

***Aus dem Institut für Technische Hygiene***

der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

## **DISSERTATION**

Untersuchungen zur Standardisierung von Prüfmethode(n) für Reinigungs-  
und Desinfektionsgeräte zur Aufbereitung flexibler Endoskope mit dem  
Prüforganismus *Enterococcus faecium*

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

**Franziska Schäfer**

aus Gera

Datum der Promotion:

13.12.2019

# I. INHALTSVERZEICHNIS

I.	INHALTSVERZEICHNIS .....	2
II.	TABELLENVERZEICHNIS .....	4
III.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	5
1.	ABSTRAKT .....	6
2.	EINLEITUNG .....	10
	2.1 Bioburden flexibler Endoskope.....	11
	2.2 Erregerspektrum von Infektionen und Transmissionen assoziiert mit endoskopischen Prozeduren .....	12
	2.2.1 Pseudomonas aeruginosa.....	14
	2.2.2 Salmonella spezies .....	15
	2.2.3 Helicobacter pylori.....	15
	2.2.4 Clostridium difficile .....	15
	2.2.5 Klebsiella pneumoniae .....	16
	2.3 Endoskop-Familien und die Aufbereitung von flexiblen Endoskopen.....	18
	2.3.1 Endoskop-Familien.....	18
	2.3.2 Aufbereitung von flexiblen Endoskopen.....	19
	2.4 Gesetzliche Rahmenbedingungen, Normen, Leitlinien und Empfehlungen beim Einsatz von flexiblen Endoskopen und endoskopischem Zusatzinstrumentarium .....	20
	2.4.1 Gesetzliche und normative Grundlagen.....	20
	2.4.2 Leitlinien und Empfehlungen .....	22
	2.5 Validierung des Schlauchprüfmodells für RDG-E und Validierung im Reinigungs- und im Gesamtprozess bei der Aufbereitung von flexiblen Endoskopen.....	23
	2.5.1 Validierte Prüfungen und Qualifikationen eines RDG-E .....	23
	2.5.2 Validierung im Reinigungs- und im Gesamtprozess bei der Aufbereitung von flexiblen Endoskopen .....	24
	2.5.3 Validierung des Schlauchprüfmodells für RDG-E .....	26
	2.6 Zielstellung der Arbeit.....	27
3.	MATERIAL UND METHODEN .....	28
	3.1 Material .....	28
	3.1.1 Prüforganismus .....	28
	3.1.2 Schlauchprüfkörper .....	29
	3.1.3 Prüfanschmutzung .....	29
	3.1.4 Spüllösungen .....	30
	3.1.5 Labormaterialien und Ultraschallgerät .....	31
	3.2 Methoden .....	33

3.2.1	Herstellen der Bakteriensuspension .....	34
3.2.2	Kontamination der Prüfkörper .....	35
3.2.3	Versuchsreihe „Spüllösungen“ .....	36
3.2.4	Versuchsreihe „Spülmethode“ .....	37
3.2.5	Versuchsreihe „Eindringen von Ultraschall in die Schlauchprüfkörper“ .....	38
3.2.6	Versuchsreihe „Untersuchung des Überlebensverhaltens von <i>Enterococcus faecium</i> bei Ultraschall“ .....	39
3.2.7	Versuchsreihe „Behandlung der Prüfkörper mit Ultraschall“ .....	39
3.3	Materialaufarbeitung und Auswertung .....	40
3.3.1	Bestimmung der Kolonienzahl .....	40
3.3.2	Nachweisgrenze des Verfahrens .....	41
3.3.3	Statistische Auswertung .....	41
4.	ERGEBNISSE .....	42
4.1	Versuchsbegleitende Parameter .....	42
4.1.1	Blutgerinnung .....	42
4.1.2	Konzentration des Prüforganismus in der Prüfanschmutzung .....	42
4.2	Versuchsreihe „Spülmittel“ .....	43
4.3	Versuchsreihe „Spülmethode“ .....	46
4.4	Versuchsreihe „Eindringen von Ultraschall in die Prüfkörper“ .....	49
4.5	Versuchsreihe „Überlebensverhalten von <i>E. faecium</i> bei Ultraschall“ .....	50
4.6	Versuchsreihe „Behandlung der Prüfkörper mit Ultraschall“ .....	51
5.	DISKUSSION .....	53
5.1	Methodenkritik .....	54
5.1.1	Prüfanschmutzung .....	54
5.1.2	PTFE-Schlauchprüfkörper .....	58
5.1.3	Einsatz von Ultraschall .....	60
5.2	Effekte der Parameter „Spülmittel“ und „Spülmethode“ auf die Rückgewinnung ..	62
5.2.1	„Spülmittel“ .....	63
5.2.2	„Spülmethode“ .....	65
6.	LITERATURVERZEICHNIS .....	68
7.	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG .....	75
8.	LEBENS LAUF .....	76
9.	DANKSAGUNG .....	76

## II. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Merkmale und Beispiele der Endoskop-Familien (verändert nach [34]) .....	18
Tabelle 2: Übersicht über die verschiedenen Teilschritte der unterschiedlichen.....	19
Tabelle 3: Leistungsqualifikation: Wirksamkeit der Reinigung [35] .....	25
Tabelle 4: Leistungsqualifikation: Wirksamkeit im Gesamtprozess (Reinigung und Desinfektion) [35] .....	25
Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Blutchargen .....	29
Tabelle 6: Übersicht der Laborgeräte und deren Herstellerfirmen .....	31
Tabelle 7: Übersicht der verwendeten Nährmedien .....	31
Tabelle 8: Übersicht der verwendeten Labormaterialien .....	33
Tabelle 9: Übersicht zur Ultraschallbehandlungszeit der präparierten PTFE-Prüfkörperstücke 2 mm und 4 mm im Durchmesser.....	38
Tabelle 10: Skaleneinteilung zur visuellen Beurteilung des Aluminiumzerfalls in den Prüfkörpern .....	39
Tabelle 11: Verdünnungsstufen der Bakteriensuspensionen, Prüfanschmutzungen und Spüeluäte zur anschließenden Weiterverarbeitung.....	40
Tabelle 12: Mittelwerte, Mediane, der Standardabweichungen (SD), Minima und Maxima der Gerinnungszeit des Schafblutes bei allen verwendeten Prüfanschmutzungen ..	42
Tabelle 13: Konzentrationen der Prüfanschmutzungen in log KBE/ml insgesamt und aufgeteilt in die drei Versuchsreihen „Spülmittel“, „Spülmethode“ und „Behandlung mit Ultraschall“ .....	43
Tabelle 14: Mittelwerte, Standardabweichungen (SD), Mediane, Minima und Maxima der Rückgewinnung in log <sub>10</sub> KBE/ml der fünf verschiedenen Spülmittel .....	44
Tabelle 15: Mittelwerte, Mediane, Standardabweichungen (SD), Minima, Maxima und der Schiefe der logarithmierten absoluten Konzentrationen der Rückgewinnung beim Einsatz verschiedener Spülmethoden .....	46
Tabelle 16: Ausgewählte Signifikanzniveaus (p-Werte) errechnet mit dem Kruskal-Wallis- Test und dem Mann-Whitney-Test für die Spülmethoden I bis V, zeilenweise grau unterlegt sind die Spülmethoden, die statistisch miteinander verglichen wurden .....	47
Tabelle 17: Optischer Zerfallsgrad der Aluminiumfolienstreifen 120 mm x 1,8 mm bzw. 3,8 mm im .....	49
Tabelle 18: Mittelwerte, Mediane, Standardabweichungen (SD), Minima und Maxima der logarithmierten .....	51
Tabelle 19: Prüfanschmutzungen für Endoskope der CEN ISO/TS 15883-5 [47c] .....	55

### III. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Detailaufnahme von fünf mit Prüfanschmutzung kontaminierten Prüfkörpern nach dem Durchdrücken von Raumluft .....	35
Abbildung 2: Fünf mit Prüfanschmutzung kontaminierte Prüfkörper in waagerechter Lagerung zur Inkubation über eine Stunde .....	36
Abbildung 3: Logarithmierte absolute Konzentrationen der Rückgewinnung nach Verwendung der Spülmittel I bis IV (I NaCl 0,9%ig, II NaCl 0,9%ig mit Tween, III TSB und IV TSB mit Enthemmern).....	45
Abbildung 4: Logarithmierte absolute Konzentrationen der Rückgewinnung in KBE/ml der Spüleluate der Spülmethoden I bis V ( I =50 ml , II=20 ml viermal aspiriert, III-1 bis III-5 jeweils 10 ml hintereinander, IV = Infusomat®, V = Sogpumpe) .....	48
Abbildung 5: Logarithmierte absolute Konzentrationen der Rückgewinnung in KBE/ml der..	49
Abbildung 6: Koloniebildene Einheiten von E. faecium pro Agarplatte in Abhängigkeit von der Ultraschalldauer (t = 0 min, 1 min, 2 min, 3 min, 5 min, 10 min, 15 min, 20 min) .....	50
Abbildung 7: Logarithmierte Konzentrationen der Rückgewinnung der Spüleluate mit und ohne Ultraschallbehandlung.....	52

## 1. ABSTRAKT

Die Zahl der endoskopischen Untersuchungen und Interventionen nimmt stetig zu. Damit steigt auch das Risiko für das Auftreten einer Infektion in Assoziation zu einem vorangegangenen endoskopischen Eingriff. Das Risiko einer endogenen Infektion unterliegt der jeweiligen endoskopischen Prozedur und dem individuellen Risiko jedes einzelnen Patienten. Das Risiko einer exogenen Infektion durch ein kontaminiertes, und somit ein zuvor nicht korrekt aufbereitetes Endoskop, ist vor allem in Hinblick auf multiresistente Erreger ein unkalkulierbares Risiko. Dieses lässt sich durch die korrekte Aufbereitung der Endoskope ausschliessen.

Der Gesetzgeber verpflichtet den Gerätebetreiber laut Medizinprodukte-Betreiberverordnung (MPBetreibV) die Reinigung, Desinfektion und Sterilisation von Medizinprodukten unter Berücksichtigung der Angaben des Herstellers mit geeigneten validierten Verfahren durchzuführen.

Durch die vorliegende Arbeit wurde das durch die DIN EN ISO 15883 festgelegte Schlauchprüfmodell für flexible Endoskope überprüft und validiert. Untersucht wurde hierbei der Einfluß von fünf verschiedenen Spülmitteln, fünf verschiedenen Spülmethoden und der Einfluss von Ultraschall auf die Rückgewinnungsraten des Prüforganismus *E. faecium*.

Bei den Versuchen wurde ein 200 cm langer PTFE-Prüfkörper mit der Prüfanschmutzung, bestehend aus Schafblut, Protamin und dem Prüforganismus *E. faecium*, angeschmutzt. Nach der Inkubation erfolgt die Rückgewinnung der Prüfanschmutzung mit verschiedenen Spüllösungen, Spülmethoden sowie mit Ultraschallbehandlung. Die gewonnenen Eluate wurden verdünnt und anschließend mittels eines Oberflächenkulturverfahrens die Konzentrationen bestimmt.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Verwendung von 0,9%iger Natriumchlorid-Lösung als Spüllösung gleichwertig in Bezug auf die Rückgewinnungsraten gegenüber dem Einsatz von Spüllösungen mit zusätzlichen Enthemmern und Detergenzien ist ( $p = 0,811$ ). Das eingesetzte Volumen der Spüllösung ist unerheblich ( $p = 0,066$ ). Es besteht jedoch ein hochsignifikanter Unterschied ( $p < 0,001$ ) bei der Rückgewinnungsrate zwischen den ersten 10ml Spüllösung und den darauffolgenden Spülvolumen. Der Einsatz einer Pumpe zum Spülen verschafft keinen Vorteil im Vergleich zur manuellen Spülung ( $p >$

0,6). Die Verwendung von Ultraschall führt nicht zu einer höheren Rückgewinnungsrate ( $p = 0,452$ ).

Das Prüfmodell zur Gesamtprozessüberprüfung eines RDG-E, bestehend aus Anschmutzen des PTFE-Prüfschlauches mit Schafblut - *E. faecium*-Prüfanschmutzung, anschließender manueller Elution mit 50 ml 0,9%iger Natriumchlorid-Lösung, ist standardisierbar, kostengünstig, effizient, reproduzierbar und leicht erlernbar. Die Rückgewinnungsraten des Prüforganismus im Schlauchprüfmodell konnten durch alternative Methoden nicht signifikant verbessert werden. Weder ein variiertes Spülmittel, noch eine alternative Spülmethode, noch der Ultraschalleinsatz erhöhte die Rückgewinnungsrate.

