

Die Auswirkung von Pflegeöl auf die Wirksamkeit der Dampfsterilisation zur Dekontamination zahnärztlicher Handstücke

S. Winter*, A. Smith¹, B. Kirk², D. Lappin¹

Von zahnärztlichen Handstücken geht das Risiko einer Kreuzinfektion durch die Kontamination mit Patientenmaterial aus. Reinigung und Sterilisation zahnärztlicher Handstücke sind wegen ihres komplexen Aufbaus schwierig. Auch das zum Schmieren innerer Bauteile verwendete Pflegeöl beeinflusst das Herstellen der Sterilisationsbedingungen. Ohne die Anwesenheit von Feuchtigkeit findet die Sterilisation mit «trockener Hitze» statt und benötigt eine deutlich längere Einwirkdauer bei deutlich höheren Temperaturen (z.B. 160 °C über 2 h). Schmiermittel können hydrophob sein und deshalb durch ihre Anwesenheit verhindern, dass die im Dampf vorhandene Feuchtigkeit die Oberflächen erreicht, was die Abtötung von Mikroorganismen (Sterilität) beeinträchtigt.

Diese Studie sollte die Auswirkungen von Pflegeöl auf zahnärztlichen Handstücken auf die Inaktivierung von Sporen von *Geobacillus stearothermophilus* während der Dampfsterilisation untersuchen. Die Handstücke wurden mit einer auf Edelstahlröhre aufgetrockneten Sporenlösung beimpft: Diese Drähte wurden in die Spraykanäle eingesetzt, anschließend wurde Pflegeöl für Handstücke (W&H, Österreich) aufgetragen. Mit einem Resistometer des Typs BIER (Biological Indicator Evaluation Resistometer) wurden die Abtötungsraten drei verschiedener Sterilisationsprogramme untersucht: zwei Programme mit Vakuum, eines ohne. Zur Wiederfindung der Sporen wurden die Drähte in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) geschallt, die dann gefiltert und auf eine Trypton-Soja-Agar-Platte (TSA-Platte) ausgebracht wurde. Die Menge der wiedergefundenen Sporen wurde als koloniebildende Einheiten (KbE) angegeben. Nur in einem der Programmtypen (mit einem Vorvakuumstoß) wurden bei 4 von 12 aufbereiteten Handstücken Sporen wieder-

gefunden. Aus dieser Untersuchung lässt sich schlussfolgern, dass es ratsam wäre, Sterilisationszyklen mit den Geräten und unter den Bedingungen zu validieren, die später in der klinischen Praxis vorhanden sind. Die Annahme, dass während des Sterilisationsprozesses alle Bakterien getötet werden, ist trotz der integrierten Letalität überdimensionierten Parameter von 3 Minuten bei 134 °C nicht notwendigerweise korrekt.

I Einleitung

Laut Medizinprodukterichtlinie [1] gelten zahnärztliche Handstücke als Medizinprodukte. Mehrere Normen enthalten detaillierte Bedingungen für die Sterilisation von Medizinprodukten [2], Konstruktion und Eigenschaften großer und kleiner Dampfsterilisatoren [3, 4], von chemischen Indikatoren (CI) [5], biologischen Indikatoren (BI) [6] und Prüfkörpern (PCD) [7, 8]. Es gibt mehrere Richtlinien mit Empfehlungen für die Aufbereitung von Medizinprodukten, die zahnärztliche Handstücke als «semikritisch/kritisch A» (Diagnose, Behandlung) oder «semikritisch/kritisch B» (invasive Behandlung, Operation, Endoskopie) [9, 10] einstufen und die Notwendigkeit beschreiben, diese Handstücke zu dekontaminieren und zu pflegen, um Kreuzinfektionen zu verhindern und die Gesundheit und Sicherheit von Patienten und Mitarbeitern in Zahnarztpraxen zu gewährleisten. Wegen der zahlreichen inneren Bauteile und Lumina, die Dampf nur schwer erreicht, sind die Reinigung und die Dampfsterilisation zahnärztlicher Handstücke jedoch schwierig. Außerdem weiß man nur wenig über die Auswirkungen des bei der Pflege von Handstücken verwendeten Öls auf die Widerstandsfähigkeit von Mikroor-

SCHLÜSSELWÖRTER

- Dampfsterilisation
- Dampfdurchdringung
- Zahnärztliche Handstücke
- Enge Lumina
- Beladung mit Hohlkörpern
- Biologische Indikatoren

ganismen und somit auf die Wirksamkeit der Dampfsterilisation. Für eine wirksame Dampfsterilisation müssen auf jeder zu sterilisierenden Oberfläche drei unabhängige Prozessvariablen gegeben sein: Es muss Feuchtigkeit vorhanden sein, gewöhnlich in der Form von trockengesättigtem Dampf, der über eine festgelegte Zeit auf einer festgelegten Temperatur gehalten werden muss (z.B. 134–137 °C über mindestens 3 Minuten). Ohne die Anwesenheit von Feuchtigkeit findet die Sterilisation mit «trockener Hitze» statt und benötigt eine deutlich längere Einwirkdauer bei deutlich höheren Temperaturen (z.B. 160 °C über 2 h) [11].

Schmiermittel können hydrophob sein und deshalb durch ihre Anwesenheit verhindern, dass Feuchtigkeit an die zu sterilisierenden Oberflächen gelangt. Zwar ist

* Dr. Sandra Winter, MVLS University of Glasgow, Glasgow Dental Hospital & School, Infection and Immunity, Level 9, 378 Sauchiehall Street, G2 3JZ Glasgow, Schottland
E-mail: sandra.winter@belimed.com

¹ MVLS University of Glasgow, Glasgow Dental Hospital & School

² 3M Health Care, Loughborough, England

bekannt, dass Öl den D-Wert (die benötigte Zeit, um 90% der vorhandenen Keime bei einer bestimmten Temperatur abzutöten) von Mikroorganismen beeinflusst, jedoch gehört laut Herstellerangaben die innere Schmierung vor der Sterilisation zur Pflege zahnärztlicher Handstücke. Es gibt nur wenige Veröffentlichungen zur Auswirkung von Schmiermittelrückständen auf die Widerstandsfähigkeit mikrobieller Verunreinigungen. So stellten Halleck et al. fest, dass Öl (Mobil DTE 25, Mobile Oil Corp., New York, NY, USA) den D-Wert von *Geobacillus stearothermophilus* bei einer Temperatur von 121 °C (250 °F) von 2,5 auf 5,6 und bei 132 °C (270 °F) von 0,2 auf 0,7 steigerte [12]. Ein weiteres Beispiel für die schützende Wirkung von Ölen auf die Widerstandsfähigkeit von Mikroorganismen wurde von Senhaji und Loncin veröffentlicht: Demnach ist die Wärmebeständigkeit von *Bacillus subtilis* bei Anwesenheit von Öl und bei Abwesenheit von Wasser am größten [13]. Dazu kommt, dass in vielen Zahnarztpraxen Sprühflaschen zur Schmierung von Handstücken verwendet werden. Bei unsachgemäßer Verwendung dieser Sprühflaschen befindet sich Öl auf allen Innenflächen der Handstücke, auch den Spraykanälen, was die Dampfdurchdringung weiter erschwert.

Diese Studie untersucht den Einfluss des zum Schmieren von Handstücken verwendeten Pflegeöls auf die Inaktivierung der Sporen von *G. stearothermophilus* auf Edelstahlflächen in zahnärztlichen Handstücken bei der Dampfsterilisation.

I Material und Methoden

Reinigung der Edelstahldrähte (Edelstahl 316, d = 0,2 mm, l = 122 cm, Cadence Science, Baltimore, MD, USA)

Die Drähte wurden bei Raumtemperatur mindestens 1 Minute in eine Lösung mit Enzymreiniger (Metrizyme, Metrex, CA, USA) eingelegt und mit einem Baumwolltuch sauber gerieben, bis auf dem Tuch keine Rückstände mehr zu erkennen waren. Anschließend wurden sie einmal mit heißem Wasser und dreimal mit destilliertem Wasser gespült. Die Drähte wurden 30–60 Minuten in einer Sicherheitswerkbank trocknen gelassen.

