

3 Eigene Untersuchungen

Beschrieben werden Konzeption und Erprobung eines Versuchsaufbaues unter Verwendung von Baumwoll-Tupfern (3.1.), eine Feldstudie zur orientierenden Ermittlung der Gesamtkeimzahl und des Keimspektrums auf den im Zuge der Fleischgewinnung benutzten Handgeräten (3.2.) und ein Hauptversuch (3.3.), in dem Techniken zur Reinigung und Desinfektion von Handgeräten miteinander verglichen werden.

3.1 Material und Methode des Vorversuches

3.1.1 Zielsetzung

Zur Einschätzung der zu prüfenden Reinigungs- und Desinfektionstechniken muss eine reproduzierbare Beprobungstechnik vorliegen. Zu diesem Zweck wurde ein Vorversuch durchgeführt.

Ziel war es, eine möglichst weitgehende Abnahme und Darstellung der Mikroflora auf einer Oberfläche zu erreichen. In jedem Fall musste die letztendlich eingesetzte Entnahme- Technik eingeschätzt werden können.

Die Ergebnisse ermöglichten es, in der nachfolgend durchgeführten Feldstudie die beprobten Messer auf ihren Gesamtkeimgehalt zu untersuchen und im darauf folgenden Hauptversuch die simulierten unterschiedlichen Techniken zur Reinigung und Desinfektion von Handgeräten vergleichen zu können.

3.1.2 Benötigte Materialien und Medien

Der Vorversuch wurde im mikrobiologischen Labor des Institutes für Fleischhygiene und –technologie des Fachbereiches Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin durchgeführt. Eingesetzt wurden:

Kleinmaterial und Teststämme

- Teststämme (siehe **Tab. 8.8** im Anhang)
- Sterile Auslaufmesspipetten des Volumens 1 ml gemäß DIN 12695, Genauigkeit Klasse AS

Eigene Untersuchungen

- Pipettierhilfen der Firma Roth
- Drigalski- Glasspatel
- Reagenzgläser (Füllvolumen 20 ml), gefüllt mit je 9 ml NaCl- Pepton
- Sterile Einwegtupfer aus Baumwolle
- Handelsübliches Spülmittel
- Erlenmeyerkolben mit dem Füllvolumen 100 ml, gefüllt mit 20 ml NaCl- Pepton
- Sterile Keimträger aus poliertem Edelmetall, Größe 2 x 5cm (10 cm²)
- Nährböden (siehe Anhang)

Laborgeräte und Einrichtungen

- Brutschrank (37 °C)
- Kühlschrank (4-5 °C)
- Röhrenchüttelgerät
- Stoppuhr
- Bunsenbrenner

Nährmedien

Zur Bestimmung der Ausgangskeimzahl sowie zur späteren Auswertung der Wiederfindungsrate wurden Standard-I- Nährmedien verwendet. Sie wurden in der institutseigenen Nährbodenküche nach Rezeptur der Fa. Merck (siehe im Anhang) hergestellt.

Zur Erstellung der Verdünnungsreihen wurden mit NaCl- Pepton befüllte Reagenzröhrchen verwendet. Das NaCl- Pepton wurde ebenfalls in der Nährbodenküche angesetzt (siehe Anhang) und mit einem geeichten Abfüllgerät (Dosifit, Integra Biosciences) in die Reagenzröhrchen gefüllt.

3.1.3 Entwicklung der Beprobungstechnik

Unter Wiederfindungsrate ist das Verhältnis von aufgebracht und zurückgewonnener Keimzahl zu verstehen. Sie ist Maßstab für den Erfolg einer angewandten Technik und als optimal anzusehen, wenn das Verhältnis idealerweise gegen 1 tendiert.

In einer Reihe von Modellversuchen wurde ein für den Hauptversuch einsatzfähiger Versuchsaufbau entwickelt. Grundlage hierfür war das DIN-Verfahren 10113-1, Teil 1.

Es wurden unterschiedliche Aspekte berücksichtigt:

- Auswahl der Keime (Keimmischung)
- Belastung einer Oberfläche mit Fett (hydrophob)
- Aufbringen und Fixieren einer definierten Keimmenge
- Zurückgewinnen der Keimmenge (Anzahl der zu verwendenden Tupfer, Anzahl der durchzuführenden Ausschüttelungen, Anzahl der anzusetzenden Verdünnungsstufen)

Auswahl der Keime

Die Entscheidung der zu verwendenden Spezies fiel zugunsten von Staphylokokken, Enterokokken, Enterobacteriaceen und Pseudomonaden. Verwendet wurden im Institut vorhandene DSM und ATCC Stämme von *S. aureus*, *E. coli*, *Ec. faecium* und *Ps. aeruginosa* (siehe **Tab. 8.8** im Anhang). Diese Keime wurden stellvertretend für die Gesamtheit an vorkommenden grampositiven und gramnegativen Keimen gewählt.