Damit ist gezeigt, dass das bestehende Schlauchprüfmodell der DIN EN ISO 15883 [47] geeignet ist.

## ABSTRACT

The number of endoscopic interventions is steadily increasing. This increases the risk of endoscopy-associated infections. The risk of endogenous infections is subject to the respective endoscopic procedure and the individual risk of each patient. The risk of an exogenous infection by a contaminated, and thus a previously not correctly reprocessed endoscope, is incalculable, especially with regard to multi-resistant bacteria. This can be minimized by accurate reprocessing the endoscopes.

According to the German „Medizinprodukte-Betreiberverordnung“ the legislature obliges the device operator to observe the cleaning, disinfection and sterilization of medical devices. This includes testing with validated procedures considering the endoscope manufacturer data.

This dissertation verified and validated the test-tube-model for flexible endoscopes specified by DIN EN ISO 15883. The influence of five different rinsing agents, five rinsing methods and using ultrasound according to the recovery rates of *E. faecium* was investigated.

The PTFE test tube (200 cm) was contaminated with the test soiling, consisting of sheep blood, protamine and *E. faecium*. After incubation, the test soil is recovered with various rinsing solutions, rinsing methods and ultrasonic treatment. The obtained eluates were diluted and the concentrations determined utilizing a surface culture method. The results demonstrate that the recovery rate using 0.9% sodium chloride solution as a rinse solution is equivalent to the use of rinse solutions with additional neutralizers and detergents ( $p = 0,811$ ). The volume of rinsing solution is irrelevant ( $p = 0.066$ ). However, there is a highly significant difference ( $p < 0.001$ ) in the recovery rate between the first 10 ml rinse solution and the subsequent rinse volumes. The use of a pump for flushing does not provide an advantage compared to manual flushing ( $p > 0.6$ ). Using ultrasound does not result in a higher recovery rate ( $p = 0.452$ ).

The test tube model for the overall procedure of an RDG-E consisting of contamination the PTFE test tube with sheep blood - *E. faecium* test soil, followed by manual elution with 50 ml 0.9% sodium chloride solution is cost-effective, long-lasting, globally available in identical quality and easy to learn. The recovery rates of the test organism in the test tube model could not be significantly improved by alternative methods.

Neither a varied rinsing agent, nor an alternative rinsing method, nor the use of ultrasound increased the recovery rate.

In summary the existing test tube model of DIN EN ISO 15883 is suitable.

## 2. EINLEITUNG

Endoskopische Untersuchungen und Interventionen sind für die Diagnostik und Therapie verschiedener Erkrankungen mittlerweile unverzichtbar. Dabei kommen flexible Endoskope verschiedenster Bauarten und Größen und unterschiedlichstes Zusatzinstrumentarium zum Einsatz. Die Produktpalette bei den Endoskopen reicht von Bronchoskopen über Gastroskope, Duodenoskope und Cholangioskope bis hin zu Koloskopen. An Zusatzinstrumentarium gibt es eine Vielfalt an Zangen, Schlingen, Nadeln und Nadelmessern für Biopsien, Ektomien und komplexere Interventionen. Die flexiblen Endoskope werden während ihres Einsatzes mit Blut und Sekreten, nicht selten in größeren Mengen, kontaminiert, hinzu kommt eine kaum überschaubare Menge an Mikroorganismen.

Flexible Endoskope sind schwierig zu reinigen und zu desinfizieren, dabei aber gleichsam anfällig für Schäden aufgrund ihrer komplexen Bauweise mit engen und gleichzeitig zahlreichen internen Kanälen. Bezugnehmend auf die internationale Spaulding-Klassifikation [1] gehören Endoskope zu der Gruppe semikritischer Medizinprodukte und bedürfen einer „high-level-disinfection“. In Deutschland definieren die Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) und das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) die flexiblen Endoskope etwas detaillierter als semikritisch B [2]. Diese bedürfen somit einer erhöhten Anforderung an die Aufbereitung. Das eingesetzte Zusatzinstrumentarium wiederum ist laut der Spaulding-Klassifikation [1] als kritisch zu bewerten und benötigt eine Sterilisation, falls es sich nicht um Einmalinstrumente handelt. Besonders komplexes Zusatzinstrumentarium kommt bei der endoskopisch retrograden Cholangio-pankreatikographie (ERCP) zum Einsatz. Nach den KRINKO-/BfArM-Empfehlungen aus dem Jahr 2012 gelten z.B. thermolabile ERCP-Katheter als kritisch C mit besonders hohen Anforderungen an die Aufbereitung [2].

Aufgrund der Vielzahl an nachweislichen Infektionen nach endoskopischen Eingriffen und aufgrund der Zuordnung der Endoskope zu den semikritischen Instrumenten ist eine standardisierte Überprüfung der gesamten Aufbereitung von flexiblen Endoskopen unentbehrlich. Hierzu notwendig ist eine validierte Methode, die im Idealfall praktikabel und kosteneffizient zu gleich ist.

Im Vorfeld ist es wichtig, die gesetzlichen und normativen Grundlagen, das Spektrum der Endoskopie-assoziierten Infektionen und den Aufbereitungsprozess der flexiblen Endoskope sowie die verwendeten Prüfanschmutzungen zu kennen.

## **2.1 Bioburden flexibler Endoskope**

Flexible Endoskope, insbesondere die Koloskope, kommen während ihres Untersuchungseinsatzes mit einer Vielzahl von Mikroorganismen in Kontakt. Untersuchungen haben gezeigt, dass 55% des Stuhlgewichtes von Bakterien stammen. Menschliche Faeces enthalten  $10^{11}$  bis  $10^{12}$  kolonienbildende Einheiten (KBE) an Mikroorganismen pro Gramm Faeces.

Die Gesamtkoloniezahl von Koloskopen, der Bioburden, direkt nach dem Gebrauch liegt zwischen  $10^5$  bis  $10^{10}$  KBE/Gerät in den Arbeitskanälen und zwischen  $10^4$ - $10^6$  KBE pro Gerät an der Geräteoberfläche vor der Reinigung. Eine sachgemäße Reinigung reduziert die Konzentration der Mikroorganismen in den Arbeitskanälen um 3-5  $\log_{10}$ -Stufen und an der Oberfläche um 2-4  $\log_{10}$ -Stufen [3]. Auch Vesley et al. [4] untersuchten u.a. fünf Koloskope und fünf Gastroskope unmittelbar nach einer endoskopischen Prozedur und anschließend nach der manuellen Reinigung. Der Bioburden der Gastroskope lag hier im Mittel bei 6,7  $\log_{10}$  KBE pro Gerät und bei den Koloskopen bei 8,5  $\log_{10}$  KBE pro Gerät. Nach der sich anschließenden Reinigung lag der mittlere Bioburden bei den Gastroskopen bei 2  $\log_{10}$  KBE pro Gerät und bei den Koloskopen bei 2,3  $\log_{10}$  KBE pro Gerät. Die höchste Konzentration wurde auch hier in den Arbeitskanälen gemessen [4].

Alfa et al. [5] beschreiben eine „worst-case-Kontamination“ von tatsächlich für Untersuchungen eingesetzten Endoskopen mit einer mikrobiologischen Kontamination von  $10^9$  KBE/Gerät bei Koloskopen. Dabei lag die bakterielle Kontamination von Koloskopen 4-5mal höher als bei den untersuchten Gastroskopen und Bronchoskopen. Neben der mikrobiellen Belastung ist auch eine gleichzeitige Kontamination mit Blut und Sekreten zu berücksichtigen. Alfa et al. [5] detektierten jedoch nicht in allen untersuchten Geräten Hämoglobin, wobei kritisch anzumerken ist, dass keines der untersuchten Geräte bei einer gastrointestinalen Blutung zum Einsatz kam [5].

## 2.2 Erregerspektrum von Infektionen und Transmissionen assoziiert mit endoskopischen Prozeduren

Verschiedene Veröffentlichungen und Fallstudien (nachfolgend detailliert beschrieben) berichteten in den letzten Jahren über die Transmission von Mikroorganismen während endoskopischer Untersuchungen, insbesondere bei der Bronchoskopie und der ERCP. Zu unterscheiden ist dabei die exogene von der endogenen Infektion.

Endogene Infektionen sind assoziiert mit einer endoskopischen Untersuchung im Sinne einer Bakteriämie durch die Untersuchung an sich. Meist handelt es sich dabei um Infektionen durch *Escherichia coli* (*E. coli*), *Klebsiella* spp, *Enterobacter* spp und *Enterococcus* spp. Diese endogenen Infektionen können durch eine gute und kontrollierte Aufbereitung nicht verhindert werden, da die verwendeten Geräte vor dem Einsatz nicht kontaminiert waren. Vielmehr kommt es durch eine prozedurbedingte Schädigung der Schleimhaut, z.B. bei einer Polypektomie oder Papillotomie, zu einem Barriereleck mit resultierender Bakteriämie und folgender Infektion. Ein Beispiel ist ein Fallbericht aus dem Jahr 2004 [6]. Dieser berichtet über einen Patienten, der nach einer Koloskopie an einer infektiösen Endokarditis mit dem Nachweis von *Enterococcus faecalis* erkrankte. Der Patient litt an einer höhergradigen Aortenstenose mit rezidivierend blutenden intestinalen Angiodysplasien im Sinne eines Heyde-Syndrom, die Koloskopie erfolgte indikationsgerecht aufgrund einer progredienten Eisenmangelanämie zur Blutungsstillung. Die Risikominimierung einer solchen endogenen Infektion obliegt der Prozedur an sich und sollte an andere Stelle Beachtung finden.

Exogene Infektionen hingegen entstehen bei der Übertragung von Mikroorganismen von vorangegangenen Untersuchungen mit zwischenzeitlicher ungenügender Aufbereitung der Endoskope oder des Zusatzinstrumentariums. Eine weitere Ursache ist die Kontamination eines Endoskopes während der Aufbereitung in einem kontaminierten Reinigungs- und Desinfektionsgerät für Endoskope (RDG-E). Dabei handelt es sich meist um *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*). Mykobakterien, Vertreter der *Salmonella* spp und *Serratia* spp sind die häufigsten Bakterien bei einer Kreuzinfektion und Kreuzkontamination zwischen zwei oder mehreren Patienten. Auf einzelne Fallserien wird im Folgenden noch näher eingegangen.

Das Risiko einer Transmission oder Infektion nach endoskopischen Eingriffen wird auf einen Fall pro 1,8 Millionen Prozeduren geschätzt [7, 8]. Diese Zahl mag das wahre Ausmaß unterrepräsentieren, Gorse und Messner berichteten über einen Anteil von 6%

iatrogener Infektionen nach endoskopischen Prozeduren in 116 Krankenhäusern in den USA [9]. Weiterhin wurden zwischen 1974 und 2004 in den USA 30 Gruppeninfektionen nach endoskopischen Eingriffen beschrieben [10], dies betraf insgesamt 251 Patienten. Valide Daten für den europäischen Raum existieren nicht.

Ob es nach einer endoskopischen Prozedur mit ungewollter Transmission eines Erregers zu einer Infektion kommt, ist zudem von einer Kette von Faktoren abhängig [8]. Ist der übertragene Organismus überhaupt humanpathogen, wie ist sein Überlebensverhalten in der Umgebung und im Patientenorganismus, gibt es eine Eintrittspforte in den Organismus des Patienten und ist das Immunsystem des Patienten geschwächt oder hat es bereits im Vorfeld versagt. Diese Kette von Voraussetzungen muss erfüllt sein, damit eine Transmission in Form einer Infektion apparent wird. Das impliziert eine hohe Dunkelziffer an exogenen Transmissionen ohne resultierende Infektion.

Einen besonderen Stellenwert haben die Prionenerkrankungen wie die Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung und die neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung. Eine Übertragung durch Endoskope ist bisher nicht beschrieben [11]. Dies mag auch am langen Zeitraum zwischen Infektion und Erkrankungsausbruch liegen. Die weitere Prävalenz und Inzidenz der Prionenerkrankungen und einem assoziierten Infektionsrisiko bei endoskopischen Prozeduren bleibt abzuwarten.