Zubereitung der Sporenlösung

Die Sporenlösung (Sporen-Charge «S718», 3M, St. Paul, MN, USA, geerntet von Agar-

kulturen von 3M, St. Paul, MN, USA) mit einem D-Wert von $D_{121} = 2,2$ min wurde zehnfach in Wasser verdünnt, doppelt auf TSA-Platten (Trypton-Soja-Agar, Remel, Lenexa, KS, USA) aufgebracht und bei 66 °C bis zu 24 h inkubiert (Umluft-Inkubator Precision, LEEC, GB). Platten mit 30 bis 300 koloniebildenden Einheiten (KbE) wurden ausgezählt und die Sporenkonzentration in der Stammlösung wurde rechnerisch als $2,3 \times 10^8$ Sporen/ml ermittelt. Die (nach EN ISO 11138-1:2006) berechnete Sporenzahl in der Sporen-Stammlösung betrug zwischen 1,15 und $6,9 \times 10^8$ Sporen/ml. Die Stammlösung wurde in einer 20-prozentigen Ethanol-lösung in Millipore-Wasser auf eine Konzentration von $5,8 \times 10^7$ bis $3,5 \times 10^8$ Sporen/ml verdünnt, um dann über Nacht auf Edelstahldrähten anzutrocknen. Die Edelstahldrähte (d = 0,2 mm) wurden standardmäßig über Gel-Loading-Pipettenspitzen mit 10 µl einer Sporenlösung mit *G. stearothermophilus* (Bereich: $5,8 \times 10^5$ – $3,5 \times 10^6$ Sporen) beimpft. Die Drähte wurden an einem Metallgestell festgeschraubt und über Nacht bei Raumtemperatur trocknen gelassen. Dann wurden sie auf eine Länge von je 82 mm zugeschnitten und in die Spraykanäle (d = 0,9 mm, l = 80 mm, V = 50,8 mm³) von drei Handstücken eingelegt. Anschließend wurden 10 µl Pflegeöl für Handstücke (Synthetisches Kohlenwasserstoff-Öl, Esteröl, Service Oil F1, W&H, Österreich) aus einer Pipette mit 200-µl-Spitzen direkt in jeden Spraykanal gegeben. Zusätzlich wurden dreimal eine negative Kontrolle – ein Handstück mit einem Draht ohne Sporen in jedem Spraykanal – und eine positive Kontrolle – ein inokulierter Draht ohne Sterilisation – aufbereitet.

Resistometer zur Bewertung biologischer Indikatoren (BIER)

Zur Bewertung von unterschiedlichen Sterilisationsprofilen diente ein BIER-Gerät (3M) mit individueller Programmierung von Einwirkzeit sowie Anzahl und Tiefe der Vakuumstöße. Es wurden drei unterschiedliche Sterilisationszyklen programmiert und verglichen (Abbildungen 1–3). Die integrierte Letalität (F_0) wurde mit der folgenden Gleichung berechnet:

$$F_0 = t(10^{(T - 121,1)/z})$$

Hierbei gilt: t ist die Zeitdifferenz zwischen zwei Messungen, T ist die Temperatur zum Messzeitpunkt, z ist der z-Wert

und wird als 10 angenommen. Die logarithmische Reduktion der Mikroorganismenzahl wird durch F_0/D_{121} [14] angegeben.

Programm 1: Programm ohne Vakuum, kein Vorvakuum, 3 min bei 134 °C, kein Nachvakuum, $F_0 = 114$ (Reduktion um 52 Log-Stufen)

Programm 2: Vakuumprogramm 1, ein Vorvakuumstoß mit 45 mbar, 3 min bei 134 °C, ein Nachvakuumstoß mit 65 mbar, $F_0 = 60$ (Reduktion um 27 Log-Stufen)

Programm 3: Vakuumprogramm 2, zehn Vorvakuumstöße mit 900 mbar, 3 min bei 134 °C, ein Nachvakuumstoß mit 65 mbar, $F_0 = 60$ (Reduktion um 27 Log-Stufen)

Um festzustellen, ob die Beladung die Aufheizdauer beeinflusst, wurden Zyklen mit leerer Kammer durchgeführt. Zur Wiederfindung von *G. stearothermophilus* wurden beide Drähte in Zentrifugenröhrchen mit 50 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) + 0,1 % Tween 80 gegeben, 20 min beschallt (Branson 2200, CA, USA) und in zwei Spülgängen mit 50 ml Puffer filtriert («Micro Funnel»-Filter, GN-6-Membran 0,45 µm, Pall Life Science, USA). Das Filterpapier wurde dann auf Trypton-Soja-Agar (TSA; Remel, Lenexa, KS, USA) gelegt. Die Inkubation (Umluft-Inkubator Precision, LEEC, GB) fand bei 66 °C über bis zu 48 Stunden statt, anschließend wurden die koloniebildenden Einheiten (KbE) gezählt. Alle Experimente wurden dreifach durchgeführt, auch für die negativen (zwei gereinigte Drähte und zwei gereinigte Spraykanäle [Spülung mit 2 ml PBS + 0,1% Tween 80]) und positiven (sechs kontaminierte Drähte, keine Sterilisation) Kontrollen. Die Vorgänge bei der Sterilisation wurden bei 3M (St. Paul, Minnesota, USA) mit einem BIER (Biological Indicator Evaluation Resistometer) simuliert.

I Ergebnisse

Insgesamt wurden neun Zyklen mit vier Handstücken durchgeführt, die mit Sporen auf Edelstahldrähten in ihren Spraykanälen beimpft waren. Bei drei Handstücken wurden außerdem 10 µl Pflegeöl in die Spraykanäle eingebracht. Die Reihe umfasste insgesamt 80 Drähte. Bei den negativen Kontrollen (2 × saubere Spraykanäle, 2 × gereinigte Drähte) wurde kein Wachstum festgestellt. Die mittlere Wiederfindung bei den kontaminierten Dräh-

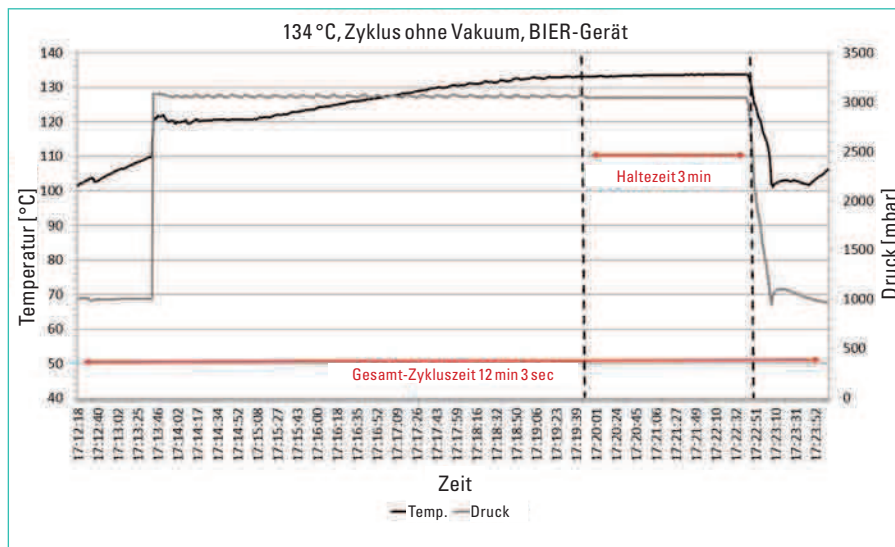


Abb. 1: Resistometer (H&W) mit Zyklus ohne Vakuum (gesamte abgebildete Zykluszeit 12 min 3 s)

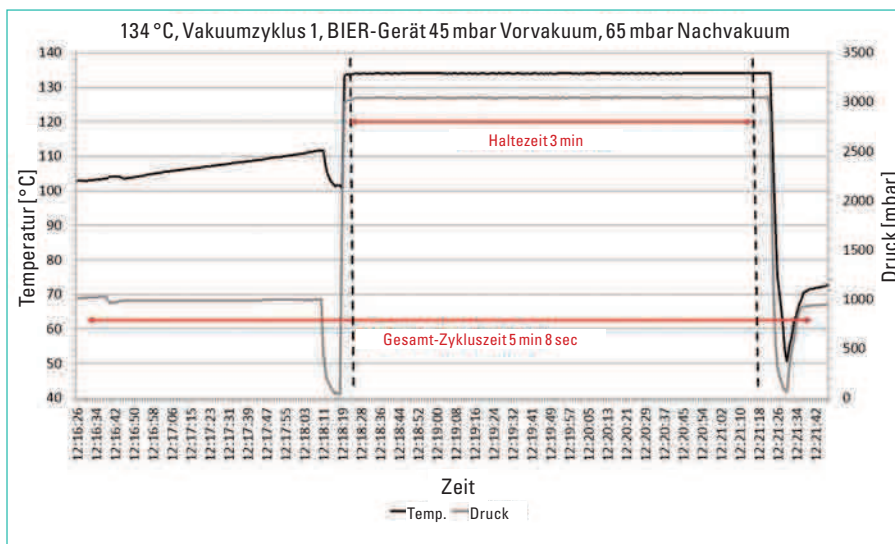


Abb. 2: Vakuumzyklus 1 mit 1 Vorvakuumstoß (gesamte abgebildete Zykluszeit 5 min 8 s)