Belastung einer Oberfläche mit Fett

Die Belastung der Keimträger erfolgte mit einem sterilen Fettfilm. Die Oberfläche einer Fettschwarte wurde mit dem Bunsenbrenner abgeflammt und dann mit einer sterilen Schere abgetragen. Die sterilen Edelstahlplättchen wurden dann mit der zu beimpfenden Oberfläche nach unten auf die freigelegte Fläche der Schwarte aufgedrückt und kurz verrieben, sodass sie von einer Fettschicht bedeckt waren.

Auf eine Belastung der Keimträger mit Serum (Eiweiß) wurde im Vorversuch verzichtet, da nicht zu erwarten war, dass das hydrophile Serum der Abnahme durch die feuchten und

Eigene Untersuchungen

anschließend trockenen Tupfer entgegensteht. Im Hauptversuch wurde eine Belastung mit Eiweiß jedoch erwogen, da es sich – den Gegebenheiten im Schlachtbetrieb folgend – immer auf den in der Praxis verwendeten Messern finden lässt.

Aufbringen und Fixieren einer definierten Keimmenge

Gesucht war eine geeignete Technik, mit der 10 cm² große Keimträger aus Edelstahl so beimpft werden konnten, dass eine definierte Keimmenge auf ihnen Platz fand.

Die in dieser Arbeit in den Versuchsaufbauten von Vorversuch und Hauptversuch verwendeten Edelstahlplättchen bestanden aus V₂A- Stahl.

Bei einer Belastung der Keimträger mit der Keimmischung ergab sich das Problem der Menge, die aufgetragen werden konnte. Schließlich stellte sich die Menge von 0,01 ml Flüssigkeit als praktikabel dar. Sie fand gut Platz auf den 10 cm² und zog innerhalb einer Wartezeit (Antrocknungszeit) von zwei bis maximal fünf Minuten in die aufgebrauchte Schicht ein.

Herstellung der diversen Keimmischungen

Aus den in **Tabelle 8.8** im Anhang genannten Teststämmen wurden Vorkulturen hergestellt. Von den oben erwähnten Teststämmen wurde je eine Impföse eines Stammes in 10 ml Trypton-Soja- Bouillon überimpft und diese dann 18 bis 24 Std bei 37 °C bebrütet. Durch Mischen im entsprechenden Verhältnis wurden die unterschiedlichen Keimgemische bzw. Reinkulturen erst kurz vor Versuchsbeginn im jeweils gleichen Anteil zusammengemischt.

Die Ermittlung der Ausgangskeimzahl der Keimmischung bzw. Reinkulturen wurde an jedem Versuchstag für jede Keimmischung oder jeden einzeln verwendeten Keim neu durch Erstellung von Verdünnungsreihen im Spatelverfahren auf Standard-I- Nährböden ermittelt.

Zurückgewinnung der aufgebrauchten Keimmenge

a) Anzahl der zu verwendenden Tupfer:

Bei Versuchsansätzen, in denen nur ein trockener Tupfer verwendet wurde, stellte sich keine zufriedenstellende Wiederfindungsrate ein. Auch die Verwendung von mehr als einem nassen und einem trockenen Tupfer brachte keine verbesserte Wiederfindungsrate.

Eigene Untersuchungen

Die Verwendung eines nassen und darauf folgend eines trockenen Tupfers stellte sich als günstig heraus.

b) Anzahl der Ausschüttelungen:

Das Schütteln der Tupferpaare erfolgte in mit sterilem NaCl- Pepton gefülltem Erlenmeyerkolben für 1 min bei 1500 U/min in Anlehnung an das DIN Verfahren 10113-1, Teil 1. Hiernach wurden die Tupfer mindestens 30 sek so geschüttelt, dass die Kolbenwandung bis zu einer Höhe von 2-3 cm unterhalb der Kolbenöffnung benetzt wurde. In der endgültigen Versuchsdurchführung erfolgte das Schütteln des Tupferpaares viermal, damit sichergestellt werden konnte, dass möglichst alle Keime aus der Baumwollmatrix der Tupfer herausgeschüttelt wurden.

c) Anzahl der anzusetzenden Verdünnungsstufen:

Da durchschnittlich 10^6 Keime auf die Keimträger aufgetragen wurden, mussten diejenigen Verdünnungsstufen gewählt werden, die eine auf einem Agar gut auszuwertende Keimmenge enthielten. Es stellte sich heraus, dass die Verdünnungsstufen 10^{-3} und 10^{-4} der ersten zwei Kolben, die Verdünnungen 10^{-2} und 10^{-3} des 3. Kolben und die Verdünnungsstufen 10^{-1} und 10^{-2} des vierten Kolben auswertbare Ergebnisse lieferten.

Der Zusatz von 2 Tropfen handelsüblichen Spülmittels (Pril) zum NaCl- Pepton, welches zur Befeuchtung des nassen Tupfers verwendet wurde, erbrachte durch seine emulgierende Komponente eine weitere Verbesserung der Wiederfindungsrate.