Auch vereinzelte virale Infektionen nach endoskopischen Prozeduren wurden beschrieben. Darunter Hepatitis B und C; eine Transmission von HIV oder Enteroviridae wurde bisher nicht berichtet. Es ist nur ein molekulargenetisch nachgewiesener Fall einer Transmission eines Hepatitis B-Virus nach einer Ösophago-Gastro-Duodenoskopie veröffentlicht worden [12]. Zwei weitere Fälle wurden beschrieben, bei denen zwei Patienten neun Monate nach einer endoskopischen Prozedur HBsAg-positiv getestet wurden. Die verwendeten Endoskope kamen ebenfalls bei HBV-positiven Patienten zum Einsatz und wurden zwischenzeitlich inadäquat aufbereitet. Allerdings wurde der Hepatitis-Subtyp in beiden Fällen nicht bestimmt, eine alternative Infektionsquelle ist somit denkbar [13, 14]. Verschiedene klinische Studien untersuchten den Zusammenhang einer Hepatitis B-Infektion und endoskopischen Prozeduren [15]. Hierbei wurde kein Hinweis auf eine Hepatitis B-Virus-Transmission bei korrekt aufbereiteten Endoskopen detektiert. Ähnlich kontrovers verhält es sich bei Hepatitis C-Viren. Vereinzelte molekulargenetisch nachgewiesene Infektionsfälle existieren. Bei

diesen lag jeweils eine unzureichende Aufbereitung der Endoskope oder des Zusatzinstrumentariums vor [15]. Zusammengefasst besteht, wenn überhaupt, ein nur sehr geringes Risiko der Transmission von Viren beim Einsatz von korrekt aufbereiteten Endoskopen.

Für die Blutspende liegt in Deutschland laut Bundesärztekammer ein temporäres Ausschlusskriterium vor, wenn das Risiko einer übertragbaren Infektion bei einem Spender besteht. Wurden beim Spender innerhalb der letzten vier Monate u.a. endoskopische Untersuchungen, Biopsien und Katheteranwendungen (Ausnahme Einmalkatheter) durchgeführt, wird dieser in Folge dessen als potentieller Spender vier Monate zurückgestellt [16].

Den größten Anteil an beschriebenen Endoskopie-assoziierten Infektionen stellen die bakteriellen Infektionen dar. Diese sind am häufigsten verursacht durch *P. aeruginosa*, Mykobakterien, *Salmonella* spp, *Klebsiella* spp und *Helicobacter pylori* (*H. pylori*). Weitere Erwähnung finden *Bacillus* spp. und *S. marcescens*. Einzelfallberichte über Parasitosen gibt es mit Nachweis von *Strongyloides stercoralis* nach einer Ösophago-Gastro-Duodenoskopie [17].

### **2.2.1 Pseudomonas aeruginosa**

*P. aeruginosa* ist der aktuell am häufigsten identifizierte Erreger exogener Infektionen nach endoskopischen Eingriffen, insbesondere bei Bronchoskopien. Es handelt sich um einen Feuchtkeim, der die Fähigkeit zur Biofilmbildung besitzt. Dies ist von besonderer Bedeutung in Rohr- und Schlauchsystemen sowie in Endoskopiekanälen. Serotyp 10 dominiert dabei die veröffentlichten Fälle, der Grund hierfür ist unklar [15, 18, 19]. Möglich ist eine höhere Virulenz oder die Bildung eines stabileren Biofilms dieses Serotyps.

Die Nachweise reichen von der Kolonisation des Intestinums und Respirationstraktes bis hin zu schweren septischen Krankheitsbildern mit Leberabszessen, Cholangitiden sowie Pneumonien nach endoskopischen Eingriffen.

Die Ursache dieser exogenen Infektionen lag meist in der unzureichenden Aufbereitung der kontaminierten Endoskope. So wurden die Reinigungs- und Desinfektionsverfahren nicht eingehalten oder es gab ein Problem bei der Trocknung. Auch wurden Kontaminationen von Wasserbehältnissen und Rohrverbindungen als ursächlich beschrieben.

Einigen schweren Ausbrüchen mit *P. aeruginosa* lagen der Einsatz von defekten RDG-E, das Verwenden falscher Konnektoren und der Einsatz defekter Endoskope und deren Zusatzinstrumentarium zu Grunde [15].

### **2.2.2 Salmonella spezies**

Vor der Einführung der Reinigungs- und Desinfektionsverfahren für Endoskope waren die Salmonellen der häufigste nachgewiesene Erreger von exogenen Infektionen nach endoskopischen Prozeduren. Die Infektionen traten 1 bis 9 Tage nach der Untersuchung auf. In den meisten Fällen lag eine akute Gastroenteritis vor, außerdem wurden ein peritonealer Abszess, Harnwegsinfektionen, Bakteriämien und Septikämien beschrieben [15].

So findet sich 1980 eine Gruppeninfektion mit *S. agona* in einem nordbayrischen Krankenhaus. Insgesamt konnte bei 25 Personen derselbe Erregertyp nachgewiesen werden. Allen Patienten gemein war eine vorausgegangene gastroscopische Untersuchung. Schließlich gelang der Nachweis von *S. agona* in der Spülflüssigkeit des Instrumentierkanals eines der verwendeten Gastroskope. Die Aufbereitung des eingesetzten Endoskops erfolgte 1980 noch manuell, geeignete RDG-E standen zu dieser Zeit noch nicht zur Verfügung [20].

### **2.2.3 Helicobacter pylori**

Die endoskopische Übertragung von *H. pylori* ist selten. Langenberg et al. berechneten ein 1,1%-iges Risiko [21]. Tytgat schätzte das Übertragungsrisiko auf 4 von 1000 endoskopischen Prozeduren, wenn die Infektionsrate der betrachteten Population 60% beträgt [22]. Die reale Inzidenz scheint jedoch aufgrund der hohen Prävalenz der *H. pylori*-Infektion beim untersuchten Patientenkollektiv und einer oft asymptomatischen Infektion unterschätzt zu sein.

### **2.2.4 Clostridium difficile**

Clostridien sind obligat anaerobe Sporenbildner. Der Übertragungsweg ist fäkal-oral, wobei Sporen oder Bakterien übertragen werden können. Bisher ist nur ein Fall einer schweren pseudomembranösen Kolitis nach Koloskopie veröffentlicht worden [23]. Dabei handelte es sich allerdings um einen Patienten mit Morbus Crohn, der bereits vor der Koloskopie an einer milden Clostridienenteritis erkrankt war. Durch die notwendige Darmlavage und anschließende Untersuchung entwickelte sich jedoch eine fulminante

Erkrankung. Ein Zusammenhang mit einem kontaminierten Koloskop bestand allem Anschein nach somit nicht.

Insgesamt scheint das Risiko einer *C. difficile*-Infektion nach einem endoskopischen Eingriff eher gering. 2%-iges Glutaraldehyd und Peressigsäure sind in der Lage, eine große Anzahl an Sporen abzutöten, vorausgesetzt, die Einwirkzeit ist entsprechend gewählt [24, 25].

### **2.2.5 Klebsiella pneumoniae**

2010 beschrieben Aumeran et al. [26] den Ausbruch einer nosokomialen Infektion durch *K. pneumoniae* - ESBL („Extended-Spectrum-Betalactamasen“) in Folge einer ERCP. Insgesamt wurden 16 Patienten kolonisiert, davon erkrankten acht an einer biliären Sepsis und vier an einer Cholangitis. Bei vier der 16 Patienten wurde eine postprozedurale Darmbesiedlung durch *K. pneumoniae*-ESBL nachgewiesen. Als Ursache wurden ein kontaminiertes Duodenoskop und ein kontaminiertes RDG-E identifiziert.

Im Zeitraum von Juni 2008 bis Januar 2009 wurde die unzureichende Aufbereitung von Duodenoskopen im Rahmen einer ERCP als Ursache von insgesamt sieben Infektionen mit Carbapenem-resistenten *Klebsiella pneumoniae* in zwei Krankenhäusern der USA detektiert. Alle betroffenen Patienten wurden in derselben Endoskopie-Einheit untersucht und interventionell therapiert [27].

In zwei französischen Krankenhäusern wurden zwischen Dezember 2008 bis Oktober 2009 nosokomiale Infektionen nach dem Einsatz eines kontaminierten Duodenoskops beschrieben. Dabei handelte es sich einerseits um eine Infektion mit einer ESBL-produzierenden *Klebsiella* species [26] und andererseits um eine KPC-2-produzierende *Klebsiella* species [28]. Bei diesen Infektionen wurde ein unzureichender Trocknungsprozess in der Aufbereitung identifiziert und als Ursache von den Autoren definiert.

2014 wurden zwei Fallserien nosokomialer Infektionen mit OXA-48 Carbapenemase-produzierenden *K. pneumoniae* in zwei Berliner Krankenhäusern tabellarisch in einem Review gelistet [29]. Kontaminiert waren ein Duodenoskop, welches zehn nosokomiale Infektionen nach sich zog und ein Bronchoskop, mit zwei resultierenden nosokomialen Infektionen. Die weiteren Umstände und eine mögliche Ursache der Ausbrüche, im Sinne einer Fallstudie, wurden nicht diskutiert.

2015 erfolgte dann in „Hygiene und Medizin“ die Veröffentlichung eines nosokomialen Ausbruches mit Nachweis von OXA-48 Carbapenemase-produzierenden *K. pneumoniae* in Zusammenhang mit bronchoskopischen Untersuchungen auf einer Intensivstation des Berliner Paulinenkrankenhauses [30]. Hierbei wurde ausgehend von einem besiedelten Patienten der Erreger über ein Bronchoskop auf vier weitere Patienten übertragen, von denen drei unmittelbar an einer schweren Infektion verstarben. Als Ursache des Ausbruches wurde einerseits ein Defekt am verwendeten Bronchoskop ermittelt. Andererseits erfolgte, entgegen den aktuellen Empfehlungen der KRINKO und des BfArM, die Reinigung mit Peressigsäure. Peressigsäure und Aldehyde können zu einer Fixierung von Eiweiß führen [2].

Inwiefern diese beiden Berliner Fallserien in Zusammenhang stehen und welche Überschneidungen es gibt, bleibt aufgrund unzureichender detaillierter Aufarbeitung des anderen betroffenen Krankenhauses nicht vollständig nachvollziehbar.

Orsi et al. postulierten bereits 2010 einen Zusammenhang zwischen endoskopischen Prozeduren und dem Auftreten von Infektionen mit Carbapenem-resistenten *Klebsiella pneumoniae*. Diese Aussage wird limitiert durch das relativ neue Auftreten von ESBL/KPC-resistenten *Klebsiella* spp. und der relativ kleinen Fallzahlen [31, 32]. Insgesamt besteht jedoch eine Zunahme an *Klebsiella*-Fällen. Diese Spezies wird aktuell prognostisch am relevantesten für zukünftige exogene Transmissionen nach endoskopischen Prozeduren sein und eine besondere Aufmerksamkeit benötigen. Es handelt sich bei den oben beschriebenen Mikroorganismen lediglich um die wichtigsten Vertreter bezüglich Infektionen und Vorkommen im Verdauungstrakt.

Eine sehr detaillierte Übersicht der bisher veröffentlichten Fälle in Zusammenhang mit endoskopischen Untersuchungen und Prozeduren bietet der 2013 erschienene Review von Kovaleva et al. [15] sowie die Fortsetzung aus dem Jahr 2016 [33]. Die Ursachen der entdeckten exogenen Infektionen waren kontaminierte RDG-E oder Endoskope, fehlerhafte Aufbereitungsprozeduren, defekte Endoskope und der Einsatz von nicht sterilisiertem endoskopischen Zusatzinstrumentarium. Bei einigen Fällen wurde die Kontaminationsquelle nicht gefunden oder nicht hinreichend daraufhin getestet.

Die tatsächliche Inzidenz von Endoskopie-assoziierten Infektionen ist aufgrund der oftmals fehlenden oder unzureichenden Surveillance nicht überschaubar. Wir sehen sicher nur einen kleinen Teil der Infektionen, da sie nur schwer detektierbar und nachweisbar sind. Sicher ist, dass die Anzahl der exogenen Infektionen durch eine

korrekte Aufbereitung in Form von Reinigung und Desinfektion deutlich minimiert werden kann.

## 2.3 Endoskop-Familien und die Aufbereitung von flexiblen Endoskopen

### 2.3.1 Endoskop-Familien

Im Laufe der letzten Jahrzehnte wurden die eingesetzten Endoskope immer komplexer. So wurde nicht nur die Bildübertragung revolutioniert, sondern vor allem die Flexibilität der Geräte verbessert und die Möglichkeiten der interventionellen Endoskopie vielfältig umgesetzt, vor allem bei den Duodenoskopen. 2013 wurde erstmals eine europäische herstellerunabhängige Definition der verschiedenen Endoskop-Familien erarbeitet [34]. Dabei wurden drei Gruppen festgelegt, die in Tabelle 1 aufgeführt sind. Endoskope außerhalb dieser Gruppen müssen individuell bewertet werden.