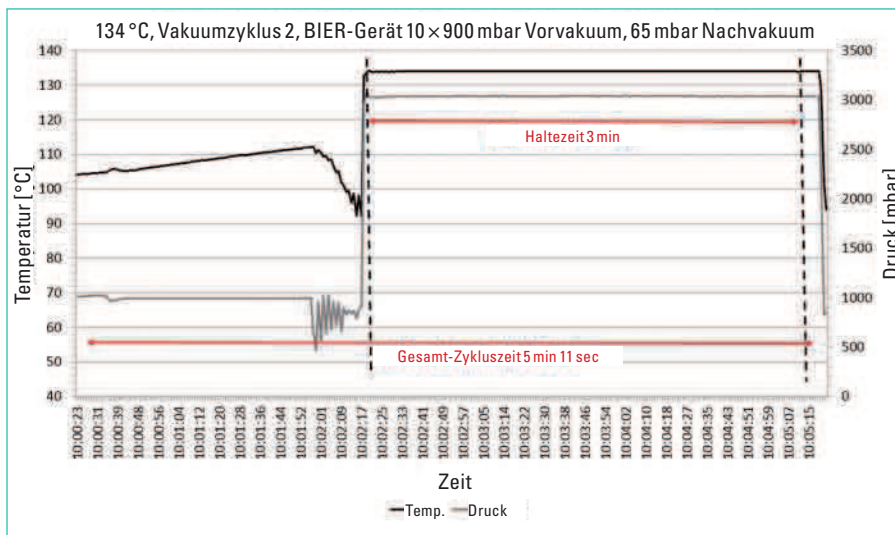


Abb. 3: Resistometer mit Vakuumzyklus 2 mit 10 Vorvakuumstößen à 900 mbar (gesamte abgebildete Zykluszeit 5 min 11 s)

ten ohne Öl (N = 6) wurde als $3,4 \times 10^6$ bis $2,5 \times 10^7$ berechnet.

Zyklus 1 (ohne Vakuum)

In dem Zyklus ohne Vakuum betrug die mittlere Zeit zum Erreichen der Sterilisationstemperatur 9 min 14 s bei einer leeren Kammer und 11 min 47 s bei einer Kammer mit Versuchsbeladung. Auf keinem der 12 mit diesem Zyklus aufbereiteten Handstücke wurden Sporen wiedergefunden.

Zyklus 2 (1 Vorvakuumstoß mit 45 mbar)

In diesem Vakuumzyklus 1 wurde der gleiche Vergleich zwischen Kammer ohne und mit Beladung durchgeführt. Hier dauerte es 2 min 4 s bzw. 1 min 50 s bis zum Erreichen der Sterilisationstemperatur. Auf den in Vakuumzyklus 1 mit Vorvakuum aufbereiteten Handstücken (1 Kontrolle ohne Öl, 3 Proben) wurden Sporen wiedergefunden.

Zyklus 3 (10 Vorvakuumstöße mit 900 mbar)

In diesem Vakuumzyklus 2 betrug die Aufheizdauer 2 min 58 s bei leerer Kammer und 4 min 56 s mit Beladung. Auf keinem der 12 in Vakuumzyklus 2 aufbereiteten Handstücke wurden Sporen wiedergefunden (Tabellen 1a bis 1c).

I Diskussion

Die drei unabdingbaren Parameter für die Dampfsterilisation sind eine Temperatur von 134 °C, eine Dauer von 3 Minuten (nach Perkins 1956 und dem ersten, 1959 veröffentlichten MRC-Bericht) und ein Kammerdruck von 2,2 bar – so ist es in EN 556-1:2001 beschrieben: «Sterilisation von Medizinprodukten – Anforderungen an Medizinprodukte, die als STERIL gekennzeichnet werden» [2, 15, 16]. Trotz etlicher rechtlicher Anforderungen, Normen, Richtlinien und Empfehlungen (z.B. 134 °C, 3 min, 2,2 bar) gibt es für die Dampfsterilisation Zyklen mit vielen unterschiedlichen Profilen. Rutala et al. berichteten 2008, dass die Dampfsterilisation bei 134 °C über 4 Minuten mit einem Vakuumprogramm (Tiefe des Vakuums nicht angegeben) chirurgische Instrumente, die mit raffiniertem Mineralöl (98%) geschmiert worden waren, wirksam sterilisierte [17]. Hegna et al. berichteten 1978 wiederum, dass die Sterilisation bei 134 °C über 8 Minuten in einem Großsterilisator mit Vaku-

Tabelle 1a: Ergebnisse der Untersuchung von Handstücken nach dem Zyklus ohne Vakuum (Hs = Handstück)											
Wachstum von Sporen von <i>G. stearothermophilus</i> auf Drähten aus Handstücken im Zyklus ohne Vakuum (KbE/Anzahl der Drähte in den Lumina)											
Durchlauf 1 (gesamte Zykluszeit 12 min 44 s)				Durchlauf 2 (gesamte Zykluszeit 12 min 7 s)				Durchlauf 3 (gesamte Zykluszeit 27 min 11 s)			
Hs 1 + Öl	Hs 2 + Öl	Hs 3 + Öl	Hs - Öl	Hs 1 + Öl	Hs 2 + Öl	Hs 3 + Öl	Hs - Öl	Hs 1 + Öl	Hs 2 + Öl	Hs 3 + Öl	Hs + Öl
0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2

Tabelle 1b: Ergebnisse der Untersuchung von Handstücken nach Zyklus 1 mit Vakuum (Hs = Handstück)											
Wachstum von Sporen von <i>G. stearothermophilus</i> auf Drähten aus Handstücken in Zyklus 1 mit Vakuum (KbE/Anzahl der Drähte in den Lumina)											
Durchlauf 1 (gesamte Zykluszeit 6 min 28 s)				Durchlauf 2 (gesamte Zykluszeit 6 min 44 s)				Durchlauf 3 (gesamte Zykluszeit 6 min 11 s)			
Hs 1 + Öl	Hs 2 + Öl	Hs 3 + Öl	Hs - Öl	Hs 1 + Öl	Hs 2 + Öl	Hs 3 + Öl	Hs - Öl	Hs 1 + Öl	Hs 2 + Öl	Hs 3 + Öl	Hs - Öl
2/2	0/2	0/2	1/2	0/2	3/2	0/2	0/2	0/2	0/2	2/2	0/2

Tabelle 1c: Ergebnisse der Untersuchung von Handstücken nach Zyklus 2 mit Vakuum (Hs = Handstück)											
Wachstum von Sporen von <i>G. stearothermophilus</i> auf Drähten aus Handstücken in Zyklus 2 mit Vakuum (KbE/Anzahl der Drähte in den Lumina)											
Durchlauf 1 (gesamte Zykluszeit 5 min 44 s)				Durchlauf 2 (gesamte Zykluszeit 5 min 9 s)				Durchlauf 3 (gesamte Zykluszeit 6 min 57 s)			
Hs 1 + Öl	Hs 2 + Öl	Hs 3 + Öl	Hs - Öl	Hs 1 + Öl	Hs 2 + Öl	Hs 3 + Öl	Hs - Öl	Hs 1 + Öl	Hs 2 + Öl	Hs 3 + Öl	Hs - Öl
0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2

umprogramm (Tiefe des Vakuums nicht angegeben) ausreichend zur Sterilisation geschmierter und nicht geschmierter zahnärztlicher Handstücke war. Zur Schmierung der Handstücke wurde Intraspray (Kavo) verwendet [18].

In komplexen Geräten wie zahnärztlichen Handstücken kann Öl im Lumen die Dampfdurchdringung blockieren. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass die Feuchtigkeit einen Ölüberzug auf Flächen und Sporen nicht durchdringen kann. An Stellen mit eingeschränkter Dampfdurchdringung würde dann trockene Hitze einwirken und damit die Dauer zum entscheidenden Faktor für eine wirkungsvolle Sterilisation machen. Der Versuchsaufbau in dieser Studie kombiniert beide Problemstellungen in einem Worst-Case-Szenario.