Die zu der Entwicklung der Untersuchungstechnik (Vorversuch) gehörigen Daten finden sich im Anhang (**Tabelle 8.1** im Anhang).

3.1.4 Versuchsdurchführung

Folgende Vorgehensweise wurde gewählt: Zuerst wurden 0,01 ml des erstellten Keimgemisches auf den mit Fettfilm beschichteten Keimträger aus poliertem Edelmetall aufgetragen und ausgespatelt. Die anschließende Einwirkzeit lag bei durchschnittlich 2 min.

In ein mit 9 ml NaCl- Pepton gefülltes Reagenzglas wurden 2 Tropfen handelsübliches Spülmittel gegeben und das Gemisch kurz auf dem Schüttler durchmischt. Ein steriler

Eigene Untersuchungen

Baumwolltupfer wurde in das Gemisch getaucht und dann am Rand des Reagenzglases so ausgedrückt, dass er nicht mehr nass, sondern lediglich feucht war. Mit diesem Tupfer wurde 10 mal unter leichtem Druck über den Keimträger gefahren. Der Tupfer wurde danach über einen mit 20 ml NaCl- Pepton gefüllten Erlenmeyerkolben mit einer sterilen Schere so abgeschnitten, dass lediglich der mit Baumwolle umwickelte Tupferkopf in den Kolben fiel. Anschließend wurde mit einem trockenen sterilen Tupfer abermals 10 mal unter leichtem Druck über den Keimträger gewischt und der trockene Tupfer zum nassen Tupfer in den Erlenmeyerkolben gegeben. Der Erlenmeyerkolben mit den 2 Tupferköpfen wurde dann 1 min bei 1500 U/min geschüttelt. Mit einer sterilen Pipette wurden die beiden eingegebenen Tupfer leicht ausgepresst und dann in einen 2. Erlenmeyerkolben überführt, welcher ebenfalls 1 min bei 1500 U/min geschüttelt wurde. Danach wurden die Tupfer in einen dritten und in einen vierten Kolben überführt, mit denen genauso wie mit Kolben 1 und 2 verfahren wurde.

Aus jedem der so vorbereiteten Kolben wurde 1 ml Flüssigkeit entnommen und daraus je eine dekadische Verdünnungsreihe erstellt, indem immer 1 ml Flüssigkeit von einem mit 9 ml NaCl- Pepton gefüllten Reagenzglas in das nächste überführt wurde.

Aus den Verdünnungsreihen von Kolben 1 und 2 wurden jeweils die Verdünnungen 10^{-3} und 10^{-4} im Doppelansatz auf einen Standard-I- Nähragar ausgespatelt (je 0,1 ml). Vom 3. Kolben wurden die Verdünnungsstufen 10^{-2} und 10^{-3} ausgespatelt und vom 4. Kolben die Verdünnungsstufen 10^{-1} und 10^{-2} .

Die Nährböden wurden sodann 24 Stunden bei 37 °C im Brutschrank bebrütet und anschließend ausgewertet.

Die Bebrütungsdauer von 24 Std wurde unabhängig der verwendeten Keime für alle Keimmischungen korrespondierend zur Bebrütungsdauer der Ausgangsbouillons gleich gewählt. Es galt letztlich nur zu untersuchen, inwieweit sich aufgebrauchte und abgenommene Keimzahl gleichen, daher wurde auf die normalerweise angebrachte Bebrütung von 48 Std verzichtet.

3.1.5 Vorkultur

Die notwendigen Vorkulturen wurden jeweils aus den in **Tabelle 8.8** im Anhang genannten Teststämmen hergestellt. Die verwendeten Teststämme sind ATCC- bzw. DSM- Stämme.

Von den genannten Teststämmen wurde je eine Impföse eines Stammes in 10 ml Trypton-Soja- Bouillon überimpft und diese dann 18 bis 24 Std bei 37 °C bebrütet. Die gewünschten

Keimgemische wurden erst kurz vor Versuchsbeginn durch Mischen im entsprechenden Verhältnis hergestellt.

Die Ausgangskeimzahl wurde durch Erstellung von Verdünnungsreihen im Spatelverfahren auf Standard-I- Nährböden ermittelt. Dies erfolgte an jedem Versuchstag für jede Keimmischung oder jeden einzeln verwendeten Keim neu.

3.1.6 Keimträger

Die 5 x 2 cm großen Edelstahlplättchen wurden mit Wasser und Seife gereinigt und in einem Becherglas im Autoklaven 15 min bei 121 °C sterilisiert.

3.1.7 Präparieren der Keimträger

Eine im Handel besorgte Speckschwarte wurde auf eine sterile (abgeflamnte) Unterlage verbracht. Ihre in physiologischer Lage der Innenseite des Körpers zugewandte Oberfläche wurde erst abgeflammt und später mit einer sterilen Schere und einer sterilen Pipette abgetragen.