**Tabelle 1: Merkmale und Beispiele der Endoskop-Familien (verändert nach [34])**

	<b>Gruppe 1</b>	<b>Gruppe 2</b>	<b>Gruppe 3</b>
<b>Merkmale</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- mit Luft-/Wasserkanal</li> <li>- mit Instrumentier-/Absaugkanal</li> <li>- mit/ohne zusätzlichem Instrumentierkanal</li> <li>- mit/ohne Zusatzspülkanal</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- mit Luft-/Wasserkanal</li> <li>- mit Instrumentier-/Absaugkanal</li> <li>- mit/ohne zusätzlichem Instrumentierkanal</li> <li>- mit/ohne Albarranhebel</li> <li>- mit bis zu zwei Steuerkanälen für eine Ballonfunktion</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- mit bis zu zwei Kanälen, aber ohne Kanalsystem im Versorgungsschlauch oder</li> <li>- ohne Kanäle im gesamten Endoskop</li> </ul>
<b>Beispiele</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Gastroskope</li> <li>- Koloskope</li> <li>- Duodenoskope mit „abgeschlossenem“ Albarranhebel</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Duodenoskope mit „offenem“ Albarranhebel</li> <li>- Endosonographiegeräte</li> <li>- Enteroskope</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bronchoskope</li> <li>- Endoskope mit Einsatz in der Otorhinolaryngologie, Gynäkologie und Urologie</li> </ul>

Diese Einteilung ist von besonderer Bedeutung im Hinblick auf die Validierung von Prozessen im RDG-E und auf die Surveillance im klinischen Alltag. So ermöglicht diese Einteilung, dass repräsentative Vertreter der einzelnen Gruppen untersucht werden können, was vergleichbare Daten innerhalb und zwischen den Gruppen schafft.

### 2.3.2 Aufbereitung von flexiblen Endoskopen

Bei der Aufbereitung von flexiblen Endoskopen gibt es derzeit die Möglichkeit der manuellen Aufbereitung sowie der teilmaschinellen und der maschinellen Aufbereitung in einem RDG-E (siehe Tabelle 2 [2]).

Die Aufbereitung besteht aus der Vorreinigung, die sich noch im Untersuchungsraum unmittelbar an die endoskopische Untersuchung anschließt. Es folgt die manuelle Reinigung im Aufbereitungsraum, besonders die Endoskope der Gruppe 2 bedürfen hier einer sorgfältigen Reinigung. So wird z.B. bei den Duodenoskopen der Albarranhebel in Mittelstellung gebracht und mit einer weichen Bürste von allen Seiten gereinigt. Nun kann das Endoskop entweder in das RDG-E eingelegt werden oder weiter manuell oder teilmaschinell unterstützt aufbereitet werden. Es folgen die Reinigung, Zwischenspülung, Desinfektion, Schlusspülung und die anschließende Trocknung.

**Tabelle 2: Übersicht über die verschiedenen Teilschritte der unterschiedlichen Aufbereitungsverfahren**

	manuell, ggf. teilmaschinelle Unterstützung	maschinell
<b>Vorreinigung</b>	Direkt im Anschluss an die Untersuchung im Untersuchungsraum: Abwischen des Außenmantels und Durchspülen der Kanäle	
<b>Bürstenreinigung der Endoskopkanäle</b>	Sorgfältige manuelle Reinigung im Aufbereitungsraum (passende desinfizierte Bürsten benutzen)	
<b>Reinigung und Zwischenspülung</b>	Manuell im Aufbereitungsraum	im RDG-E
<b>Desinfektion</b>	Luftblasenfreies Einlegen und Durchspülen mit Desinfektionsmittellösung	im RDG-E
<b>Schlusspülung</b>	Manuell im Aufbereitungsraum	im RDG-E
<b>Trocknung</b>	Manuell im Aufbereitungsraum (Druckluft)	im RDG-E

Die detaillierten Arbeitsschritte sind in der Empfehlung der KRINKO/BfArM „Anforderungen an die Hygiene bei der Aufbereitung von Medizinprodukten“ [2] nachzulesen.

Die während der Aufbereitung verwendeten Reinigungs- und Desinfektionslösungen sind nach den Herstellerangaben des jeweils verwendeten Produktes gemäß den notwendigen Konzentrationen herzustellen, regelmäßig zu erneuern und während der Validierung entsprechend den Ergebnissen ggf. anzupassen. Wichtig ist, dass die angegebenen Einwirkzeiten zu beachten und unbedingt einzuhalten sind.

Die komplette manuelle Aufbereitung birgt ein Gesundheitsrisiko für das Personal und bindet personelle Ressourcen. Die Forderung nach einer Standardisierbarkeit und Validierbarkeit wird auch nur unzureichend erfüllt. Die teilmaschinelle Aufbereitung sollte aufgrund schlechter Aufbereitungsergebnisse überhaupt keinen Einsatz mehr finden.

Zu favorisieren ist die maschinelle Aufbereitung in einem RDG-E. Die Aufbereitung in einem geschlossenen System hat viele Vorteile: die Standardisierung des Aufbereitungszyklus mit genauer Dokumentation, die Reduktion der Chemikalienbelastung für das Personal, die geringere Kontaminationsgefahr, die bessere Arbeitssicherheit und eine geringere Personalbindung.

## **2.4 Gesetzliche Rahmenbedingungen, Normen, Leitlinien und Empfehlungen beim Einsatz von flexiblen Endoskopen und endoskopischem Zusatzinstrumentarium**

Es besteht eine Verpflichtung zur qualitätsgesicherten Aufbereitung von Medizinprodukten, die in einer Reihe von Gesetzen, Verordnungen und Normen beschrieben ist. Detailliert, vor allem flexible Endoskope betreffend, wird dies in kooperativ entworfenen Leitlinien beschrieben. An der Erstellung und Aktualisierung beteiligt waren und sind die DGKH (Deutsche Gesellschaft für Krankenhaushygiene), die DGVS (Deutsche Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten), die DGSV (Deutsche Gesellschaft der Sterilgutversorgung), die DEGEA (Deutsche Gesellschaft für Endoskopiefachberufe) und der Arbeitskreis Instrumentenaufbereitung [35, 36, 37].

An den Empfehlungen, die detailliert die praxinahen Umsetzungen der Aufbereitung beschreiben, waren die KRINKO beim Robert Koch-Institut (RKI) und das BfArM [2] beteiligt. Auf europäischer Ebene existiert zudem die ESGE (European Society of Gastrointestinal Endoscopy) mit ihren europäischen Empfehlungen und Leitlinien. Auf bundesdeutscher Ebene sollte jedoch entsprechend der nationalen Leitlinien gearbeitet werden.

### **2.4.1 Gesetzliche und normative Grundlagen**

Verschiedene Gesetzestexte regeln unterschiedliche Sachverhalte in Bezug auf Medizinprodukte. Einerseits betrifft es das Medizinprodukt an sich und andererseits die regelmäßige korrekte Verwendung und Aufbereitung eines Medizinproduktes. Im

Medizinproduktegesetz (MPG) [38] werden die Anforderungen an die funktionelle und hygienische Sicherheit von Medizinprodukten geregelt. Darunter fallen nicht nur die Endoskope, sondern auch die RDG-E. Nach §8, Abs. 2 der Medizinprodukte-Betreiberverordnung (MPBetreibV) [39] sind Reinigung, Desinfektion und Sterilisation von Medizinprodukten unter Berücksichtigung der Angaben des Herstellers mit geeigneten validierten Verfahren durchzuführen. Zusätzlich sind die Abläufe zur Erzielung des Verfahrenserfolges zu dokumentieren.

Im Gesundheitswesen sind zudem alle Leistungserbringer verpflichtet, sich an Maßnahmen der Qualitätssicherung mit dem Ziel der verbesserten Ergebnisqualität zu beteiligen. Dazu müssen die Leistungserbringer ein einrichtungsinternes Qualitätsmanagement einführen und weiterentwickeln (Sozialgesetzbuch V, §§135-137) [40]. Bezogen auf eine Endoskopieeinrichtung ist damit gemeint, dass regelmäßige mikrobiologische und technische Kontrollen der aufbereiteten Endoskope und auch der verwendeten RDG-E erfolgt und die gewonnenen Ergebnisse protokolliert werden müssen. Hinzu kommt die Forderung im Infektionsschutzgesetz (IfSG) [41] nach Hygieneplänen, in denen die Aufbereitung sowie die Kontroll- und Prüfungsintervalle festgelegt sind.

Des Weiteren gilt die Trinkwasserverordnung [42]. Diese ist die direkte Umsetzung der Richtlinie 98/83/EG des Rates über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch vom 3. November 1998. Hinzu kommt die Biostoffverordnung (BiostoffV) [43], welche ergänzt wird durch die BGV A1 „Grundsätze der Prävention“ [44] und die TRBA 250 „Biologische Arbeitsstoffe im Gesundheitswesen und in der Wohlfahrtspflege“ [45].

Neben den gesetzlichen Grundlagen gibt es zur Konkretisierung eine Vielzahl an internationalen Normen. Die DIN EN ISO 14971 [46] beschreibt das Risikomanagement im Umgang mit Medizinprodukten. Die DIN EN ISO 15883 [47] ist die Norm für Reinigungs- und Desinfektionsgeräte. Diese definiert die Geräteanforderungen und die Validierung der Aufbereitungsprozesse in und mit Reinigungs- und Desinfektionsgeräten. Sie besteht aus sieben Teilen. Teil 1 [47a] legt die allgemeinen Anforderungen, Begriffe und Prüfverfahren fest. Teil 4 [47b] beschreibt die Anforderungen und Prüfverfahren für Reinigungs- und Desinfektionsgeräte für thermolabile Endoskope, der Teil 5 [47c] legt die Prüfanschmutzungen und Prüfverfahren zum Nachweis der Reinigungsleistung fest.

## 2.4.2 Leitlinien und Empfehlungen

Die Vielzahl an unterschiedlichen Gesetzen [38-45] mit allgemeiner und verklausulierter Formulierung und die verschiedenen internationalen Normen [46, 47] erschweren die Umsetzung in der täglichen Anwendung und Routine. Hierbei hilfreich und praktikabel sind die bisher erschienenen Leitlinien und Empfehlungen.

1. Empfehlung der KRINKO beim RKI und des BfArM „Anforderung an die Hygiene bei der Aufbereitung von Medizinprodukten“; hierbei insbesondere die Anlage 8. Diese beinhaltet die Anforderungen an die Hygiene bei der Aufbereitung flexibler Endoskope und endoskopischen Zusatzinstrumentariums [2].
2. Leitlinie zur Validierung maschineller Reinigungs- und Desinfektionsprozesse zur Aufbereitung thermolabiler Endoskope. Diese Leitlinie richtet sich an alle Einrichtungen, in denen thermolabile Endoskope zur Anwendung am Menschen in RDG-E aufbereitet werden [35].
3. Leitlinie zur Validierung der manuellen Reinigung und manuellen chemischen Desinfektion von Medizinprodukten. Diese Leitlinie richtet sich an alle Einrichtungen, in denen eine manuelle Reinigung und Desinfektion von Medizinprodukten im Tauchverfahren erfolgt [36].
4. Leitlinie zur Validierung und Routineüberwachung maschineller Reinigungs- und thermischer Desinfektionsprozesse für Medizinprodukte. Diese Leitlinie richtet sich an alle Einrichtungen, in denen thermostabile Medizinprodukte zur Anwendung im Menschen aufbereitet werden [37].
5. Die „European Society of Gastrointestinal Endoscopy“ erstellt und überarbeitet regelmäßig Leitlinien, die verschiedenste Bereiche der gastrointestinalen Endoskopie betreffen. Neben der Sedierung, der Qualitätsicherung und Leitlinien für endoskopische Prozeduren spielt hier auch die Hygiene und Infektionskontrolle eine wichtige Rolle [48].

Die Empfehlung von KRINKO/BfArM [2] nimmt dabei eine Sonderstellung ein und hat somit einen höheren Stellenwert als die übrigen Leitlinien, da sie in der Medizinprodukte-Betreiberverordnung [39] verpflichtend erwähnt wird und somit Gesetzescharakter hat.

