörü (30)	Ven kanülü (30)	B.subtilis
Aort kanülü (30)	Kalın greft (30)	Panç (30)	var.niger
Sam ucu (30)	Plastik buldok (30)	Klip (30)	emdirilmiş strip (30)

Not: EtO kontrol çalışmasında da B.subtilis var. niger emdirilmiş stripler kullanılmıştır.

I- Sürüntü kültürü:

Sistemde steril olmuş malzemeden sürüntü kültürü alınmış ve kültürü almadan önce ve alım süresince şu noktalara dikkat edilmiştir.

a) Malzemelerden sürüntünün kolay alınabilmesi için yüzeyi düz olan aspiratör ucu, aort kanülü ve sam ucu kullanılmıştır.

b) Steril malzemelerden laminar-air flow hava akımlı ve clean room (temiz oda) koşullarında kültür alınmıştır. Sürüntü kültürü alınırken, malzemelerin sarılı olduğu paketlerin zarar görmemesi olmasına dikkat edilmiştir. Steril eldivenlerle temiz hava koşullarında alınan sürüntü kültürü triptik soy-broth (TSB) içeren sıvı besiyerlerine pasajları yapılmıştır. Sıvı besiyerleri 37°C'de 5 gün tutulmuş, bulanıklık varsa hemen koyun kanlı ve Endo besiyerine pasajları yapılmıştır. Bulanıklık gözlenmediğinde, 5 gün sonra pasajları yapılarak sterilite doğrulanmıştır.

II- TSB besiyerine malzemenin direkt inokülasyonu:

Göğüs-Kalp ve Damar Cerrahisi (GKDC)'inde temin edilen ven adaptörü, kalın greft ve plastik buldok sterilizasyon sistemlerinde steril edildikten sonra, temiz oda koşullarında laminar air flow altında TSB içeren besiyerlerine atılmış ve 5 gün mikrobiyolojik takipleri yapılmıştır.

III- Bakteri inoküle edilmiş malzemenin kontrol yöntemi:

Bakterinin inoküle edileceği cerrahi malzemelerin (ven kanülü, panç, klip) daha önce kullanılmamış olmasına, iyi bir şekilde yıkanıp kurutulmasına dikkat edilmiştir. *P.aeruginosa* ATCC 27853 ve *S.aureus* ATCC 25923 suşlarının 24 saatlik

kültürlerinden hazırlanan 1×10^6 cfu/ml'lik süspansiyonları, steril ekuviyon ile ve aseptik koşullarda bu malzemelere inoküle edilmiş, daha sonra bunlar Sterrad ve EtO cihazlarına konulmuştur. Sterilizasyon işlemi sonunda malzemelerin bakteri inoküle edilmiş yüzeylerinden temiz oda koşullarında aseptik teknik kullanılarak sürüntü kültürü alınmış ve TSB içeren besiyerlerine ekim yapılmıştır.

IV- Biyolojik indikatör çalışması:

Bu çalışmada firmanın önerdiği şekilde 1.3×10^6 cfu/ml *B.subtilis var.niger* sporları emdirilmiş hazır stripler, H_2O_2 'in aktivitesini inhibe etmek için katalaz reaktifi ve besiyeri olarak da TSB kullanılmıştır. Kontrol grubu etilen oksitte de 1.3×10^6 cfu/ml *B.subtilis var. niger* sporları emdirilmiş stripler ile çalışma yapılmış, 48 saat sonra değerlendirilmiştir. H_2O_2 gaz plazma sisteminde çalışma aşağıdaki gibi yapılmıştır. Spor stripleri, steril edilecek malzemeler ile cihaza yerleştirilip sterilizasyon işlemine tabi tutulmuştur. Dört adet 15 ml TSB içeren erlanmayer hazırlanmıştır.

1- TSB içeren erlanmayerlerden birincisi TSB'yi kontrol etmek için $37^\circ C$ 'de inkübe edilmiştir.

2- TSB içeren erlanmayerlerden ikincisinin içine katalaz reaktifini kontrol etmek için bir damla katalaz reaktifi konulmuştur.

3- TSB içeren erlanmayerlerden üçüncüsüne katalaz reaktifi ile birlikte steril edilmemiş spor sribi konulmuştur. Burada ekim yapıp, sterilizasyona tabi tutulmamış stripler pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

4- TSB içeren dördüncü erlanmayere ise sterilizasyonun yapıp, yapılmadığını kontrol için katalaz ile birlikte H_2O_2 gaz plazma sisteminde steril edilmiş spor sribi konulmuştur.

Tüm TSB içeren erlanmayerler 5 gün $37^\circ C$ 'de inkübe edilmiştir. Beş gün sonunda besiyerlerine bakılmış, bulanıklık görülmüş ise koyun kanlı jeloz ve Endo besiyerine pasaj yapılmıştır. 1. 2. ve 4. erlanmayerlerde üreme olmaması, 3. erlanmayerde ise üreme olması sterilizasyonun sağlandığını göstermiştir.