Zwei sterile Keimträger aus poliertem Edelmetall wurden nacheinander auf die so präparierte fettige Oberfläche der Speckschwarte gelegt und leicht angedrückt, um so einen Fettfilm auf der Keimträgeroberfläche zu erzeugen.

Anschließend wurde mit einer Eppendorfpipette 0,01 ml des hergestellten Keimgemisches auf die so präparierte Oberfläche aufgebracht und mit einem Drigalski- Spatel verrieben. Nach einer Einwirkzeit von maximal 2 Minuten wurde der Keimträger in den Versuchsablauf einbezogen.

Um sicherzugehen, dass von der Speckschwarte keine Verunreinigung ausgeht, wurde ein Keimträger auf eine abgeflamnte Speckschwarte aufgedrückt und direkt danach auf einen Standard-I- Nährboden gedrückt. Nach einer Bebrütungszeit von 24 Stunden bei 37 °C ließ sich kein Keimwachstum feststellen.

3.1.8 Auswertung der Laborversuche

Nach einer Bebrütungszeit von 24 Stunden im Brutschrank bei 37 °C wurden die auf den Nährböden gewachsenen KbE ausgezählt. Die Wiederfindungsrate wurde berechnet nach der Formel:

$$C = \frac{\text{Summe } c}{n_1 \times 1 + n_2 \times 0,1} \times d$$

Dabei ist:

- C der gewichtete Mittelwert der Koloniezahlen
- Summe c die Summe der Kolonien aller Sektoren, Petrischalen bzw. Verdünnungen, die zur Berechnung herangezogen werden
- n1 die Anzahl der Sektoren, Petrischalen bzw. Verdünnungen der niedrigsten ausgewerteten Verdünnungsstufe
- n2 die Anzahl der Sektoren, Petrischalen bzw. Verdünnungen der nächst höheren Verdünnungsstufe
- d der Faktor der niedrigsten ausgewerteten Verdünnungsstufe

Die Berechnung erfolgte für die Platten eines jeden der 4 Erlenmeyerkolben einzeln. Die 4 separaten Einzelwerte wurden dann zu einem Endergebnis addiert, das seinerseits als Einzelwert in die weitere Berechnung einging.

3.2 Feldversuch zur Bestimmung der auf Messern in der Praxis auftretenden Mikroflora

In der nachfolgenden Feldstudie wurde abgeleitet, welcher Keimbelastung - qualitativ und quantitativ - Messer an unterschiedlichen Stufen der Fleischgewinnung und -zerlegung ausgesetzt sind.

3.2.1 Probennahme

Die Beprobungen fanden je einmal an vier verschiedenen Schlachtbetrieben während der Schlachtung von Schweinen statt. Alle angefahrenen Schlachtbetriebe hatten eine EU-Zulassung. Pro Probennahmetag wurden in 3 Betrieben 16 und in einem Betrieb 8 Proben (insgesamt 56) genommen (**Tab. 8.2**).

Probennahme

Zur Probenentnahme wurden 10 x 10 cm große 8-lagige Baumwollkompressen vorbereitet. Die Hälfte der Kompressen wurde in einem Becherglas (NaCl- Pepton und wenige Tropfen handelsübliches Spülmittel) getränkt, ausgewrungen, auf Alufolie gelegt und eingepackt. Eine entsprechende Anzahl an Kompressen wurde trocken auf dieselbe Art eingepackt. Während die feuchten Kompressen 15 min bei 121 °C autoklaviert wurden, wurden die trockenen Kompressen 4 Stunden bei 180 °C sterilisiert.

An den 4 Stationen

- Eröffnen des Tierkörpers
- Untersuchung des Herzens
- Anschneiden der Lymphknoten
- Nachtrimmen

wurden die während der Arbeit verwendeten Messer beprobt. Es wurde darauf geachtet, an jeder Station diejenigen Messer zu erhalten, welche gerade benutzt worden waren und die sogleich in das Sterilisationsbecken gestellt werden würden. Für die zweite Beprobung wurden Messer verwendet, die gerade aus dem Sterilisationsbecken genommen wurden.

In 3 der Schlachtbetriebe wurden an jeder der 4 Stationen je 2 Messer vor Benutzung des Sterilisationsbeckens und je 2 Messer nach Benutzung des Sterilisationsbeckens beprobt. Im vierten Schlachtbetrieb wurde aufgrund seiner geringen Größe und der daher niedrigeren Bandgeschwindigkeit und des geringeren Personalaufkommens nur je 1 Messer pro Station vor und nach der Benutzung des Sterilisationsbeckens beprobt.

Jedes Messer wurde an 2 Baumwolltupfern, der erste feucht, der zweite trocken, je 10 mal unter leichtem Druck abgestrichen.