Wenn ein Sterilisationsvorgang in Spraykanälen (den engsten Kanälen in zahnärztlichen Handstücken) trotz der Anwesenheit von Öl Sterilität erzielen kann, darf angenommen werden, dass der Dampf auch alle anderen innenliegenden Flächen erreicht und damit das gesamte Instrument sterilisiert. Die Ergebnisse zeigen, dass bei Anwesenheit von Öl zwar überlebende Sporen wiedergefunden wurden, aber in dem Zyklus mit einem Vorvakuumstoß dennoch eine erhebliche Log-Stufen-Reduktion stattfand. Vorgänge mit trockener Hitze werden mit höheren Temperaturen und über eine längere Dauer durchgeführt als bei feuchter Hitze, z.B. bei 160 °C über 2 Stunden [19]. Es wäre nützlich gewesen, den D-Wert der Sporen während ihrer Suspendierung in Öl zu ermitteln. Die mittlere Aufheizdauer betrug

bei dem Zyklus ohne Vakuum 11 min 47 s und im Vakuumzyklus 2 mit zehn kurzen Vakuumstößen 4 min 56 s. Möglicherweise haben mehrere Vakuumstöße das Öl in den Lumina so bewegt, dass im Vergleich zu Vakuumzyklus 1 mit einem Vakuumstoß eine bessere Dampfdurchdringung stattfand. Bei den anderen Versuchszyklen wurden keine überlebenden Sporen gefunden. Es wurde bisher relativ wenig zum Einfluss von Pflegeöl für Handstücke auf das Überleben von Organismen in biologischen Indikatoren bei der Dampfsterilisation veröffentlicht. Hegna et al. (1978) verwendeten einen Sterilisationsprozess mit Gravitationsverfahren und einer Einwirkzeit von 8 min bei 134 °C, um die Inaktivierung von *G. stearothermophilus* auf mit Öl geschmierten zahnärztlichen Handstücken zu ermitteln. Es wurde kein

Wachstum festgestellt [18]. Diese Ergebnisse entsprechen den Erkenntnissen der vorliegenden Studie, obwohl in der Studie von Hegna et al. nur acht Instrumente getestet wurden. Edwardsson et al. (1983) prüften die Schmierung von Handstücken mit und ohne antimikrobiellen Wirkstoff und verglichen die Ergebnisse mit Handstücken, die ohne Schmierung nach vorheriger Kontamination mit einer Speichelsuspension mit *G. stearothermophilus* sterilisiert worden waren. Die Sterilisationsvorgänge fanden bei 120–124 °C über 20 min und bei 134–138 °C über 10 min statt. Einige Exemplare von *G. stearothermophilus* überlebten auf den Handstücken ohne Schmierung und mit Schmierung ohne antimikrobiellen Wirkstoff. Daraus folgerten die Autoren, dass der Dampf bei Öl ohne antimikrobiellen Wirkstoff nicht an die zu sterilisierenden Flächen gelangen konnte und die Lumina nicht mit den eingesetzten Gravitationsverfahren sterilisiert werden konnten. Es wurden mehrere Versuche an 10 Handstücken durchgeführt [20]. 1999 untersuchten Andersen et al. bei vier Sterilisatoren ohne Vakuum und einem Tisch-Sterilisator mit Vakuum die Wirksamkeit der Sterilisation bei 121 °C über 20 Minuten. 12 Dentalturbinen wurden gereinigt und anschließend mit *G. stearothermophilus* kontaminiert. In allen Sterilisationsprogrammen ohne Vakuum wurde ein Wachstum festgestellt. Bei dem Programm mit Vakuum wurde kein Wachstum festgestellt [21].

Wir vermuten, dass (abhängig von der Zusammensetzung des Pflegeöls) die Anwesenheit von Öl die Wirksamkeit des Sterilisationsvorgangs auf mindestens zwei Arten beeinträchtigen kann.

1 Schutz der mikrobiellen Proteine vor der denaturierenden Wirkung von feuchtem Dampf und damit Erhöhung des D-Werts: Zu den Wartungsaufgaben, die laut Herstellerangaben vor der Sterilisation durchgeführt werden sollen, gehört auch die interne Schmierung. Senhaji und Loncin veröffentlichten 1977 «The protective effect of fat on the heat resistance of bacteria» («Die schützende Wirkung von Fett auf die Wärmebeständigkeit von Mikroorganismen»), worin sie beschreiben, dass die Wärmebeständigkeit von *Bacillus subtilis* bei Anwesenheit von Öl und bei Abwesenheit von Wasser am größten ist [13].

2 Physische Blockade des Dampfes durch Öltröpfchen in engen Lumina, insbesondere bei unsachgemäß durchgeführter Schmierung.

In unseren Versuchen hatten die Lumina einen Durchmesser von 0,9 mm und die Drähte einen Durchmesser von 0,2 mm. Durch das Pipettieren von Öl in die Lumina könnten sich die Spraykanäle der Handstücke durchaus blockieren lassen. Es ist möglich, dass sich die unterschiedlichen Zyklusprofile in den Versuchen auf die Bewegung des Öls in den Spraykanälen auswirken. Es kommt also nicht auf die An- oder Abwesenheit von Öl an, sondern auf das Zyklusprofil und die gesamte Einwirkzeit. Die mittlere Aufheizdauer betrug bei dem Zyklus ohne Vakuum 11 min 47 s und beim Vakuumzyklus 2 mit zehn kurzen Vakuumstößen 4 min 56 s. In diesem Zeitraum werden einige der Sporen schon vor Beginn der dreiminütigen Einwirkzeit inaktiviert, die ab Erreichen einer Temperatur von 134 °C läuft. Daraus ergibt sich eine höhere Letalität als im Vakuumzyklus 1 (Aufheizdauer 1 min 50 s), bei dem sich auf 4 von 12 Handstücken überlebende Sporen fanden. In den anderen Versuchszyklen wurden keine überlebenden Sporen gefunden.

Im Vakuumzyklus hatten wir keine überlebenden Sporen erwartet, wohl aber beim Zyklus ohne Vakuum. Obwohl wir in dieser Studie mit einem Resistometer (BIER) gearbeitet haben, war es uns technisch nicht möglich, für alle Zyklen mit einer programmierten Einwirkzeit von 3 Minuten dieselbe Aufheizdauer zu erzielen. Das ist nachteilig für die vorliegende Untersuchung, denn die integrierte Letalität (F_0) jedes Zyklus war so hoch, dass Änderungen des D-Werts, die durch die Anwesenheit des Öls bedingt waren, insgesamt keine Auswirkung auf den Nachweis von überlebenden Sporen nach Abschluss des Zyklus hatten. Rutala et al. erzielten mit der Dampfsterilisation bei 134 °C über 4 Minuten mit einem Vakuumprogramm eine wirksame Sterilisation chirurgischer Instrumente, die mit raffiniertem Mineralöl (98%) geschmiert worden waren [17]. Hegna et al. berichteten wiederum, dass die Sterilisation bei 134 °C über 8 Minuten in einem Großsterilisator mit Vakuumprogramm geschmierte und nicht geschmierte zahnärztliche Handstücke wirksam sterilisierte. Zur Schmierung der Handstücke wurde «Intraspray» verwendet [18].

Die Ergebnisse verschiedener Studien unterscheiden sich in Parametern wie Temperatur/Zeit, mit/ohne Vakuum und Verfahren zur Wiederfindung von Sporen stark voneinander. Der wesentliche Nachteil bei der Zählung von Kolonien ist die Tatsache, dass geschädigte Sporen – je nach Wiederfindungsverfahren – mit geringerer Wahrscheinlichkeit nachgewiesen werden, und die Wiederfindung von Sporen in Nährlösung liefert keine Zahlen, sondern nur die Angabe Wachstum oder kein Wachstum.

Insgesamt lässt sich sagen, dass weitere Forschungen in diesem Bereich notwendig sind, um die Dampfsterilisation von Medizinprodukten mit Lumen zu verstehen und zuverlässigere Verfahren zu entwickeln, um die Abtötung von Mikroorganismen in einer Beladung mit Hohlräumen zu überwachen.