BULGULAR

H_2O_2 gaz plazma ve EtO sterilizasyon çalışmasında, sürüntü kültürü, direkt inokülasyon, bakteri inoküle edilmiş malzemenin kültürü ve biyolojik indikatör olmak üzere 4 ayrı mikrobiyolojik yöntemle 30'ar ayrı çalışma yapılmış, materyel olarak aspiratör ucu, aort kanülü, sam ucu, ven adaptörü, kalın greft, plastik buldok, ven kanülü, panç, klip, *B.subtilis var.niger* spor stripleri kullanılmıştır. H_2O_2 gaz plazma sterilizasyon sisteminin test sistemi, EtO sterilizasyonunun ise kontrol sistemi olarak kullanıldığı ve 30 denemenin yapıldığı çalışmanın 30'unda da materyeller steril bulunmuştur.

TARTIŞMA

Son yıllarda tıp alanında tanı ve tedaviye yönelik yeni girişimlerin, teknolojik üstünlük gösteren çeşitli araç-gereçlerin sıkça kullanımı, özellikle açık yöntemle yapılan, operasyona özgü tekniği karmaşık ve uzun olan kardiovasküler cerrahi gibi komplike cerrahi dallarında post-operatif infeksiyon riskini arttırmaktadır. Bundan dolayı post-operatif infeksiyonlara bağlı morbidite ve mortaliteyi azaltmak için sterilizasyonun çok güvenilir, kolay uygulamalı, uzun zaman almayan, steril edilen araç-gereçlere zarar vermeyen sistemlerle yapılması esas alınır.

Halen kardiovasküler cerrahi gibi komplike cerrahi branşlarında kullanılan sterilizasyon yöntemlerinden etilen oksitin bakterisit, virüsit, fungusit ve sporisit özellikleri sterilite yönünden uygundur. Buna karşın, sağlık personeline ve çevreye toksisite riski, sterilizasyon süresi ve sonrasında havalandırma gereksinimine bağlı olarak malzemelerin tekrar kullanım süresinin uzaması, steril edilen araç-gereçlerin bozulma riski gibi faktörler araştırmacıları EtO dışında yeni sterilizasyon sistemi araştırmalarına itmiştir (1-4,17).

Çalışmayı yaptığımız cerrahi merkezinde kardiovasküler araç-gereçlerin sterilizasyonu amacı ile EtO kullanılıyordu. EtO renksizdir ve havada çok patlayıcı olduğundan CO₂ veya florokarbon ile karıştırılarak kullanılır (11). Düşük sıcaklık sterilizasyon yöntemlerinden olan EtO hücre DNA'sının fonksiyonunu bozarak etki gösterir. EtO'in sterilizasyon süresinin 90 dakikadan 3 saate kadar değişkenlik gösterdiği, toksik EtO kalıntılarının yok edilmesi amacıyla 24 saat havalandırma gerektirdiği, %40-50 nem altında çalıştığı bilinmekte ve daha önemlisi karsinojen etkisinin olduğu ileri sürülmektedir (1,3,4,17). Bu özelliklerinden dolayı alternatif bir sterilizasyon sistemi olarak ileri sürülen H₂O₂ gaz plazma ile karşılaştırmalı in-vitro bu çalışma yapılmıştır. Hem H₂O₂ gaz plazma hem de EtO sisteminde sonuçlar steril bulunmuştur. Jacobs (10) H₂O₂ gaz plazma sisteminde *B.subtilis var.niger*, *S.aureus* ATCC 6538, *P.aeruginosa* ATCC 15442 ile yaptığı çalışmada 1 x 10⁶/ml titrede bakterileri scribe inoküle ederek, tübüler lümenli araç-gereçlere yerleştirmiş, sonuçta tüm bakterilerin 75 dakika sonunda öldüğünü ileri sürmüştür. Arata (4), Auxilia (5) ve Brink (6) benzer çalışmalar yapmışlar, H₂O₂ plazmanın sterilizasyon etkinliğinin EtO ile aynı olduğunu bildirmişlerdir. Araştırma sonucumuz yapılan çalışmalarla paralellik göstermiş, H₂O₂ gaz plazma sisteminin etkinliğinin EtO ile aynı olduğunu ortaya koymuştur.

1990 yılında Almanya'da Jordy (12), 1994 yılında Furuhashi (9) 1995'te Naryworm (14) ve Burns (7) H₂O₂ gaz plazma sisteminin etilen oksit ve formaldehit sistemlerine alternatif bir sistem olup olmadığına ilişkin yaptıkları araştırmalarda *B.subtilis var.niger* spor stripleri ile çalışmışlar, spor striplerinin kültürlerinde aynı etkinliği bulmuşlar, H₂O₂ gaz plazmanın, toksik problemi bilinen EtO'e göre avantajlı olabileceğini belirtmişlerdir.