## **2.5 Validierung des Schlauchprüfmodells für RDG-E und Validierung im Reinigungs- und im Gesamtprozess bei der Aufbereitung von flexiblen Endoskopen**

Die Validierung ist ein dokumentiertes Verfahren zum Erbringen, Aufzeichnen und Interpretieren der Ergebnisse, die für den Nachweis benötigt werden, dass ein Verfahren bzw. Prozess beständig Produkte liefert, die den vorgegebenen Spezifikationen entsprechen. Die Validierung ist somit der dokumentierte Nachweis der beständigen Wirksamkeit eines standardisierten Prozesses [47].

### **2.5.1 Validierte Prüfungen und Qualifikationen eines RDG-E**

Bei der Entwicklung und beim dauerhaften Einsatz eines RDG-E im Alltag gibt es verschiedenste Prüfungen und Qualifikationen, die geleistet und erfüllt werden müssen. Darunter fallen die Typprüfung und Abnahmeprüfung sowie die Installationsqualifikation, Betriebsqualifikation und Leistungsqualifikation.

Die Typprüfung liegt im Verantwortungsbereich des RDG-E Herstellers. Bei der Konstruktion und Entwicklung eines RDG-E steht vor der Produktvermarktung die Konformitätsbewertung und CE-Kennzeichnung der Geräte nach dem Medizinproduktegesetz [38]. Ein RDG-E darf nur in den Verkehr gebracht werden, wenn dieses der Typprüfung der DIN EN ISO 15883 entspricht [47]. Bei der Typprüfung handelt es sich um ein Prüfverfahren zum grundsätzlichen Nachweis der Übereinstimmung einer RDG-E-Baureihe mit der Norm DIN EN ISO 15883 [47]. Sie dient auch der Erhebung von Referenzdaten für Folgeprüfungen durch den Hersteller. Erbringt eine RDG-E-Prüfung den Nachweis der Erfüllung der Anforderungen nach DIN EN ISO 15883 [47], handelt es sich um ein normkonformes RDG-E [35]. Davon unterscheidet man die Abnahmeprüfung von neu installierten RDG-E, diese wird vom Hersteller/Lieferanten durchgeführt und ist die Voraussetzung für die Übergabe des Gerätes an den Betreiber [35]. Für ein RDG-E besteht die Validierung aus Installationsqualifikation, Betriebsqualifikation und Leistungsqualifikation.

Die Installationsqualifikation ist der Nachweis, dass ein RDG-E in Übereinstimmung mit seinen Spezifikationen geliefert und installiert wurde. Die Betriebsqualifikation ist der Nachweis, dass der Betrieb der installierten Ausrüstung (z.B. RDG-E mit den notwendigen Anschlüssen) innerhalb bestimmter Spezifikationen abläuft [35]. Die Leistungsqualifikation ist der Nachweis, dass ein RDG-E, so wie es installiert ist und

entsprechend betrieben wird, dauerhaft nach bestimmten Kriterien arbeitet und Produkte (Endoskope) hervorgebracht werden, die die jeweiligen Spezifikationen erfüllen [35]. Im Falle eines Endoskops muss dieses nach den gegebenen Richtwerten (siehe Tabelle 3) als sauber definiert sein, um erneut bei einem Patienten angewendet werden zu können.

Bei der Leistungsqualifikation eines RDG-E wird sowohl die Wirksamkeit der alleinigen Reinigungsleistung als auch die Wirksamkeit des Gesamtprozesses (Reinigung und Desinfektion) mit einem Prüfmodell getestet. Diese Aufteilung ergibt sich aus dem Sachverhalt, dass ein gutes Desinfektionsergebnis entscheidend von der vorherigen Reinigung abhängt. Ist zum Beispiel die Reinigungsleistung eines RDG-E mangelhaft und es verbleiben Rückstände im oder am Endoskop, so kann es durch den anschließenden korrekten Einsatz des Desinfektionsmittels zu einer Fixierung von Rückständen kommen. Dies kann fatal im anschließenden erneuten medizinischen Einsatz des aufbereiteten Endoskops sein oder zur Biofilmbildung führen. Bei dem verwendeten Prüfmodell handelt es sich um einen Polytetrafluorethylen (PTFE) - Schlauchprüfkörper mit entsprechender Prüfanschmutzung, welche sich in Ringversuchen als geeignet erwiesen haben [49].

### **2.5.2 Validierung im Reinigungs- und im Gesamtprozess bei der Aufbereitung von flexiblen Endoskopen**

Der Bioburden eines indikationsgerecht benutzten Endoskops liegt bei maximal  $10^{10}$  KBE/Gerät für ein Koloskop. Eine manuelle Reinigung schafft eine  $10^4$ -fache Reduktion, eine alleinige Desinfektion erreicht eine  $10^5$ -fache Reduktion.

Reinigungs- und Gesamtprozess werden zwingend unabhängig voneinander untersucht. Die Validierung des Reinigungsprozesses wird nach der Unterbrechung des zuvor eingestellten RDG-E-Programms direkt vor der Desinfektion ermittelt. Überprüft wird einerseits die Reinigungsleistung an den zuvor angeschmutzten Prüfkörpern (Schlauchprüfkörper) und andererseits die angeschmutzten Kammerwände und Beladungsträger (Körbe) des RDG-E. Die Überprüfung der Wirksamkeit wird mit den in Tabelle 3 aufgelisteten Prüfgegenständen und Prüfmethoden durchgeführt [nach 35].

**Tabelle 3: Leistungsqualifikation: Wirksamkeit der Reinigung [35]**

Prüfgegenstand	Prüfmethode	Prüfanforderung	Nachweismethode
Ersatzgerät/ PTFE-Schlauch	Prüfkörper und Prüfanschmutzung (ohne Prüforganismus)	1. sichtbar sauber 2. Richtwert $\leq 100 \mu\text{g}$ Proteingehalt	1. visuell 2. OPA-Methode
RDG-E (ohne PTFE- Schlauch und ohne Endoskope)	Beladungsträger und Kammerwände mit Prüfanschmutzung (ohne Prüforganismus)	1. sichtbar sauber 2. ggf. Proteinsuchtest, wenn visuell sauber	1. visuell 2. OPA-Methode, wenn visuell sauber

Die Validierung im Gesamtprozess erfolgt analog zur Validierung des Reinigungsprozesses, hierbei wird das gesamte RDG-E-Programm durchlaufen und anschließend werden die Prüfkörper untersucht. Hierbei findet jedoch eine Prüfanschmutzung mit einem Prüforganismus Anwendung. Außerdem werden reale Endoskope aus allen Endoskop-Familien angeschmutzt und überprüft.

**Tabelle 4: Leistungsqualifikation: Wirksamkeit im Gesamtprozess (Reinigung und Desinfektion) [35]**

Prüfgegenstand	Prüfmethode	Prüfanforderung	Nachweismethode
PTFE-Schlauch	Prüfkörper und Prüfanschmutzung (mit Prüforganismus)	Richtwert Reduktion um $\geq 9 \log_{10}$ /Stufen	visuell (flüssiger Agar) mikrobiologischer Nachweis im Eluat
reale Endoskope aus jeder Endoskop- Familie (Endkontrolle)	in Kanälen und auf Außenflächen	Richtwert $\leq 20$ KBE/Kanal, keine pathogener Bakterien	mikrobiologischer Nachweis im Eluat

Zusammenfassend ist die Validierung eines RDG-E im Rahmen der Typprüfung und der Leistungsqualifikation notwendig und auch regelmäßig durchzuführen. Dabei wird zwingend zwischen der Überprüfung der Reinigungsleistung und der Überprüfung des Gesamtprozesses unterschieden. Zum Einsatz kommen dabei ein Prüfkörper mit einer Prüfanschmutzung und im laufenden Alltagsgebrauch des RDG-E auch real kontaminierte Endoskope aus allen Endoskop-Familien. Die jeweiligen Prüfanforderungen mit der entsprechenden Nachweismethode sind in

Tabelle 3 für die Reinigungsleistung und in Tabelle 4 für den Gesamtprozess ersichtlich [nach 35].

Vor der Anwendung des Schlauchprüfmodells innerhalb der verschiedenen Validierungsstufen eines RDG-E steht bei der Entwicklung und in der Anwenderpraxis die Validierung des Schlauchprüfmodells an sich.

### **2.5.3 Validierung des Schlauchprüfmodells für RDG-E**

Die Validierung eines Prüfmodells ist aufwendig. Zunächst müssen alle verwendeten Materialien und Teilschritte auf ihre jeweilige Tauglichkeit hin überprüft werden. Ist dies erfolgreich nachgewiesen, werden im Anschluss der Gesamtprozess und notwendige Zwischenprozesse überprüft. So müssen im Falle der Validierung des Schlauchmodells für RDG-E zunächst die verwendeten PTFE-Schläuche und die hergestellte Prüfanschmutzung in Zusammensetzung, Reproduzierbarkeit und Eignung überprüft werden.

Beim Schlauchprüfmodell für die Prüfung der RDG-E sind 200 cm lange, 2 mm-durchmessende PTFE-Schläuche mit einem resultierenden Innenvolumen von 6,3 ml im Einsatz. Diese simulieren die inneren Kanäle eines flexiblen Endoskops.

PTFE-Schläuche unterschiedlicher Länge wurden in einer Arbeit von Borchers und Mielke 2004 [50] im Zusammenhang mit der Wirksamkeit der Dampfsterilisation von Hohlkörpern untersucht. Dabei stellte ein 150 cm langer PTFE-Schlauch im Vergleich zum Silikonschlauch und zum Edelstahlrohr die höchsten Anforderungen an die Dampfsterilisation. Ein anderer Aspekt ist die mögliche Verfälschung der Prüfergebnisse durch biologische Herstellungsrückstände. Biering und Beilenhoff bestätigten jedoch 2013 in einem Ringversuch, dass die unbenutzten PTFE-Schläuche keine relevanten Proteinmengen enthalten, welche die Prüfergebnisse wesentlich beeinflussen [49].

Zur kompletten Validierung des Schlauchprüfmodells ist zudem die Überprüfung der verwendeten Prüfanschmutzung in Zusammensetzung und Reproduzierbarkeit sowie der Rückgewinnungsrate beim Einsatz von verschiedenen Spülmitteln und manuellen Spülmethoden zu testen.

## 2.6 Zielstellung der Arbeit

Das Schlauchprüfmodell für RDG-E wird zur Zeit, wie gesetzlich vorgeschrieben und von KRINKO und BfArM empfohlen, bei verschiedenen Prüfungen und Qualifikationen eines RDG-E eingesetzt. Diese Ergebnisse dienen der Überprüfung von normkonformen RDG-E und zur Vergleichbarkeit der einzelnen RDG-E in ihrer Leistung untereinander.

Hierbei ist bisher noch nicht in allen Punkten untersucht worden, ob das eingesetzte Schlauchprüfmodell als Methode selbst reproduzierbare Ergebnisse liefert. Es ist notwendig, das Schlauchprüfmodell ohne den Einsatz eines RDG-E auf seine Tauglichkeit, Praktikabilität und Reproduzierbarkeit hinsichtlich der Rückgewinnung zu überprüfen. Die dafür notwendige Methode wurde in Versuchen für diese Arbeit entwickelt. Dabei zum Einsatz kamen fünf verschiedene Spüllösungen, fünf verschiedene Spülmethoden und die Behandlung mit Ultraschall.

Dabei wurden folgende Fragen untersucht:

1. Welche Methode zur Rückgewinnung der Prüfanschmutzung im Schlauchprüfmodell, bestehend aus reaktiviertem Schafblut und *E. faecium*, ist geeignet?
2. Welchen Einfluss haben unterschiedliche Spüllösungen und unterschiedliche Spülmethoden auf die Konzentration der Rückgewinnungs-Eluate?
3. Ist der zusätzliche Einsatz einer Ultraschallvorbehandlung der Prüfkörper sinnvoll?
4. Liefert das Schlauchprüfmodell reproduzierbare Ergebnisse?

### 3. MATERIAL UND METHODEN

Die Versuchsreihen zum Thema „Untersuchungen zur Standardisierung von Prüfmethode für Reinigungs- und Desinfektionsgeräte zur Aufbereitung flexibler Endoskope mit dem Prüforganismus *Enterococcus faecium*“ verliefen nach folgendem Grundschemata:

1. Herstellung der Bakteriensuspension
2. Herstellung der Prüfanschmutzung und Kontamination der Prüfkörper
3. Spülen der Prüfkörper mit verschiedenen Spüllösungen, verschiedenen Spülmethode und mit Ultraschallbehandlung
4. Koloniezahlbestimmung mit Doppelbestimmung
5. Auszählen der Kulturplatten und Auswertung der Ergebnisse

Die Schritte 1, 2, 4 und 5 blieben bei den unterschiedlichen Versuchsreihen immer gleich. Variiert wurde Schritt 3 mit verschiedenen Spüllösungen, Spülmethode und der Behandlung mit Ultraschall.