Pflegeöl im Lumen zahnärztlicher Handstücke verhindert nicht die Inaktivierung von Mikroorganismen, die als Kontamination in die Lumina eingebracht wurden. Es ist möglich, Mikroorganismen im Lumen eines zahnärztlichen Handstücks mit einem Zyklus mit Gravitationsverfahren zu inaktivieren. Dies ist höchstwahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass der Zyklus durch die sehr lange Dauer bis zum Erreichen der Sterilisationstemperatur (weil die verbleibende Luft langsam durch den Kammerablauf aus der Kammer entweicht) mehr Zeit in Anspruch nimmt. Eventuell lassen sich Mikroorganismen in mit Öl geschmierten zahnärztlichen Handstücken leichter durch einen Zyklus mit mehreren Vakuumstößen inaktivieren, möglicherweise, weil diese Stöße das Öl gleichmäßiger im Inneren der Instrumente verteilen, so dass keine größeren Ölpfropfen mehr das Lumen verstopfen. Aufgrund der relativ wenigen überlebenden Sporen in Zyklus 1b ist dies lediglich eine Vermutung, deren Bestätigung ganz klar eine häufigere Durchführung der Versuche erfordern würde. ■

I Danksagungen

Dieses Projekt wurde von W&H, UK, durch ein Doktoranden-Industriestipendium unterstützt sowie durch William Foltz, Janet Prust, Assumpta Bennaars-Eiden, Joe Meyer und Paul N. Holt von 3M Healthcare, St. Paul, MN, USA, die die für diese Studie benötigten Labors und Geräte bereitstellten.

I Literatur

- MDD, E.P.o.t.C., Council Directive 93/42/EEC of 14 June 1993 concerning medical devices. 1993.
- 556-1:2001, British Standard BS EN 556-1:2001, Sterilization of medical devices. Requirements for medical devices to be designated "STERILE". Requirements for terminally sterilized medical devices, BS EN, London, British Standard Institute.
- 13060:2014, British Standard BS EN 13060:2014, Small steam sterilizers, BS EN, London, British Standard Institute.
- 285:2006+A2:2009, British Standard BS EN 285:2006+A2:2009, Sterilization – Steam sterilizers – Large sterilizers, BS EN, London, British Standard Institute.
- 11140-1:2009, British Standard BS EN ISO 11140-1:2009, Sterilization of health care products – Chemical indicators. Part 1: General requirements (ISO 11140-1:2005), BS EN ISO, London, British Standard Institute.
- 11138-1:2006, British Standard BS EN ISO 11138-1:2006, Sterilization of health care products. Biological indicators. General requirements, BS EN ISO, London, British Standard Institute.
- 867-4:2001, British Standard BS EN 867-4:2001, Non-biological systems for use in sterilizers. Specification for indicators as an alternative to the Bowie and Dick test for the detection of steam penetration, BS EN, London, British Standard Institute.
- 867-5:2001, British Standard BS EN 867-5:2001, Non-biological systems for use in sterilizers. Specification for indicator systems and process challenge devices for use in performance testing for small sterilizers Type B and Type S, BS EN, London, British Standard Institute.
- CDC, T.C.f.D.C.a.P., Guidelines for Infection Control in Dental Health-Care Settings. 2003.
- BDA, B.D.A., Health Technical Memorandum (HTM) 01-05: Decontamination in primary care dental practices. 2013.
- 17665-1:2006, British Standard BS EN ISO 17665-1:2006, Sterilization of health care products – Moist heat – Part 1: Requirements for the development, validation and routine control of a sterilization process for medical devices, BS EN ISO, London, British Standards Institute.
- Halleck, F.E., et al., Criteria for determining steam sterilization cycles for lubricated and nonlubricated mechanical equipment. Med Instrum, 1979. 13(3): 168–171.
- Senhaji, A.F., The protective effect of fat on the heat resistance of bacteria (I). J. Fd Technol., 1977. 12: 203–216.
- Pharmacopoeia, European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care, C.o. Europe, Editor 2014.
- MRC, Sterilisation by steam under increased pressure – Medical Research Council by the working party on pressure-steam sterilisers. The Lancet, 1959. February.
- Perkins, J.J., Principles and Methods of Sterilization in Health Science. Vol. Second Edition. 1983: Charles C Thomas Publisher. 560.
- Rutala, W.A., M.F. Gergen, and D.J. Weber, Impact of an oil-based lubricant on the effectiveness of the sterilization processes. Infect Control Hosp Epidemiol, 2008. 29(1): 69–72.
- Hegna, I.K., K. Kardel, and M. Kardel, Autoclaving of lubricated dental instruments. Scand J Dent Res, 1978. 86(2): 130–134.
- Russell, A.D., The Destruction of Bacterial Spores 1982: Academic Press Inc. Ltd. 333.
- Edwardsson, S., G. Svensater, and D. Birkhed, Steam sterilization of air turbine dental handpieces. Acta Odontol Scand, 1983. 41(6): 321–326.
- Andersen, H.K., N.E. Fiehn, and T. Larsen, Effect of steam sterilization inside the turbine chambers of dental turbines. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 1999. 87(2): 184–188.

SAVUNA
UMWELTGERECHTE LÖSUNGEN
FÜR MEDIZIN UND TECHNIK



Sterisafe® DURO A3

reduziert Ausfallzeiten und Servicekosten
flexibler Endoskope von

STORZ
KARL STORZ – ENDOSKOP

OLYMPUS

RICHARD WOLF
spirit of excellence

validiert in STERRAD®
NX und 100NX

ASP

R. WOLF zusätzlich auch in 100S

World Wide No. 1
sterilization container for
heat sensitive instruments

Health
made in Germany

The influence of lubricating oil on the efficacy of steam sterilization processes used to decontaminate dental handpieces

S. Winter*, A. Smith¹, B. Kirk², D. Lappin¹

Dental handpieces pose a risk of cross infection due to contamination with patient material. Cleaning and sterilization of dental handpieces is challenging, due to a complex design. A further limiting factor influencing achievement of sterilization conditions, is the presence of oil used to lubricate internal components. If moisture is absent then the process takes place in “dry heat” conditions and the time and temperature of exposure must be significantly increased (e.g. 160 °C for 2 h). Lubricating oils can be hydrophobic in nature and therefore, if present, prevent moisture in steam from reaching surfaces and thereby affect microbial kill (sterility).

The aim of this study was to investigate the effect of handpiece oil in dental handpieces on the inactivation of *Geobacillus stearothermophilus* spores during steam sterilization. Handpieces were inoculated with a spore solution dried onto stainless steel wires, which were then placed into spray channels, followed by inoculation of handpiece oil (W&H, Austria). In order to investigate kill rates of different sterilization cycle profiles a Biological Indicator Evaluation Resistometer (BIER vessel) was used. Three different sterilization processes were investigated (two vacuum and one non-vacuum process). Spores were recovered by sonication of wires in phosphate buffer saline (PBS), filtration and plating on Tryptone Soy Agar (TSA). Recovered spores were expressed as colony forming units (cfu). Spores were recovered in only one type of process (with one pre-vacuum pulse) from 4 out of 12 processed handpieces. In conclusion this study suggests that it would be prudent to validate sterilization cycles with equipment and conditions that are likely to be encountered in clinical practice. Making assumptions

that all bacteria are killed during sterilization processes, despite the overkill of three minutes at 134 °C in terms of integrated lethality, is not necessarily correct.

Introduction

Dental handpieces have been classed as medical devices by the Medical Devices Directive [1]. Several standards detail conditions for sterilizing medical devices [2], design and requirements for large and small steam sterilizers [3, 4], chemical indicators (CI) [5], biological indicators (BI) [6] and process challenge devices (PCD's) [7, 8]. Recommendations for the requirements to reprocess medical devices are published in several guidelines, which class dental handpieces as “semicritical/critical A” (assessment, treatment) or “semicritical/critical B” (invasive treatment, operation, endoscopy) [9, 10] and address the requirement for dental handpieces to be decontaminated and maintained in order to avoid cross infections and provide health and safety of patients and staff in dental practice. However, cleaning as well as steam sterilization of dental handpieces is challenging, due to their multiple internal components and lumens, which are difficult to be accessed by steam. In addition to the challenge of sterilizing hollow devices, little is known about the effect of handpiece maintenance oil on the resistance of microorganisms and therefore the efficacy of the steam sterilization process. For steam sterilization to be effective three critical process variables must be achieved on every surface to be sterilized. Moisture should be present, usually delivered in the form of dry saturated steam, which must then be held at a specified temperature for a defined length of time (e.g. 134 to 137 °C

KEY WORDS

- steam sterilization
- steam penetration
- dental handpieces
- narrow lumens
- hollow load
- biological indicators

for not less than 3 minutes. If moisture is absent then the process takes place in “dry heat” conditions and the time and temperature of exposure must be significantly increased (e.g. 160 °C for 2 h) [11].