3.2.2 Laboraufarbeitung

Im Labor wurden die 2 Tupfer pro Messer (feucht + trocken) zusammen in einen mit NaCl-Pepton (50 ml, steril) gefüllten Erlenmeyerkolben überführt. Dieser wurde 1 min bei 1500 U/min geschüttelt. Gemäß dem entwickelten Vorversuch erfolgte dieses Procedere viermal, wobei das Tupferpaar jeweils in einen neuen Erlenmeyerkolben überführt wurde. Aus den vier Erlenmeyerkolben einer Reihe wurde je 1 ml entnommen und über eine dekadische Verdünnungsreihe die Gesamtkeimzahl jedes Einzelkolbens ermittelt. Die Einzelergebnisse der 4 Kolben wurden zu einem Gesamtergebnis addiert. Im Unterschied zum Vorversuch wurden jeweils die Verdünnungsstufen 10^0 , 10^{-1} und 10^{-2} ausgespatelt und die verwendeten Standard-I- Platten wurden nicht 24 Std bei 37 °C, sondern 48 Std bei 30 °C bebrütet. Diese Abwandlung war notwendig, da sichergestellt werden sollte, dass alle koloniebildenden Einheiten erfasst werden.

Zusätzlich wurde eine qualitative Keimbestimmung durchgeführt. Da nur ein genereller Überblick über die Keimsituation der einzelnen Stationen gewünscht war, wurden zu diesem Zwecke die 2 Proben pro Station (1.= „Vor Benutzung des Sterilisationsbeckens“ und 2.= „Nach Benutzung des Sterilisationsbeckens“) gepoolt, indem die schon für die Gesamtkeimzahl verwendeten Ausgangsverdünnungsflüssigkeiten (Reihe von 4 Kolben) zusammengeschüttet wurden. Von jedem der 4 gemeinsamen Kolben wurden 0,1 ml auf einem Blutmedium (Standard-I- Agar der Fa. Merck mit 5 % defibriniertem Schafblut der Fa. elocin- lab) im Doppelansatz ausgestrichen und 48 Std bei 30 °C bebrütet.

Von den verschiedenen gewachsenen Kolonien wurden Einzelkolonien entnommen, auf Standard-I- Platten zur Reinkultivierung überimpft und 48 Std bei 30 °C bebrütet. Das Gramfärbeverhalten jeder Reinkultur wurde mittels der Gramfärbung und dem KOH- Test festgestellt. Anschließend wurde nach laborgebräuchlichen Fließschemata für gramnegative bzw. für grampositive Bakterien (FRIES 1999) bis auf Genusebene differenziert.

3.2.3 Temperaturen in den Sterilisationsbecken

Bei den vier angefahrenen Schlachtbetrieben wurde zusätzlich jeweils an den Stationen, an welchen die Messer beprobt wurden, die Wassertemperatur der dort vorhandenen Sterilisationsbecken erfasst.

3.3 Material und Methode des Hauptversuches

Mit dem Vorversuch war an einer allgemein auftretenden Mikroflora eine Beprobungstechnik erarbeitet worden, die es erlaubt, den Keimgehalt einer kontaminierten Fläche quantitativ (und qualitativ) reproduzierbar zu bestimmen. Der Feldversuch gab einen Einblick, welche Keimbelastung auf den im Schlachthof verwandten Messern an unterschiedlichen Stellen zu erwarten ist und wie die gefundenen Keime taxonomisch einzuordnen sind. Der hier beschriebene Hauptversuch basiert auf dem Ergebnis beider Voruntersuchungen.

Ausgehend von einer durchschnittlichen Grundfläche von 54 cm² pro durchschnittlichem Messer (DÜNNEBIER et al. 2001) konnte für Messer, die vor dem Sterilisationsbecken beprobt wurden, eine mittlere Belastung von 4,93 lg KbE pro durchschnittlicher Messerfläche ermittelt werden.

Die taxonomische Differenzierung im Feldversuch ergab, dass auf den Messern zu 60 Prozent Vertreter der Micrococcaceae und zu weiteren je 20 Prozent grampositive bzw. gramnegative Stäbchen vorhanden waren (Tab. 4.3 Kapitel 4).

Um eine realistische Keimbelastung der im Hauptversuch zu verwendenden Keimträger zu erreichen, wurde jeweils ein Vertreter aller drei Gruppen ausgewählt. Für die Gruppe der Micrococcaceae wurde *Staphylococcus aureus* (DSM 6538), für die gramnegativen Stäbchen *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13046) und für die grampositiven Stäbchen *Listeria monocytogenes* (DSM 20600) ausgewählt.

Von jedem der 3 Testkeime wurde das Wachstumsverhalten über 18 Std bei 30 °C festgestellt (Tab. 8.9 im Anhang). Es ergab sich, dass in einer 18 Std Kultur 10⁹ Keime/ml von *Staphylococcus aureus* und *Enterobacter aerogenes* und 10⁸ Keime/ml von *Listeria monocytogenes* zu erwarten waren.