Im Vorfeld der Versuchsreihe „Behandlung der Prüfkörper mit Ultraschall“ wurden Versuchsreihen zum Eindringen von Ultraschall in die Prüfkörper und zum Überlebensverhalten von *E. faecium* bei Ultraschall durchgeführt. Es wurden folgende Materialien und Geräte verwendet.

#### 3.1 Material

Die verwendeten Labormaterialien, Spüllösungen und Kulturplatten wurden jeweils zu Beginn der einzelnen Versuchsreihen bereitgestellt und waren steril.

##### 3.1.1 Prüforganismus

Prüforganismus war *E. faecium* (DSM 2146 / ATCC 6057). Der Referenzstamm wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH (Braunschweig, Deutschland) bezogen.

*E. faecium* wurde als Stammkultur auf Trypton-Soja-Agar (TSA) angelegt und im Tiefkühlschrank bei  $-70 \pm 1$  °C gelagert. Von der Stammkultur wurden Gebrauchskulturen auf TSA angelegt, indem die Stammkultur zwei Stunden bei Raumtemperatur aufgetaut, anschließend auf eine TSA-Platte überimpft und unter aeroben Bedingungen für 24 h bei  $36 \pm 1$  °C inkubiert wurde. Danach erfolgte eine weitere Passage auf TSA.

Diese Kulturplatte diente als Gebrauchskultur und wurde im Kühlschrank bei  $4 \pm 1^\circ\text{C}$  für maximal zwei Monate aufbewahrt [51].

### 3.1.2 Schlauchprüfkörper

Die inneren Kanäle flexibler Endoskope bestehen, laut Angaben der Hersteller, aus Polytetrafluorethylen (PTFE). Daher wurden als Prüfkörper PTFE-Schläuche (Spec. C929.3 Lot. No. TS 0301249 C1 Bestellnummer: 1265 Firma Deutsch & Neumann) milchig und klar mit einem Innendurchmesser von 2 mm und einer Länge von 200 cm eingesetzt. Das entspricht einem Innenvolumen von 6,3 ml. Die PTFE-Schläuche simulieren die verschiedenen Kanäle von flexiblen Endoskopen [52].

### 3.1.3 Prüfanschmutzung

Zu jeder Versuchsreihe gehörte die Herstellung der benötigten Prüfanschmutzung. Diese bestand aus heparinisiertem Schafblut, der Bakteriensuspension und Protaminhydrochlorid (ICN 1000, Firma ICN Pharmaceuticals Germany GmbH).

Das heparinisierte Schafblut wurde von der Firma ACILA AG (Mörfelden-Walldorf, Deutschland) bezogen. Es enthielt nach Angaben des Herstellers zehn Internationale Einheiten (IE) Heparin pro Milliliter Blut. Das Schafblut wurde bis zum Versuchstag im Kühlschrank bei  $4 \pm 1^\circ\text{C}$  aufbewahrt, entsprechend den Angaben des Herstellers jedoch längstens für sieben Tage. Insgesamt wurden acht verschiedene Blutchargen verwendet (siehe Tabelle 5).

**Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Blutchargen**

Blutchargennummer - Firma ACILA	Verwendung bei Versuchsreihe
Ch.B. 20636	Spülmittel
Ch.B. 20646	Spülmittel
Ch.B. 20658	Spülmittel
Ch.B. 20694	Spülmittel
Ch.B. 20806	Spülmethode
Ch.B. 20822	Spülmethode
Ch.B. 21997	Behandlung mit Ultraschall
Ch.B. 22012	Behandlung mit Ultraschall

Die Menge der frisch hergestellten Prüfanschmutzung für die jeweiligen Versuchsreihen richtete sich nach der Anzahl der zu kontaminierenden Prüfkörper. Die Prüfanschmutzung pro Prüfkörper war wie folgt zusammengesetzt.

9,5 ml	Heparinisiertes Schafblut
0,35 ml	Bakteriensuspension
0,15 ml	Protaminhydrochlorid

Diese drei Komponenten wurden immer erst kurz vor der Kontamination der Prüfkörper in einem Erlenmeyerkolben (50 ml mit Weithals) miteinander vermischt. Die Herstellung der benötigten Bakteriensuspension wird in 3.2.1 detailliert beschrieben.

### 3.1.4 Spüllösungen

Bei den Versuchsreihen kamen fünf verschiedene Spüllösungen zum Einsatz.

- I. Natriumchlorid (NaCl) 0,9%ig (Firma MERCK, 1.06404.100)
- II. Natriumchlorid 0,9%ig mit 0,1% Tween80 (Firma MERCK-Schuchardt, 822187 S20885702)
- III. Trypton-Sojamehlpepton-Bouillon (*Caseinpepton-Sojamehlpepton-Bouillon*)

17 g/l	Caseinpepton
3 g/l	Sojamehlpepton
5 g/l	Natriumchlorid
2,5 g/l	Dikaliumhydrogenphosphat
2,5 g/l	Glucose

(Firma OXOID Bestellnummer CM 0129)

- IV. Trypton-Sojamehlpepton-Bouillon (Zusammensetzung siehe unter III) mit Enthemmern

3 %	Tween 80	(Firma Merck)
0,3 %	Lecithin	(Firma Serva)
0,1 %	Histidin	(Firma Merck)
0,5 %	Natrium-Thiosulfat	(Firma Merck)

- V. Natriumdodecylsulfat 1% (*Sodiumdodecylsulfat - SDS*)  
(Firma SERVA Best.Nr. 20760)

### 3.1.5 Labormaterialien und Ultraschallgerät

Für die Versuchsreihen wurden verschiedene Labormaterialien, Laborgeräte, Nährmedien und Kulturplatten benötigt. Die Geräte sind in Tabelle 6, die Nährmedien in Tabelle 7 und die übrigen Materialien in Tabelle 8 zusammen mit den Herstellerfirmen aufgeführt.

Die benutzten Laborgeräte waren über den gesamten Zeitraum der Versuchsreihen immer dieselben Geräte.

**Tabelle 6: Übersicht der Laborgeräte und deren Herstellerfirmen**

Laborgerät	Firma (Fa.), Bezeichnung, Bestellnr.
Kühlschrank	Fa. Kirsch
Tiefkühlschrank	Fa. AEG
Brutschrank	Fa. Heraeus
Zentrifuge - Varifuge	Fa. Heraeus , Varifuge 3.2 S, Fabr.Nr. 163063
Reagenzglasrüttler	Fa. Heraeus , Certomat R
Feinwaage	Fa. Sartorius
Vortex	Fa. Janke+Kunkel IKA Labortechnik, VF2
Koloniezählgerät - Colony Counter	Fa. Bioblock Scientific, 50971, SN: 990800207
Spiralometer (Spiralsystem)	Fa. Meintrup-Labortechnik, Serial 789 Model CU
Ultraschallgerät	Fa. Bandelin Sonorex Super RK 106, Best. Nr. 306
Infusomat <sup>®</sup> II	Fa. B.Braun Melsungen, Type 870602, Nr. 7320
Sogpumpe	Fa. Fisher-Bioblock-Scientific, Typ N022AN.18, Nr. 01646557

Des Weiteren wurde eine laborübliche Ausstattung an sterilen Bechergläsern, Erlenmeyerkolben, Spateln, Messzylindern und sonstigen Laborgefäßen und Labormaterialien benutzt.

**Tabelle 7: Übersicht der verwendeten Nährmedien**

Nährboden / Kulturagar	Abkürzung	Firma / Bezeichnung
Trypton-Sojamehlpepton-Bouillon (Caseinpepton-Sojamehlpepton-Bouillon)	TSB	Fa. OXOID, CM 0129
Trypton-Sojamehlpepton-Agar (Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agar)	TSA	Fa. OXOID, CM 0131
Kanamycin-Äsculin-Azid-Agar	KAA-Agar	Fa. MERCK, Best-Nr. 1.05222

Folgend sind die Zusammensetzungen der Nährmedien aufgelistet.

#### 1. Trypton-Sojamehlpepton-Bouillon

17 g/l	Caseinpepton
3 g/l	Sojamehlpepton
5 g/l	Natriumchlorid
2,5 g/l	Dikaliumhydrogenphosphat
2,5 g/l	Glucose-Monohydrat
pH-Wert: 7,3 +/- 0,2	

Hierbei handelt es sich um die gleiche Lösung wie bei 3.1.4. Erneut aufgelistet wird sie der Vollständigkeit halber, da die Bouillon hier als Nährmedium zum Einsatz kommt und nicht wie unter 3.1.4 als Spüllösung.

#### 2. Trypton-Sojamehlpepton-Agar

15 g/l	Caseinpepton
5 g/l	Sojamehlpepton
5 g/l	Natriumchlorid
15 g/l	Agar
pH-Wert: 7,3 +/- 0,2	

#### 3. Kanamycin-Äsculin-Azid-Agar

20 g/l	Caseinpepton
5 g/l	Hefeextrakt
5 g/l	Natriumchlorid
1 g/l	Äsculin
1 g/l	Natriumcitrat
0,5 g/l	Ammoniumeisen(III)-citrat
0,15 g/l	Natriumazid
0,02 g/l	Kanamycinsulfat
10 g/l	Agar
pH-Wert: 7,1 +/- 0,2	

Beim Kanamycin-Äsculin-Azid-Agar handelt es sich um ein Selektiv-Nährmedium für D-Streptokokken. Diese hydrolysieren Äsculin in Äsculetin und Glukose. Das Äsculetin bildet mit Eisen(III)-Ionen einen schwarzbraunen Farbkomplex. Diese Schwarzfärbung erleichtert das Auszählen, besonders bei dichtem Bewuchs der Kulturplatten.

**Tabelle 8: Übersicht der verwendeten Labormaterialien**

Labormaterialien	Firma
50 ml Blasenspritze, steril	nicht dokumentiert
10 ml Einmalspritze, steril	nicht dokumentiert
Eppendorf®- Eurotips 2,5ml als PTFE-Prüfkörperaufsatz, sterilisiert	Fa. Eppendorf®
50 ml Einweg-Zentrifugen-Behälter, steril (Polypropylene Conial Tube 30 x 115 mm style)	Fa. Becton/Dickinson, No. 352070
Eppendorf®-Pipetten (1000 µl und 200 µl)	Fa. Eppendorf®
Combi-Stopper-Verschlussknoten - Luer-Lock®	Fa. B. Braun Melsungen , Artikelnummer 449501, PZN 3200685
Aufsatz-Filtrationsgerät zur Membranfiltration, steril	Fa. Merck Millipore
Membranfilter 0,45 µm rund, steril	Fa. Merck Millipore

Bei den Versuchsreihen mit Ultraschall wurde das Gerät Sonorex Super RK 106 verwendet.

### **Technische Daten**

Schwingwanne, innen:	Durchmesser 240 mm, 130 mm tief
Material:	Edelstahl 1.4301
Inhalt:	5,6 Liter
Arbeitsfüllmenge:	4,0 Liter
Schwingsystem:	4 PZT-Breitstrahlschwingsysteme
Ultraschall-Spitzenleistung:	480 W
HF-Leistung:	120 W eff.

Der verwendete Einhängerkorb (Typ K 6, Best. Nr. 356) hat einen Durchmesser von 215 mm und ist 50 mm hoch. Dieser ist das passende Zubehör für das verwendete Ultraschallgerät.

## **3.2 Methoden**

Insgesamt wurden fünf verschiedene Versuchsreihen durchgeführt. Die erste mit fünf unterschiedlichen Spüllösungen, die zweite Versuchsreihe mit fünf unterschiedlichen Spülmethode und die dritte mit einer Ultraschallbehandlung der kontaminierten Prüfkörper vor dem Spülen. Der dritten Versuchsreihe waren zwei weitere Versuchsreihen zur Methodenentwicklung zum Einsatz des Ultraschalls vorgelagert. Hierbei erfolgte die Überprüfung des Eindringens von Ultraschall in die Schlauchprüfkörper und

es wurde das Überlebensverhalten des Prüforganismus *E. faecium* bei Ultraschallbehandlung untersucht.

Kontaminiert wurden die Prüfkörper mit der unter 3.1.3 aufgeführten Prüfanschmutzung, die jeweils vor den Versuchen frisch hergestellt wurde. Die Gewinnung der dazu benötigten Bakteriensuspension stand dabei immer am Beginn eines Versuchstages.