Lubricating oils can be hydrophobic in nature and therefore, if present, prevent moisture from reaching surfaces, which require sterilization. The presence of oil is known to influence the D-value (the time required to inactivate 90% of a microbial population at a specified temperature) of microorganisms. However the maintenance of dental handpieces includes, according to the manufacturers' instructions, the need for internal lubrication prior sterilization. There is a limited amount of published evidence evaluating the ef-

* Dr. Sandra Winter, MVLS University of Glasgow, Glasgow Dental Hospital & School, Infection and Immunity, Level 9, 378 Sauchiehall Street, G2 3JZ Glasgow, UK

E-mail: sandra.winter@belimed.com
1 MVLS University of Glasgow, Glasgow Dental Hospital & School

2 3M Health Care, Loughborough, UK

fect of lubricant residues on the resistance of microbial contamination. Halleck et al. found that oil (Mobil DTE 25, Mobile Oil Corp., New York, NY) increased the D-value of *Geobacillus stearothermophilus* from 2.5 to 5.6 at a temperature of 250 °F (121 °C) and from 0.2 to 0.7 at 270 °F (132 °C) [12]. A further example of the protective effect of oils on microbial resistance was published by Senhaji and Loncin, where they describe that heat resistance of *Bacillus subtilis* is greatest in the presence of oil and the absence of water [13]. Furthermore, many dentists use spray cans to lubricate handpieces. If these spray cans are used incorrectly, oil will be located throughout the internal surfaces of the handpiece, including the spray channels, which is an additional challenge for steam penetration.

The aim of this study was to investigate the influence of handpiece lubricating oil on *G. stearothermophilus* spore inactivation on stainless steel surfaces in dental handpieces during steam sterilization processes.

I Materials and Methods

Cleaning of stainless steel wires (stainless steel 316, d=0.2 mm, l=122 cm, Cadence Science, Baltimore, MD, USA)

The wires were soaked in enzymatic soap solution (Metrizyme, Metrex, CA, USA) for at least 1 min at room temperature (RT), wiped clean using a cotton cloth until no residues were visible on the cloth. This was followed by a hot water rinse and three rinses using distilled water. Wires were left to dry for 30 – 60 min in a laminar flow hood.

Preparation of spore solution: Tenfold dilutions of spore solution in water (spore crop ID "S718", 3M, St. Paul, MN, USA) harvested from cultures on agar, provided by 3M, St. Paul, MN, USA) with a D-value of $D_{121} = 2.2$ min, were performed and plated onto TSA (tryptic soy agar, Remel, Lenexa, KS, USA) plates in duplicate and incubated at 66 °C for up to 24 h (Mechanical Convection Incubator, Precision). Plates with colonies between 30 and 300 colony forming units (cfu) were counted and the stock solution was calculated to have a spore population of 2.3×10^8 spores/ml. The calculated spore count (according to EN ISO 11138-1:2006) of the stock spore solution was determined to be between 1.15×10^8

– 6.9×10^8 spores/ml. The stock solution was diluted in 20% Ethanol in Millipore H₂O solution, to a range of 5.8×10^7 – 3.5×10^8 spores/ml, in order to dry on stainless steel wires over night. The standard inoculum was 10 µL of spore solution (range: 5.8×10^5 – 3.5×10^6 spores). 10 µL of *G. stearothermophilus* spores (range: 5.8×10^5 – 3.5×10^6 spores) was inoculated, using gel loading pipette tips, onto stainless steel wires (d = 0.2 mm), tightly screwed to a metal rack, and dried over night at room temperature. Stainless steel wires were cut to a length of 82 mm each and inserted into spray channels (d = 0.9 mm, l = 80 mm, V = 50.8 mm³) of three handpieces, followed by inoculation of 10 µL handpiece oil (synthetic hydrocarbon oil ester oil, f1 service oil, W&H, Austria) directly into each spray channel using a pipette and 200 µL tips. A negative control comprising one handpiece with a wire in each spray channel without spores and a positive control comprising inoculated wire without sterilization were included and repeated three times.

Biological Indicator Evaluation Resistometer (BIER)

In order to investigate different sterilization cycle profiles, a BIER vessel (3M) was used to individually program exposure time, number and depth of vacuum pulses. Three different sterilization cycles were programmed and compared (Figures 1–3). The following equation was used to calculate integrated lethality (F_0)

$$F_0 = t(10^{(T-121.1)/z}),$$

where t is the time interval of points of measurement; T is the temperature at the point of measurement; z is the z-value, assumed to be 10. Further calculation of log reduction of the microbial population is performed by F_0/D_{121} [14].

Cycle 1: Non-vacuum cycle, no pre-vacuum, 3 min at 134 °C, no post-vacuum, $F_0=114$ (52 log reduction)

Cycle 2: Vacuum cycle 1, one 45 mbar pre-vacuum pulse, 3 min at 134 °C, one 65 mbar post-vacuum pulse, $F_0=60$ (27 log reduction)

Cycle 3: Vacuum cycle 2, ten 900 mbar pre-vacuum pulses, 3 min at 134 °C, one 65 mbar post-vacuum pulse, $F_0=60$ (27 log reduction)

Cycles with an empty chamber were performed to investigate whether the load

influenced the heat up time. Recovery of *G. stearothermophilus* was performed by transferring both wires into centrifuge tubes containing 50 ml of phosphate buffer saline (PBS) + 0.1% Tween 80), followed by 20 min sonication (Branson 2200, CA, USA), filtration (Micro Funnel filter unit, GN-6 membrane 0.45 µm, Pall Life Science, USA) with two wash steps, using 50 ml of buffer, and placing the filter paper onto tryptic soy agar (TSA; Remel, Lenexa, KS, USA). Incubation was performed at 66 °C for up to 48 h (Mechanical Convection Incubator, Precision), followed by counting colony forming units (cfu). Experiments were performed in triplicate and included negative controls (two cleaned wires and two cleaned spray channels (flushing with 2 ml of PBS + 0.1% Tween 80)) and positive controls (six contaminated wires, no sterilization). The sterilization processes were simulated using a biological indicator evaluation resistometer (H&W) at 3M (St. Paul, Minnesota, USA).

I Results

A total number of nine cycles were performed, comprising four handpieces inoculated with spores on stainless steel wires in spray channels. Spray channels in 3 handpieces were also inoculated with 10 µL handpiece oil. In total 80 wires were assessed. No growth was detected in the negative controls (clean spray channels ×2 and cleaned wires ×2). The mean calculated recovery range of contaminated wires without oil (N = 6) was 3.4×10^6 – 2.5×10^7 .

Cycle 1 (non-vacuum)

Using the non-vacuum cycle, the mean time to reach sterilization temperature was 9 min 14 sec in an empty chamber and 11 min 47 sec in a chamber with experimental load. No spores were recovered from any of the 12 handpieces processed in this cycle.

Cycle 2 (1x45 mbar pre-vacuum)

The same comparison for empty chamber and chamber with load was performed for vacuum cycle 1, which resulted in 2 min 4 sec and 1 min 50 sec, respectively to reach sterilization temperature. Spores were recovered from processed handpieces in vacuum cycle 1 with pre-vacuum (1 oil control, 3 samples).

Cycle 3 (10x900 mbar pre-vacuum)

For vacuum cycle 2 the heat up time was 2 min 58 sec empty and 4 min 56 sec with load. No spores were recovered from any of the 12 handpieces processed in vacuum cycle 2 (Tables 1a to 1c).

I Discussion

Critical parameters for steam sterilization are 134 °C for 3 minutes (based on Perkins, 1956 and the 1st MRC report, published in 1959) at a chamber pressure of 2.2 bar, as described in BS EN 556-1:2001 “Sterilization of medical devices – Requirements for medical devices to be designed “sterile”” [2, 15, 16]. Although there are several legal requirements, standards, guidelines and recommendations (e.g. 134 °C, 3 min, 2.2 bar), many different cycle profiles for steam sterilization processes exist. Rutala et al., 2008 reported steam sterilization at 134 °C for 4 minutes using a vacuum sterilization process (vacuum depth not specified) to be effective for sterilizing surgical instruments lubricated with refined mineral oil (98%) [17], while Hegna et al., 1978 reported a sterilization process at 134 °C for 8 min in a large vacuum sterilizer (vacuum depth not specified) to be sufficient to sterilize lubricated and non-lubricated dental handpieces. Intraspray (Kavo) was used to lubricate the handpieces [18].