Tüm araştırmacılar (5,6,7,9,10,12,14) H₂O₂ gaz plazma sisteminin EtO sistemine mikrobiyolojik etkinlik açısından alternatif olabileceğini bildirirken, sterilizasyonun son ürünlerinin su buharı ve oksijen olması nedeniyle nontoksik olması, sterilizasyon süresinin kısa olması, sterilizasyon sonrası havalandırma gerektirmemesi, sisteme ek donanım araç-gereç istememesi gibi faktörlerin EtO'e göre avantajlı yönleri olduğunu bildirmişlerdir. Bunun yanında H₂O₂'nin toksisitesi konusunda henüz yeterli çalışmaların olmaması ve paketlenme materyali olarak Tyvek adı verilen tamamen sentetik (polipropilen) sterilizasyon rulosu gerektirmesi çalışma maliyetini arttırdığı için dezavantaj olarak değerlendirilmektedir.

Sonuç olarak modern sterilizasyonda yeni bir teknoloji olarak sunulan H₂O₂ gaz plazma sterilizasyonun konvansiyonel olarak EtO ile aynı mikrobisidal etkinliğe sahip olması, sterilizasyon süresi 48 saat olan EtO'e göre sterilizasyon süresinin 75 dakika olması, EtO'in iddia edilen kanserojen etkisine karşı son ürünleri itibarı ile nontoksik olması, araç-gereç bozulmalarında önemli bir faktör olan neme EtO'de olduğu gibi gereksinme göstermemesi yönleriyle cerrahi merkezlerinde düşük sıcaklıklı H₂O₂ gaz plazma sisteminin EtO'e göre daha yararlı olacağı düşünülebilir.

KAYNAKLAR

- 1- Addy T: Low-temperature gas plasma sterilization, *1.International Symposium on Frontiers in Sterilization Practice: The Future of Low-Temperature Technology*, Symposium Book p. 71, Vienna (1995).
- 2- Alfa MJ, De Gagne P, Olson N, Pinchalski T: Comparison of ion plasma, vaporized hydrogen peroxide, and 100 % ethylene oxide sterilizers to the 12% ethylene oxide gas sterilizer, *Infect Control Hosp Epidemiol* 17: 92 (1996).
- 3- Allen EE: New sterilization system offers safe alternative to ethylene oxide, *Oarm Bulletin* 1: 2 (1994).
- 4- Arata T: Alternatives to ethylene oxide gas sterilization, *1.International Symposium on Frontiers in Sterilization Practice: The Future of Low-Temperature Technology*, Symposium Book p.85, Vienna (1995).
- 5- Auxila F: Cost comparison of sterilization systems, *1.International Symposium on Frontiers in Sterilization Practice: The Future of Low-Temperature Technology*, Symposium Book p.56, Vienna (1995).
- 6- Brink A: Case study: Low-temperature hydrogen peroxide plasma sterilization, *1.International Symposium on Frontiers in Sterilization Practice: The Future of Low-Temperature Technology*, Symposium Book p.94, Vienna (1995).
- 7- Burns RT: Adjusting to new methods of instrument sterilization, *Infect Control Steril Technol* 2: 35 (1995).
- 8- Favero MS, Bond WN: Sterilization, disinfection and antisepsis in the hospital, "Balows A, Hausler WJ, Herman KL, Isenberg HD, Shadomy HJ (eds): *Manual of Clinical Microbiology*, 5.baskı" kitabında s.183, Am Soc Microbiology, Washington (1991).
- 9- Furuhashi M: Methods of sterilization and disinfection, *A Sepsis Infection Prevention Forum* 16: 20 (1994).
- 10- Jacobs P: Mechanisms and validation issues in gas plasma sterilization, *1.International Symposium of Frontiers in Sterilization Practice: The Future of Low-Temperature Technology*, Symposium Book p.73, Vienna (1995).
- 11- Johansson CB: Sterilizasyon ve dezenfeksiyon, "Wilke A, Söyletir G, Doğanay M (eds): *İnfeksiyon Hastalıkları*" kitabında s.223, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul (1996).
- 12- Jordy A: Low-temperature plasma sterilization (LTP) in the hospital sector an alternative to ethylene oxide (EO) and form aldehyde (FO), "Burbach GS, Wille B (eds): *Hospital Hygiene and Infection Prevention*, 12. baskı" kitabında s.1, Dr Ewald Fishcher GmbH, Heidelberg (1990).
- 13- Martin MA, Nemzel RP: Sterilization, disinfection and disposal of infectious waste, "Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds): *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 4.baskı" kitabında s.2579, Churchill Livingstone, London (1995).
- 14- Naryworm D: Sterilization in health care facilities, *Infect Control Steril Technol* 2: 22 (1995).
- 15- Oğuz NA: Avrupa Parlamentosu ve ISO'ya göre yeni sterilite kontrol normlarının getirdiği yenilikler ve hastanelerdeki en temel güvenlik sorunu olarak sterilizasyona "sistem yaklaşımı", *Boğ Üni Biyo-Med Müh Bült* 14: 23 (1995).
- 16- Prince HN, Prince DL, Prince NN: Principles of viral control and transmission, "Block SS (eds): *Disinfection, Sterilization, and Preservation*, 4.baskı" kitabında s.411, Lea and Febiger, Philadelphia (1991).
- 17- Weisskopf V: Toxicologic evaluation of sterilization procedures, *1.International Symposium on Frontiers in Sterilization Practice: The Future of Low-Temperature Technology*, Symposium Book p.34, Vienna (1995).