Für die Durchführung des Hauptversuches wurden somit folgende Parameter und Untersuchungsergebnisse als Grundlagen festgelegt:

- Die durchschnittliche Fläche eines Messers wurde mit 54 cm² (beide Seiten) angesetzt
- Ergebnisse der Feldstudie: auf den Messern befanden sich durchschnittlich ca. 5 lg/KbE (ermittelt als Median 4,84 lg/KbE; geometrisches Mittel 4,93 lg/KbE) pro Messerfläche (beide Seiten)

Eigene Untersuchungen

- In einer 18 Std Bouillon mit Staphylococcus aureus befinden sich durchschnittlich 10^9 Keime/ml
- In einer 18 Std Bouillon mit Listeria monocytogenes befinden sich durchschnittlich 10^8 Keime/ml
- In einer 18 Std Bouillon mit Enterobacter aerogenes befinden sich durchschnittlich 10^9 Keime/ml
- Die Edelstahlplättchen haben eine Grundfläche von 10 cm^2

Daraus ergab sich:

- Die aerobe Gesamtkeimzahl vor Benutzung des Sterilisationsbeckens lag bei ca. 100.000 Keimen/Messer
- Ausgehend von einer durchschnittlichen Messerfläche von 54 cm^2 , befinden sich auf 1 cm^2 dann 1851,85 Keime und auf 10 cm^2 (Gesamtfläche Keimträger) befinden sich $1851,85 \times 10 = 18518,5 \text{ Keime} = 1,9 \times 10^4$
- Bezogen auf die Edelstahlplättchen, müssen sich somit in Wiedergabe realistischer Bedingungen ca. $1,9 \times 10^4$ Keime auf 10 cm^2 befinden. Es wurde eine durchschnittliche Belastung von 10^4 Keimen für die gesamte Fläche der Edelstahlplättchen festgelegt.

3.3.1 Verwendete Geräte

Als Wasserbad wurde ein Gerät W 12 der Firma Prüfgerätewerk Medingen eingesetzt. Es musste mit Aqua dest. betrieben werden.

Für die Ultraschallbehandlung stand das Gerät „Sonex Digital 10 P“ der Firma Bandelin (Berlin) zur Verfügung. Hier ließen sich außer der Temperatur und der Beschallungsdauer auch die Beschallungsintensität (von 10 bis 100 %) einstellen. Die Beschallungsintensität (Schallstärke) ist ein Maß für den Energiefluss, d.h. die je Zeiteinheit durch eine Fläche eingestrahlte Energie. Sie wird in Watt pro m^2 ausgedrückt (WIESNER 1999; siehe Kap. 2.4.) Nach Rücksprache mit der Herstellerfirma wurde die Intensität der Ultraschallwellen auf 100 % eingestellt, da diese Intensität zur Reinigung von beispielsweise Operationsbesteck und damit metallenen Gegenständen vorgesehen ist. Die Befüllung des Beckens erfolgte, wie in der Bedienungsanleitung zugelassen, mit Leitungswasser.

3.3.2 Die Milchsäure

Bei der eingesetzten Milchsäure handelt es sich um eine 90 %ige DL- Milchsäure (Angabe erfolgte in Gewichtsprozent pro Volumen: m/v) der Firma Roth, Karlsruhe. Sie lag in flüssiger Form vor. Das letztliche Mengenverhältnis im Wasserbad bzw. Wasserbad mit Ultraschall wurde unter Berücksichtigung ihres spezifischen Gewichtes bzw. Dichte (1,21) errechnet. Zur Herstellung von 10 l einer 2 %igen Milchsäurelösung wurden 184 ml der 90 % Milchsäure auf 9800 ml Wasser gegeben.

Herleitung des Mischverhältnisses:

Herzustellen sind 10 l einer Milchsäurelösung mit einer Endkonzentration von 2 %,

- d.h. 200 ml einer 100 %igen Milchsäure auf 9800 ml Wasser.
- Es liegt eine 90 %ige DL- Milchsäure vor.
- Daher sind 222 ml zuzugeben: $(200 \text{ ml} : 90 \%) \times 100 \%$
- Da die Prozentangabe der 90 %igen Milchsäure in Gewichtsprozenten und nicht in Volumenprozenten angegeben ist, muss die spezifische Dichte der Milchsäure berücksichtigt werden.
- Diese liegt bei 1,21 (d.h. $222 \text{ ml} : 1,21 = 184 \text{ ml}$)
- es folgt: 184 ml der 90 %igen Milchsäure müssen auf 9800 ml Wasser gegeben werden, um eine Lösung mit der Milchsäure- Endkonzentration 2 % zu erhalten.

3.3.3 Herstellung der Keimmischung

Vor jedem neuen Versuchsansatz wurde die Keimmischung frisch aus einer 18 Std- Bouillon der 3 gewählten Keime hergestellt.

Gemäß der im Feldversuch gefundenen Keimzusammensetzung ergab sich:

Die Mikroflora der im Feldversuch beprobten Messer bestand zu 60 % aus grampositiven Kokken, zu 20 % aus grampositiven Stäbchen und zu weiteren 20 % aus gramnegativen Stäbchen.