### **3.2.1 Herstellen der Bakteriensuspension**

Die Herstellung der Bakteriensuspension besteht aus mehreren Arbeitsschritten, die sich über sieben Tage erstrecken.

1. Tag Überimpfung von der Stammkolonie in ein Anzuchtreakenzglas mit TSB (Gebrauchskultur)
3. Tag Überimpfung der Kultur von Tag 1 in zwei weitere Anzuchtreakenzgläser (TSB)
4. Tag Animpfen von 50 Anzuchtplatten (TSA)
7. Tag Abschwemmen der Anzuchtplatten für die Bakteriensuspension

An Tag 1 wurden zunächst 9 ml TSB mit zwei Kolonien des Prüforganismus von der Stammkultur (siehe 3.1.1) mit Hilfe einer sterilen Öse beimpft und anschließend bei  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  für 48 h bebrütet. Nach 48 h wurde aus dieser Gebrauchskultur jeweils 0,1 µl in zwei TSB-Röhrchen à 9 ml überimpft und für weitere 24 h bei  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  bebrütet. Von einer dieser bebrüteten Bouillon wurde dann jeweils 0,1 ml pro Anzuchtplatte auf insgesamt 50 TSA-Platten überimpft. Die anschließende Anzucht des Prüforganismus erfolgte über 72 h bei  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  im Brutschrank.

Zur Herstellung der frischen Bakteriensuspension am Versuchstag wurden die angezüchteten Bakterienrasen mit jeweils 4,5 ml einer sterilen 0,9%igen Kochsalzlösung von den Anzuchtplatten abgespatelt. Anschließend wurde der Überstand in Zentrifugenröhrchen pipettiert und bei 3000 Umdrehungen pro Minute für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment in 10 ml einer sterilen 0,9%igen Natriumchlorid-Lösung aufgenommen und resuspendiert. Dieser Arbeitsschritt ist zweimal wiederholt worden. Nach der dritten Zentrifugation wurde das Bakteriensediment in steriler 0,9%igen Natriumchlorid-Lösung aufgenommen und in einem sterilen Becherglas mit Glasperlen 30 min auf dem Schüttler bei 200 Umdrehungen pro Minute homogenisiert. Die Menge der sterilen 0,9%igen Natriumchlorid-Lösung war abhängig von der Anzahl der Prüfkörper, die kontaminiert werden

sollten. Bei fünf Prüfkörpern wurde in 8,5 ml 0,9%iger Natriumchlorid-Lösung resuspendiert, bei drei Prüfkörpern mit 6,5 ml 0,9%iger Natriumchlorid-Lösung resuspendiert. Bei den Versuchen zum Überlebensverhalten von *E. faecium* bei Ultraschall wurde ebenfalls eine Bakteriensuspension hergestellt. Diese Bakteriensuspension wurde in der Verdünnungsstufe  $10^{-4}$  verwendet und jeweils 9 ml in Reagenzröhrchen gefüllt, um diese anschließend dem Ultraschall auszusetzen.

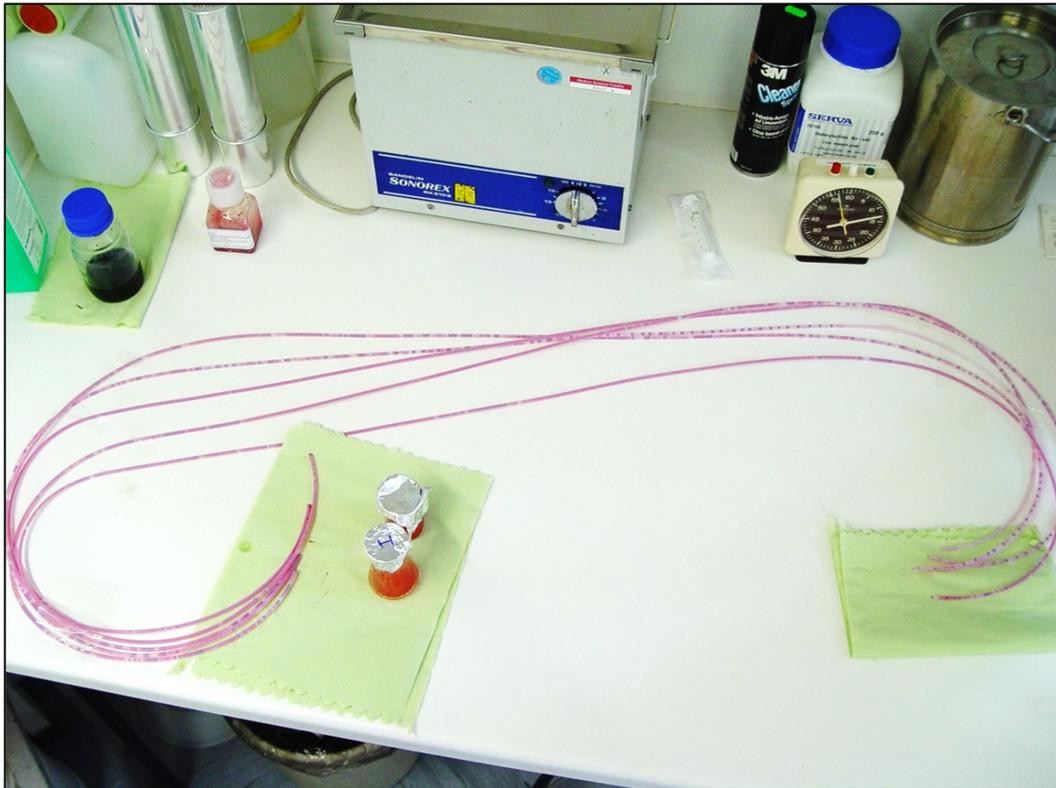
Die Bakteriensuspension wurde zu jedem Versuchstag frisch hergestellt und zwischen den Versuchen innerhalb eines Tages im Kühlschrank bei  $4 \pm 1^\circ\text{C}$  aufbewahrt und innerhalb von 5 h verwendet.

### 3.2.2 Kontamination der Prüfkörper

Pro Versuchsdurchlauf wurden je nach Versuchsreihe fünf oder drei Prüfkörper mit der Prüfanschmutzung kontaminiert. Dabei wurden jeweils 10 ml der Prüfanschmutzung mit einer 10 ml-Einmalspritze durch den Prüfkörper gespritzt. Anschließend wurde, mit derselben Spritze, zweimal 10 ml Raumluft durch den Prüfkörper gedrückt. Die Luft wurde dabei so durch den Prüfkörper gedrückt, dass Blutropfen von mehr als 10 cm Länge vermieden wurden (siehe Abbildung 1) [47]. Anschließend wurden die Prüfkörper ausgestreckt eine Stunde lang in horizontaler Lage bei Raumtemperatur inkubiert (siehe Abbildung 2).



Abbildung 1: Detailaufnahme von fünf mit Prüfanschmutzung kontaminierten Prüfkörpern nach dem Durchdrücken von Raumluft



**Abbildung 2: Fünf mit Prüfanschmutzung kontaminierte Prüfkörper in waagerechter Lagerung zur Inkubation über eine Stunde**

### **3.2.3 Versuchsreihe „Spüllösungen“**

Bei dieser Versuchsreihe wurden pro Versuch fünf Prüfkörper kontaminiert. Es kamen die fünf verschiedenen sterilen Spüllösungen, siehe 3.1.4, zum Einsatz. Es wurden jeweils 50 ml der jeweiligen Spüllösung in eine 50 ml-Einmalspritze aufgezogen. Für jede Spüllösung wurde immer eine neue Einmalspritze verwendet. Auf diese Spritze wurde eine Eurotips-Spitze aufgesetzt, diese dann an den Anfang des Prüfkörpers gesteckt und die Spüllösung gleichmäßig durch den kontaminierten Prüfkörper gedrückt.

Die Richtung, in die gespült wurde, entsprach der Richtung der Kontamination. Danach wurde zweimal mit jeweils 50 ml Raumluft nachgedrückt. Das Spüleluat wurde in sterilen 50 ml Bechergläsern mit Glasperlen aufgefangen und für die weiteren Verarbeitungsschritte bereitgestellt. Für jeden Prüfkörper wurde eine neue Spitze auf die jeweilige Spritze gesetzt. Die aufgefangenen Spüleluate wurden, wie in 3.3 weiterverarbeitet.

### 3.2.4 Versuchsreihe „Spülmethoden“

Bei dieser Versuchsreihe wurden pro Versuch fünf Prüfkörper kontaminiert. Es wurde mit fünf verschiedenen Methoden gespült und die Spüllösung war immer eine 0,9%ige Natriumchlorid-Lösung.

- I. Einmal 50 ml Spüllösung manuell
- II. Einmal 20 ml Spüllösung manuell und anschließend viermalige Aspiration der Spüllösung
- III-1 bis III-5. Fünfmal einzeln 10 ml Spüllösung in Folge - insgesamt 50 ml manuell
- IV. 50 ml Spüllösung mit dem Infusomaten® (50 ml / 3,33 min)
- V. 50 ml Spüllösung mit der Sogpumpe

Aufgefangen wurden die Spüeluat der Spülmethode I bis III-5 in Bechergläsern mit Glasperlen, bei Spülmethode IV in einem Messzylinder und bei Spülmethode V in einem Erlenmeyerkolben, an den die Sogpumpe angeschlossen wurde.

Bei Spülmethode I wurde mit 50 ml Spüllösung gespült und anschließend zweimal mit 50 ml Raumluft mit derselben Spritze nachgedrückt. Bei Spülmethode II wurden 20 ml der Spüllösung verwendet und nach dem ersten Durchspülen diese viermal aus dem Becherglas in die bereits aufgesetzte Spritze aspiriert und erneut durchgedrückt. Abschließend wurde mit 20 ml Raumluft mit derselben Spritze nachgedrückt. Spülmethode III bestand aus fünf Einzelspülungen mit jeweils 10 ml Spüllösung und anschließendem Nachdrücken mit derselben Spritze von jeweils 10 ml Raumluft. Bei dieser Spülmethode wurden die fünf Eluate (jeweils 10 ml) in fünf separaten Bechergläsern aufgefangen und anschließend auch getrennt voneinander unter Beachtung der Reihenfolge aufgearbeitet.

Bei der Spülmethode IV kam eine Pumpe mit einem kontinuierlichen Druck von 50 ml / 3,33 min zum Einsatz. Diese Pumpe wurde über einen 3 cm langen elastischen Polyethylen-Schlauch (Durchmesser 2 mm) an den Schlauchprüfkörper angeschlossen. Dann wurde die Pumpe eingeschaltet und das Eluat in einem Messzylinder aufgefangen. Waren 50 ml im Messzylinder, wurde der Pumpvorgang manuell gestoppt. Es erfolgte kein Nachdrücken mit Raumluft.

Die Richtung der Spülung verlief bei den Spülmethoden I-IV in dieselbe Richtung wie bei der vorher durchgeführten Kontamination. Die Spülmethode V erfolgte mit einer

Sogpumpe. Diese Pumpe wurde über einen dicht schließenden Stopfen auf einen Erlenmeyerkolben aufgesetzt. In diesen Stopfen mündete das Ende des zu spülenden kontaminierten Schlauchprüfkörpers. An den Anfang des Prüfkörpers wurde eine mit 50 ml gefüllte Spritze mit Aufsatzspitze gesteckt, damit aber nicht aktiv gespült. Dann wurde die Sogpumpe eingeschaltet und diese sog, bis die aufgesetzte gefüllte Spritze und der Prüfkörper frei von der Spüllösung waren. Die Richtung der Spülung bei dieser Methode verlief konstruktionsbedingt entgegengesetzt zur Richtung bei der Kontamination. Die aufgefangenen Spüleluate wurden wie in 3.3 weiterverarbeitet.

### 3.2.5 Versuchsreihe „Eindringen von Ultraschall in die Schlauchprüfkörper“

Bei der Versuchsreihe zur Untersuchung zum Eindringen von Ultraschall in die Schlauchprüfkörper wurden acht 150 mm lange PTFE-Prüfkörperstücke, sechs mit 2 mm Durchmesser und zwei mit 4 mm Durchmesser, mit handelsüblicher Aluminiumfolie bestückt. Die Größe der Prüfkörperstücke von 150 mm wurde in Anlehnung an die DIN prEN ISO 15883-4 aus dem Jahr 2009 gewählt, wo erstmalig diese Prüfkörperteilstücke Erwähnung finden [47b]. Die Aluminiumfolienstreifen waren 120 mm lang und 1,8 bzw. 3,8 mm breit, je nach PTFE-Schlauchdurchmesser. Anschließend wurden die Prüfkörperstücke mit vollentsalztem Wasser (VE-Wasser) befüllt und an beiden Enden mit Combi-Stopper-Verschlußkonusen verschlossen. Das Ultraschallgerät wurde mit VE-Wasser gefüllt und 10 min entgast. Anschließend wurden die präparierten Prüfkörperstücke in den Einhängkorb gelegt und in das Ultraschallbad gesetzt. Die Prüfkörperstücke wurden unterschiedlichen Ultraschallzeiten ausgesetzt, ersichtlich in Tabelle 9.