In complex devices, such as dental handpieces, oil in lumens may block steam penetration. Another possibility is that coating the surfaces and the spores with oil prevent moisture from penetrating through the layer of oil. Thus dry heat conditions would exist in areas where steam penetration is impaired, which makes time a critical factor for effective sterilization. The experimental setup of this study combines both challenges in a worst case scenario. If sterility in spray channels (narrowest channels in the dental handpiece) is achievable in a sterilization process, despite the presence of oil, the assumption that steam successfully penetrates all other internal surfaces as well and therefore ensures sterility of the whole instrument, could be made. The results show that, whilst survivors were recovered when oil was present, considerable log reduction occurred in the single pre-vacuum cycle. Dry heat processes are carried out at higher temperatures and for longer times than moist heat e.g. 160 °C for 2 hours [19]. It

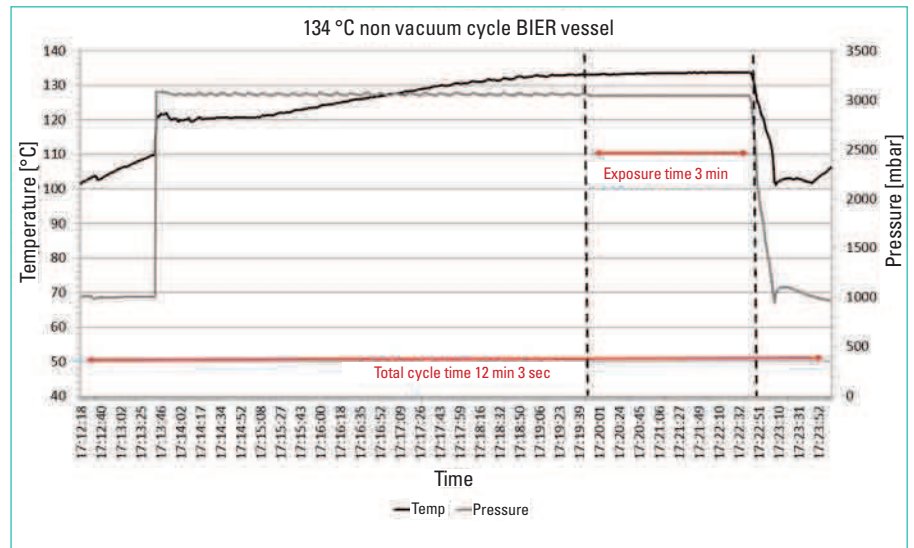


Fig. 1: Non-vacuum cycle resistometer (H&W) (total cycle time shown 12 min 3 sec)

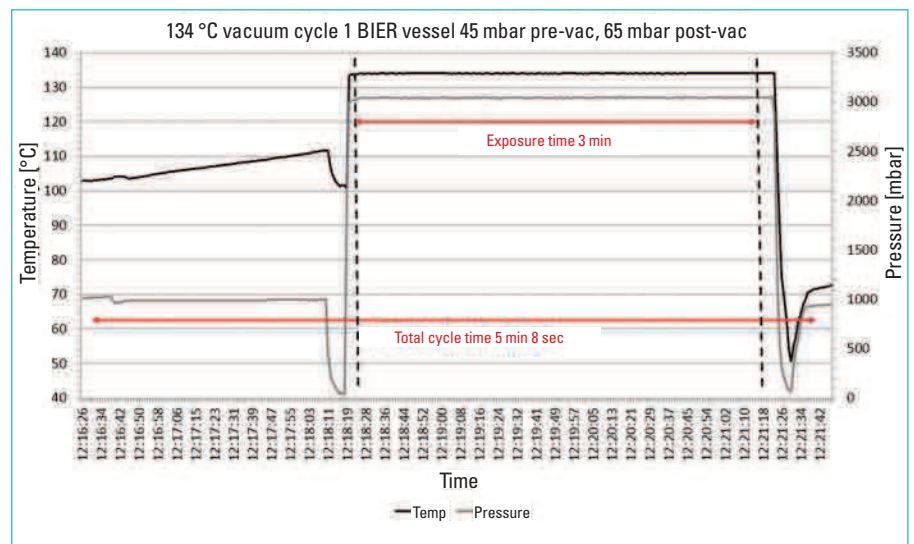


Fig. 2: Vacuum cycle 1 with 1 pre-vacuum pulse (total cycle time shown 5 min 8 sec)

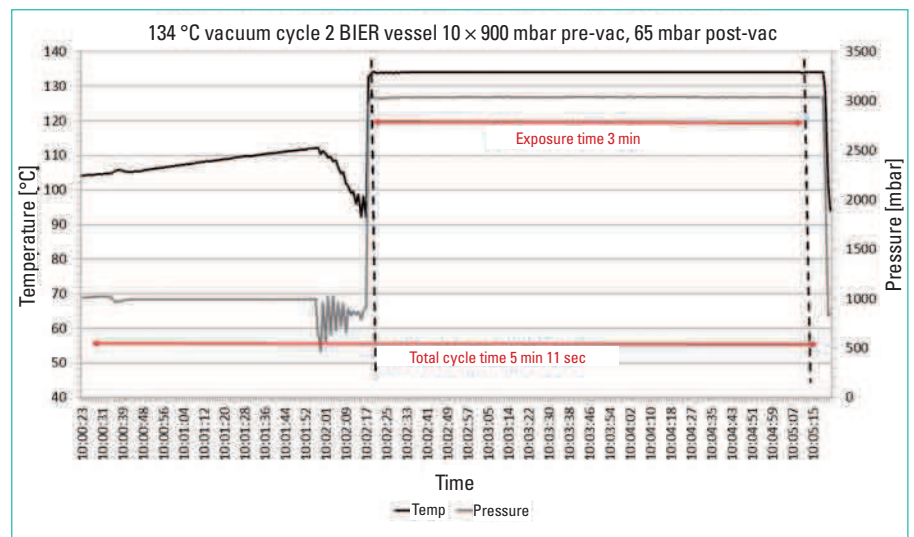


Fig. 3: Vacuum cycle 2 resistometer 10 × 900 mbar pre-vacuum pulses (total cycle time shown 5 min 11 sec)

Table 1a: Results of handpiece experiments in non-vacuum cycle (Hp = handpiece)

Growth of <i>G. stearothermophilus</i> spores on wires from handpieces in non-vacuum cycle (cfu/number of wires in lumens)											
Run 1 (total cycle time 12 min 44 sec)				Run 2 (total cycle time 12 min 7 sec)				Run 3 (total cycle time 27 min 11 sec)			
Hp 1 +oil	Hp 2 +oil	Hp 3 +oil	Hp - oil	Hp 1 +oil	Hp 2 +oil	Hp 3 +oil	Hp - oil	Hp 1 +oil	Hp 2 +oil	Hp 3 +oil	Hp - oil
0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2

Table 1b: Results of handpiece experiments in vacuum cycle 1 (Hp = handpiece)

Growth of <i>G. stearothermophilus</i> spores on wires from handpieces in vacuum cycle 1 (cfu/number of wires in lumens)											
Run 1 (total cycle time 6 min 28 sec)				Run 2 (total cycle time 6 min 44 sec)				Run 3 (total cycle time 6 min 11 sec)			
Hp 1 +oil	Hp 2 +oil	Hp 3 +oil	Hp - oil	Hp 1 +oil	Hp 2 +oil	Hp 3 +oil	Hp - oil	Hp 1 +oil	Hp 2 +oil	Hp 3 +oil	Hp - oil
2/2	0/2	0/2	1/2	0/2	3/2	0/2	0/2	0/2	0/2	2/2	0/2

Table 1c: Results of handpiece experiments in vacuum cycle 2 (Hp = handpiece)

Growth of <i>G. stearothermophilus</i> spores on wires from handpieces in vacuum cycle 2 (cfu/number of wires in lumens)											
Run 1 (total cycle time 5 min 44 sec)				Run 2 (total cycle time 5 min 9 sec)				Run 3 (total cycle time 6 min 57 sec)			
Hp 1 +oil	Hp 2 +oil	Hp 3 +oil	Hp - oil	Hp 1 +oil	Hp 2 +oil	Hp 3 +oil	Hp - oil	Hp 1 +oil	Hp 2 +oil	Hp 3 +oil	Hp - oil
0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2

would have been useful to determine the D-value of the spores when suspended in oil. The mean heat up time in the non-vacuum cycles was 11 min 47 sec and 4 min 56 sec in the vacuum cycle 2 with ten small vacuum pulses. Multiple vacuum pulses may have moved the oil within the lumens, with the result of greater steam penetration compared to the single pulse of vacuum cycle 1. No surviving spores were found in the other cycles tested. Relatively little work has been published on the influence of handpiece oil on BI survival during steam sterilization. Hegna et al. (1978) used a sterilization process with gravity air displacement and an exposure time of 8 min at 134 °C to assess *G. stearothermophilus* inactivation in dental handpieces after lubrication. No growth was found [18]. These results correspond to the findings in the present study, although, only eight instruments were tested in the study by Hegna et al. Edwardsson et al. (1983) tested handpiece lubrication with and without an antimicrobial agent and compared the

results to handpieces that were sterilized without lubrication after contaminating the handpieces with a saliva suspension containing *G. stearothermophilus*. Sterilization processes used were 120–124 °C for 20 min and 134–138 °C for 10 min. Some *G. stearothermophilus* survived in handpieces without lubrication and lubrication without antimicrobial agent. Therefore the authors concluded that oil without antimicrobial agent impeded access for steam and the gravity cycles used failed to sterilize the lumens. Multiple experiments on 10 handpieces were performed [20]. In 1999, Andersen et al. investigated the efficacy of four non-vacuum sterilizers and one vacuum benchtop sterilizer, working at 121 °C for 20 minutes. 12 dental air turbines were cleaned before contamination with *G. stearothermophilus*. Growth was observed in all non-vacuum processes. The vacuum process resulted in no growth [21].