Eigene Untersuchungen

Aufgebracht werden sollte eine gewünschte mittlere Belastung von 10^4 Keimen/ml auf den 10 cm^2 großen Plättchen. Da nur $0,01\text{ ml}$ auf diese Fläche aufgetragen werden konnten, waren die Ausgangslösungen bis auf 10^6 Keime/ml zu verdünnen.

Es wurde wie folgt gemischt:

- 3 ml (60 %) der 3. Verdünnungsstufe der Bouillon von *Staphylococcus aureus* (entsprechen ca. 3×10^6 Keimen)
- 1 ml (20 %) der 3. Verdünnungsstufe der Bouillon von *Enterobacter aerogenes* (entsprechen ca. 1×10^6 Keimen)
- 1 ml (20 %) der 2. Verdünnungsstufe der Bouillon von *Listeria monocytogenes* (entsprechen ca. 1×10^6 Keimen)

Die Keimmischung hatte somit einen Keimgehalt von 5×10^6 Keime in 5 ml bzw. 10^6 Keimen/ml.

Die durchschnittliche Antrocknungszeit lag bei ca. 20 min . Anschließend durchliefen je 10 Keimträger eine Versuchsvariante.

3.3.4 Belastung der Keimträger mit Fett, Eiweiß und der Keimmischung

Eine Speckschwarte wurde über der Bunsenbrennerflamme abgeflammt und die abgeflamnte Oberfläche mit einer sterilen Schere und einer sterilen Pinzette abgetragen. Die Keimträger wurden mit leichtem Druck auf der frisch freigelegten fettigen Oberfläche kurz verrieben, bis ein optisch deutlich wahrnehmbarer Film auf der Fläche vorhanden war.

Danach wurden die Keimträger auf ein steriles Tablett gelegt. Mit einer Eppendorfpipette wurde $0,01\text{ ml}$ steriles Pferde- oder Kälberplasma auf jeden Keimträger aufgebracht und sodann mit einem Spatel über dessen Oberfläche verteilt.

Das Tablett mit den Keimträgern wurde dann kurz über eine Bunsenbrennerflamme gehalten, um ein Zusammenfließen und Koagulieren von Fett und Eiweiß zu erreichen.

Nach Abkühlung der Keimträger wurde die Keimmischung aufgetragen. Mit einer Eppendorfpipette wurden $0,01\text{ ml}$ der Keimmischung auf jeden Keimträger aufgebracht und mit der sterilen Pipettenspitze in den Fett-Eiweiß- Film gemischt und somit über den ganzen Keimträger verteilt.

Nach Trocknung der so belasteten Keimträger nach ca. 20 min, wurde der jeweils geplante Versuchsansatz durchgeführt.

3.3.5 Prüfung der eingesetzten Substanzen auf Hemmstoffe

Die Keimfreiheit der eingesetzten Speckschwarten wurde, wie bereits im Kap. 3.1.3. des Vorversuches erwähnt, bei jeder Untersuchung erneut sichergestellt.

Um sicherzustellen, dass das eingesetzte Serum frei von Hemmstoffen ist, wurden einmalig 3 verschiedene Untersuchungen auf Hemmstoffe durchgeführt.

Variante 1: 100 µl des Serums wurden auf 3 Standard-I- Agarplatten ausgespatelt. Diese wurden dann jeweils mit einem 3 Ösenausstrich der Keimmischung beimpft.

Variante 2: Auf einer Standard-I- Agarplatte wurde mittig ein Impfstrich des Serums aufgetragen. An beide Seiten wurde ein Impfstrich der 3 Keime im 90° Winkel aufgetragen.

Variante 3: Auf 3 Standard-I- Agarplatten wurden jeweils 100 µl der Bouillon jedes Keimes aufgetragen. Auf jede Platte wurden 3 Tropfen des Serums getropft.

Alle Platten wurden 12 Std bei 37 °C bebrütet.

Eine Hemmwirkung des Serums konnte in keinem Fall festgestellt werden.

3.3.6 Das Kontrollplättchen

Zusammen mit den jeweils im Versuch stehenden 10 Keimträgern wurde ein Kontrollplättchen mit der gewünschten Keimmischung, Fett und Eiweiß belastet. Nach Antrocknen der Oberflächenbelastung wurde in diesem Fall die Oberfläche mit der entwickelten Nass/Trocken- Tupfertechnik beprobt, ohne dass dieses Plättchen eine Versuchsvariante durchlief.

Dies erfolgte jeweils zu Beginn einer neuen Versuchsvariante und erlaubte so einerseits eine genaue Einschätzung der momentanen Belastung auch der anderen 10 Plättchen, da hier gleiche Bedingungen vorherrschten. Andererseits konnte die Effektivität der verwandten Tupfertechnik sichergestellt werden, da die Gesamtkeimzahl der aufgetragenen Keimmischung bekannt war und so Rückschlüsse auf die Wiederfindungsrate gezogen werden konnten.