We postulate that (depending on the composition of the handpiece oil) the presence of oil can be detrimental to the efficacy of

the sterilization process in at least two different ways.

- 1 Protection of microbial proteins from denaturing effect of moist steam, leading to an increase in D-value. Maintenance of dental handpieces includes, according to manufacturers instructions, internal lubrication prior to sterilization. Senhaji and Loncin published "The protective effect of fat on the heat resistance of bacteria" in 1977, where they describe that heat resistance of *Bacillus subtilis* is greatest in the presence of oil and the absence of water [13].
- 2 Physical blockage of steam access by the presence of oil droplets in narrow lumens, especially if lubrication performed incorrectly.

In these experiments the lumens were 0.9 mm diameter and the wires were 0.2 mm diameter. Pipetting oil into the lumens could feasibly block the handpiece spray channels. The different cycle profiles in these experiments could influence

the movement of oil within the spray channels. Therefore, the critical factor is not the presence/absence of oil but the cycle design and the total exposure time. The mean heat up time in the non-vacuum cycles was 11 min 47 sec and 4 min 56 sec in the vacuum cycle 2 with ten small vacuum pulses. During this time, some of the spores will be inactivated even before exposure time (3 min) at 134 °C, which adds up to a greater lethality than the vacuum cycle 1 (heat up time 1 min 50 sec), where surviving spores were found in 4 out of 12 handpieces. No surviving spores were detected in the other cycles tested.

We did not expect to detect BI survivors in the vacuum cycle but did expect to find survivors in the non-vacuum cycle. Even though we used a BIER vessel in this study it was not technically possible for us to achieve the same heat up time for all cycles programmed to 3 min exposure, which is a drawback of the present study, because the integrated lethality (F_0) for each cycle was so great that changes in D-value due to the presence of oil had no overall effect on the detection of survivors at the end of the cycle. Rutala et al. used steam sterilization at 134 °C for 4 minutes with a vacuum sterilization process to be effective for sterilizing surgical instruments lubricated with refined mineral oil (98%) [17], while Hegna et al found a sterilization process at 134 °C for 8 min in a large vacuum sterilizer to effectively sterilize lubricated and non-lubricated dental handpieces. "Intraspray" was used to lubricate handpieces [18].

Results from different studies vary strongly in parameters like temperature/time, vacuum/non-vacuum and spore recovery method. The main limitation of the colony count method is that damaged spores are less likely to be detected, depending on the recovery method, whereas recovering spores in broth does not show numbers but growth/no growth only.

In conclusion it can be said that more research in this area needs to be performed in order to understand steam sterilization of lumen devices and to establish more reliable methods to monitor microbial kill in a hollow load.

The presence of lubricating oil introduced into the lumen of dental handpieces does not prevent the inactivation of contaminating microorganisms also introduced into the lumens. It is possible to achieve mi-

crobial inactivation within the lumen of a dental handpiece using a gravity displacement cycle and this is most likely achieved by virtue of the fact that the cycle becomes prolonged due to the very slow attainment of the sterilization temperature as residual air is slowly driven out of the chamber through the chamber drain. The inactivation of microorganisms in dental handpieces, lubricated with oil, may be more readily achieved using a cycle with multiple vacuum pulses and this may be as a result of the pressure pulses distributing the oil more evenly within the internal spaces rather than remaining as a large bolus of oil creating an occlusion within the lumen. This is a speculative conclusion due to the relatively low numbers of survivors observed in cycle 1b and very clearly a much larger number of replicates would be needed to confirm this observation. ■

Acknowledgements

This project was supported by W&H, UK, who sponsored an industrial scholarship PhD program and William Foltz, Janet Prust, Assumpta Bennaars-Eiden, Joe Meyer and Paul N. Holt from 3M Healthcare, St. Paul, MN, US, who provided laboratory and equipment to facilitate this study.

References

1. MDD, E.P.o.t.C., Council Directive 93/42/EEC of 14 June 1993 concerning medical devices. 1993.
2. 556-1:2001, British Standard BS EN 556-1:2001, Sterilization of medical devices. Requirements for medical devices to be designated "STERILE". Requirements for terminally sterilized medical devices, BS EN, London, British Standard Institute.
3. 13060:2014, British Standard BS EN 13060:2014, Small steam sterilizers, BS EN, London, British Standard Institute.
4. 285:2006+A2:2009, British Standard BS EN 285: 2006 + A2:2009, Sterilization – Steam sterilizers – Large sterilizers, BS EN, London, British Standard Institute.
5. 11140-1:2009, British Standard BS EN ISO 11140-1:2009, Sterilization of health care products – Chemical indicators. Part 1: General requirements (ISO 11140-1:2005), BS EN ISO, London, British Standard Institute.
6. 11138-1:2006, British Standard BS EN ISO 11138-1:2006, Sterilization of health care products. Biological indicators. General requirements, BS EN ISO, London, British Standard Institute.
7. 867-4:2001, British Standard BS EN 867-4:2001, Non-biological systems for use in

sterilizers. Specification for indicators as an alternative to the Bowie and Dick test for the detection of steam penetration, BS EN, London, British Standard Institute.

8. 867-5:2001, British Standard BS EN 867-5:2001, Non-biological systems for use in sterilizers. Specification for indicator systems and process challenge devices for use in performance testing for small sterilizers Type B and Type S, BS EN, London, British Standard Institute.
9. CDC, T.C.f.D.C.a.P., Guidelines for Infection Control in Dental Health-Care Settings. 2003.
10. BDA, B.D.A., Health Technical Memorandum (HTM) 01-05: Decontamination in primary care dental practices. 2013.
11. 17665-1:2006, British Standard BS EN ISO 17665 - 1: 2006, Sterilization of health care products – Moist heat – Part 1: Requirements for the development, validation and routine control of a sterilization process for medical devices, BS EN ISO, London, British Standards Institute.
12. Halleck, F.E., et al., Criteria for determining steam sterilization cycles for lubricated and nonlubricated mechanical equipment. *Med Instrum*, 1979. 13(3): 168–171.
13. Senhaji, A.F., The protective effect of fat on the heat resistance of bacteria (I). *J. Fd Technol.*, 1977. 12: 203–216.
14. Pharmacopoeia, European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care, C.o. Europe, Editor 2014.
15. MRC, Sterilisation by steam under increased pressure – Medical Research Council by the working party on pressure-steam sterilisers. *The Lancet*, 1959. February.
16. Perkins, J.J., Principles and Methods of Sterilization in Health Science. Vol. Second Edition. 1983: Charles C Thomas Publisher. 560.
17. Rutala, W.A., M.F. Gergen, and D.J. Weber, Impact of an oil-based lubricant on the effectiveness of the sterilization processes. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2008. 29(1): 69–72.
18. Hegna, I.K., K. Kardel, and M. Kardel, Autoclaving of lubricated dental instruments. *Scand J Dent Res*, 1978. 86(2): 130–134.
19. Russell, A.D., The Destruction of Bacterial Spores 1982: Academic Press Inc. Ltd. 333.
20. Edwardsson, S., G. Svensater, and D. Birkhed, Steam sterilization of air turbine dental handpieces. *Acta Odontol Scand*, 1983. 41(6): 321–326.
21. Andersen, H.K., N.E. Fiehn, and T. Larsen, Effect of steam sterilization inside the turbine chambers of dental turbines. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 1999. 87(2): 184–188.