3.3.7 Versuchsvarianten (des Hauptversuches)

Folgende Verfahren wurden in unterschiedlichen Varianten geprüft:

- Wasserbad
- Ultraschall im Wasserbad
- Wasserbad unter Zusatz von Milchsäure (End- Konzentration 2 %)
- Ultraschall im Wasserbad unter Zusatz von Milchsäure (End- Konzentration 2 %)

Pro geprüfter Variante durchliefen 10 Keimträger und ein Kontrollplättchen alle Versuchsanordnungen bei unterschiedlichen Temperaturen und unterschiedlichen Zeiten. Der Versuchsansatz sah vor, alle Versuchsvarianten in den Kombinationen mit den Temperaturen 40, 50, 60, 70 und 80 °C und in den Zeitintervallen 10, 30 und 60 Sekunden zu prüfen.

Zunächst wurden die Eckdaten einer jeden Hauptvariante als Versuchsansätze durchgeführt. Hieraus ergaben sich unterschiedliche Möglichkeiten im weiteren Vorgehen:

Wenn bereits bei bestimmten Kombinationen kein Wachstum mehr erkennbar war, wurde auf die Erprobung dieser Variante mit höheren Temperaturen verzichtet.

Ergab sich, dass bei den vorgesehenen Kombinationen bereits beim niedrigsten Zeitintervall eine Abtötung aller Keime zu verbuchen war, so wurde das Zeitintervall auf 5 bzw. 1 Sekunde verkürzt, um somit die Aussage dieser Kombination zu präzisieren und die Zeit-Abtötungsrelation genauer festhalten zu können.

Die im Hauptversuch letztlich durchgeführten Varianten sind der **Tabelle 8.3** des Anhanges zu entnehmen.

3.4 Interne Qualitätssicherung

3.4.1 Bestimmung der Zuverlässigkeit der Ergebnisse der Doppelansätze in den drei Versuchsteilen

Es galt die Exaktheit der hier verwendeten 10er Verdünnungsstufen zu überprüfen, um so mit Sicherheit sagen zu können, ob die Art und Weise der Aufarbeitung der Proben einheitlich ist.

Die ISO/DIS 14461-2 beschreibt eine Routineüberprüfung der Ergebnisse von Parallelplatten, die aus einer 10er Verdünnungsreihe hergestellt wurden.

Die Überprüfung von Parallelplatten nach diesem Prinzip sollte regelmäßig im Labor zur Überprüfung der Arbeitstechnik durchgeführt werden.

Die Überprüfung erfolgte nach folgendem Prinzip:

Die Ergebnisse, sprich die Koloniezahlen (KbE) zweier paralleler Platten (Doppelansatz) werden mit Tabellen dieser ISO/DIS 14461-2 verglichen, in denen bestehende Zahlen für Parallelplatten zu finden sind. Lassen sich die überprüften Koloniezahlen der zwei Platten nicht innerhalb der in der Tabelle genannten Zahlen finden, so kann dies auf ein technisches Problem bzw. unexakte Arbeitsweise im Labor hinweisen.

Genauer: Das höhere und das tiefere Ergebnis zweier korrespondierender Agarplatten (gleiche Verdünnungsstufe!) wird mit den Zahlen der in der oben genannten Vorschrift befindlichen Tabellen verglichen.

Dazu wird das höhere Ergebnis der zwei Platten herangezogen und in der Tabelle gesucht. Die dieser Zahl in der Tabelle gegenüberstehende Zahl gibt an, wie niedrig das Ergebnis der Parallelplatte maximal liegen darf, um in einem akzeptablen Bereich zu sein.

Beispiel:

Wenn die gezählten Koloniezahlen zweier Parallelplatten bei 13 und 11 liegen, so bildet 13 das höhere Ergebnis beider Platten. Der Zahl 13 steht in der Tabelle der ISO/DIS 14461-2 die Zahl 4 gegenüber. Entsprechend der Tabelle darf also das Ergebnis der Parallelplatte mit dem niedrigeren Ergebnis nicht unter 4 liegen. D.h. die Zahl 13 bildet den oberen Rahmen und 4 den unteren. Da das Ergebnis der Parallelplatte mit dem niedrigeren Ergebnis 11 ist, ist das Verhältnis der 2 Platten zueinander in einem akzeptablen Rahmen.

Eigene Untersuchungen

In allen drei Versuchsteilen wurden die Verdünnungsreihen im Doppelansatz ausgespatelt, bebrütet und ausgewertet. Die erhaltenen Koloniezahlen wurden nach der ISO/DIS 14461-2 auf Korrespondenz überprüft.

Die in den Versuchsreihen erhaltenen Koloniezahlen auf den im Doppelansatz hergestellten Parallelplatten bewegten sich in jedem Fall im zulässigen Rahmen.