**Tabelle 9: Übersicht zur Ultraschallbehandlungszeit der präparierten PTFE-Prüfkörperstücke 2 mm und 4 mm im Durchmesser.**

Ultraschallzeit	2 mm Durchmesser	4 mm Durchmesser
2 Minuten	2 Prüfkörperstücke	nicht durchgeführt
5 Minuten	2 Prüfkörperstücke	1 Prüfkörperstück
10 Minuten	2 Prüfkörperstücke	1 Prüfkörperstück

Die Ergebnisse wurden fotografisch dokumentiert. Die Auswertung erfolgte mittels visueller Kriterien bezugnehmend auf den Zerfall der Aluminiumstreifen, wie in Tabelle 10 aufgeführt.

**Tabelle 10: Skaleneinteilung zur visuellen Beurteilung des Aluminiumzerfalls in den Prüfkörpern**

Zerfalls-grad	Zerfall	Beschreibung
0	Kein Zerfall	Keine Zerstörung der Aluminiumstreifen erkennbar
1	Wenig Zerfall	Mehrere große Stücke der Aluminiumstreifen erkennbar
2	Mittlerer Zerfall	Kleine Stücke von Aluminiumfolie und wenige Krümel erkennbar
3	Starker Zerfall	Nur noch Krümel und nur vereinzelt kleinste Stückchen der Aluminiumfolie erkennbar

### **3.2.6 Versuchsreihe „Untersuchung des Überlebensverhaltens von *Enterococcus faecium* bei Ultraschall“**

Es wurden Untersuchungen zum Überlebensverhalten von *E. faecium* bei Ultraschall durchgeführt. Hierzu wurde das Ultraschallbad mit VE-Wasser gefüllt und anschließend für 10 Minuten zur Entgasung in Betrieb genommen. Zum Einstellen der Reagenzröhrchen wurde ein eigens konstruiertes Drahtgestell benutzt, um ein Verrutschen oder Umkippen der Reagenzröhrchen während der Versuchszeit zu verhindern. Dieses Drahtgestell wurde an dem Einhängkorb befestigt.

Die mit verdünnter Bakteriensuspension, wie unter 3.2.1 beschrieben, gefüllten Reagenzröhrchen wurden mit einem Deckel verschlossen und in das Ultraschallgerät eingestellt. Zwei Reagenzröhrchen dienten als Kontrolle und wurden keiner Ultraschallbehandlung unterzogen. Die übrigen erhielten eine Ultraschallbehandlung unterschiedlicher Dauer.

Jeweils zwei der Reagenzröhrchen wurden nach 1 Minute, nach 2 Minuten, nach 3 Minuten, nach 5 Minuten, nach 10 Minuten, nach 15 Minuten und nach 20 Minuten aus dem Ultraschallbad entnommen. Die einzelnen verdünnten Bakteriensuspensionen aller gefüllten Reagenzröhrchen wurden anschließend einzeln membranfiltriert und die Membranfilter anschließend auf KAA-Agarplatten ausgebracht. Vor und nach dem Versuch wurde die Temperatur des VE-Wassers im Ultraschallgerät gemessen und protokolliert.

### **3.2.7 Versuchsreihe „Behandlung der Prüfkörper mit Ultraschall“**

Bei dieser Versuchsreihe wurden pro Versuchsdurchlauf drei Prüfkörper mit der Prüfanschmutzung kontaminiert. Vor dem Einlegen der Prüfkörper wurde das Ultraschallgerät mit VE-Wasser gefüllt und für 10 Minuten in Betrieb genommen. Für die

Ultraschallbehandlung wurden zwei der Prüfkörper an den Enden mit jeweils einem Combi-Stopper-Verschlusskonus - Luer-Lock<sup>®</sup> verschlossen und in den Einhängkorb gelegt. Dabei wurden die 200 cm langen Prüfkörper waagrecht im Einhängkorb aufgerollt. Ein Prüfkörper pro Versuchsdurchlauf diente als Kontrolle und wurde während der Ultraschallbehandlung der anderen Prüfkörper waagrecht bei Raumtemperatur gelagert. Die Ultraschalldauer betrug 10 Minuten. Nach dem Ultraschall wurden die Prüfkörper gespült und das Eluat in Bechergläsern mit Glasperlen aufgefangen. Gespült wurde manuell mit einmal 50 ml 0,9%iger Natriumchlorid-Lösung und anschließend zweimal mit jeweils 50 ml Raumluft nachgedrückt. Das Spüluat wurde in 50 ml Bechergläsern mit Glasperlen aufgefangen und für die weitere Aufbereitung bereitgestellt.

### 3.3 Materialaufarbeitung und Auswertung

#### 3.3.1 Bestimmung der Kolonienzahl

Die Kolonienzahlen wurden von den Bakteriensuspensionen, den Prüfanschmutzungen und den Spüeluaten der Prüfkörper bestimmt. Dazu wurden Verdünnungsreihen in jeweils 9 ml 0,9%iger Natriumchlorid-Lösung angelegt. Tabelle 11 gibt Aufschluss darüber, welches hergestellte oder zurückgewonnene Material bis zu welcher Verdünnungsstufe verdünnt wurde.

**Tabelle 11: Verdünnungsstufen der Bakteriensuspensionen, Prüfanschmutzungen und Spüeluat zur anschließenden Weiterverarbeitung**

Verdünnungsreihe von	Verdünnungsstufe
Bakteriensuspension	10 <sup>-9</sup>
Prüfanschmutzung	10 <sup>-7</sup>
Spüeluat der Prüfkörper	10 <sup>-5</sup>
Bakteriensuspension für Ultraschallversuch	10 <sup>-4</sup>

Von den drei jeweils höchsten Verdünnungsstufen der Bakteriensuspensionen und von den Prüfanschmutzungen wurden in Doppelbestimmung mit dem Spiralometer 0,092 ml auf KAA-Agarplatten aufgetragen. Von den Spüeluaten wurden die vier höchsten Verdünnungsstufen in gleicher Weise auf KAA-Agarplatten aufgetragen. Im Anschluss folgte die Inkubation der Kulturplatten für 24 h im Brutschrank bei 36 ± 1 °C.

Bei der Versuchsreihe „Überlebensverhalten von *E. faecium* bei Ultraschall“ wurden die Membranfilter auf KAA-Agarplatten ausgelegt und für 24 h bei 36 °C ± 1 °C bebrütet.

Ausgezählt und protokolliert wurden die koloniebildenden Einheiten pro KAA-Agarplatte bzw. pro Membranfilter.

Die Auszählung und Dokumentation erfolgte am nächsten Tag makroskopisch mit dem menschlichen Auge. Die Anzahl der Kolonien bei stark bewachsenen Kulturplatten wurde mit Hilfe von Auszählgebieten bestimmt. War eine Auszählung durch zu dichte Bewachsung der Kulturplatte nicht mehr möglich, so wurde diese als nicht zählbar dokumentiert. Alle Ergebnisse der zählbaren Kulturplatten wurden in koloniebildenden Einheiten (KBE) pro Kulturplatte dokumentiert. Für jede angelegte Verdünnungsreihe konnten so bis zu acht Einzelwerte bestimmt werden. Aus diesen wurde dann in der Auswertung ein Mittelwert bestimmt.

### **3.3.2 Nachweisgrenze des Verfahrens**

Die untere Nachweisgrenze des Oberflächenkulturverfahrens wurde entsprechend den Angaben des Geräteherstellers (Fa. Spiral System) auf sechs KBE pro 0,092 ml festgelegt. Somit wurden bei der Berechnung der KBE/ml erst Kolonienzahlen größer als 6 KBE pro Agarplatte berücksichtigt.

### **3.3.3 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistik-Programm SPSS unter der Verwendung der explorativen Datenanalyse und von nicht-parametrischen Test wie dem Mann-Whitney-Test und dem Kruskal-Wallis-Test. Zur graphischen Darstellung wurden die Boxplotdarstellung und das Punktehistogramm verwendet.

Jede einzelne Versuchsreihe wurde unabhängig von den anderen Versuchsreihen ausgewertet.

## 4. ERGEBNISSE

### 4.1 Versuchsbegleitende Parameter

#### 4.1.1 Blutgerinnung

Um die Gerinnung des Schafblutes nach Zugabe von Protamin in Übereinstimmung in der von Spicher und Peters [53] beschriebenen Zeit von ca. 15 min sicherzustellen, wurde die Bestimmung der Blutgerinnungszeit jeder Versuchreihe mit Verwendung einer Prüfanschmutzung vorangestellt und die Blutgerinnung somit kontinuierlich bestimmt und dokumentiert.

Die Gerinnungsfähigkeit wurde in insgesamt 26 Fällen (n = 26) überprüft. Nachdem Blut und Protamin in einem 50 ml Erlenmeyerkolben mit Weithals gemischt wurden, dauerte es bis zur Gerinnung im Mittel 12 Minuten und 30 Sekunden (siehe Tabelle 12).

**Tabelle 12: Mittelwerte, Mediane, der Standardabweichungen (SD), Minima und Maxima der Gerinnungszeit des Schafblutes bei allen verwendeten Prüfanschmutzungen**

	Mittelwert	Median	SD	Minimum	Maximum
Blutgerinnung	12,5 min	11 min	3,4 min	9 min	25 min

#### 4.1.2 Konzentration des Prüforganismus in der Prüfanschmutzung

Tabelle 13 gibt einen Überblick über die Konzentrationen in KBE/ml der Prüfanschmutzungen der jeweiligen Versuchsreihen und in der Gesamtheit aller Versuche.

Bei den Versuchsreihen „Spülmittel“, „Spülmethode“ und „Behandlung“ der Prüfkörper mit Ultraschall wurde insgesamt 29 mal (n = 29) eine Prüfanschmutzung hergestellt. Davon entfallen zwölf hergestellte Prüfanschmutzungen auf die Versuchsreihe „Spülmittel“ (n = 12), neun auf die Versuchsreihe „Spülmethode“ (n = 9) und acht Prüfanschmutzungen wurden für die Versuchsreihe „Behandlung mit Ultraschall“ hergestellt (n = 8).

**Tabelle 13: Konzentrationen der Prüfanschmutzungen in log KBE/ml insgesamt und aufgeteilt in die drei Versuchsreihen „Spülmittel“, „Spülmethode“ und „Behandlung mit Ultraschall“**

Versuchsart	log <sub>10</sub> KBE/ml					n
	Mittelwert	Median	Standard- abweichung	Minimum	Maximum	
Spülmittel	7,75	7,82	0,452	6,63	8,64	12
Spülmethode	8,10	8,09	0,128	7,90	8,34	9
Ultraschall	8,06	8,04	0,171	7,81	8,34	8
Gesamt	7,95	7,93	0,346			29

Die Konzentration der Prüfanschmutzungen lag im Mittel bei 7,95 log<sub>10</sub> KBE/ml und im Median bei 7,93 log<sub>10</sub> KBE/ml. Bei den Prüfanschmutzungen der Versuchsreihe „Spülmittel“ liegen das Minimum mit 6,63 log<sub>10</sub> KBE/ml und das Maximum von 8,64 log<sub>10</sub> KBE/ml im Vergleich zu den Versuchsreihen „Spülmethode“ und „Behandlung mit Ultraschall“ am weitesten auseinander.

## 4.2 Versuchsreihe „Spülmittel“

Bei dieser Versuchsreihe wurde untersucht, ob die Art des eingesetzten Spülmittels einen Einfluss auf die Höhe der Rückgewinnung des Prüforganismus *E. faecium* aus den kontaminierten Schlauchprüfkörpern hat.

Es erfolgten insgesamt 60 Spüldurchgänge, dabei umfassten die fünf verschiedenen Spülmittel jeweils zwölf Spüldurchgänge. Die fünf verschiedenen Spülmittel sind I NaCl 0,9%ig, II NaCl 0,9%ig mit Tween, III TSB, IV TSB mit Enthemmer und V 1%ige SDS-Lösung. Statistisch ausgewertet wurden die logarithmierten Konzentrationen in KBE/ml der einzelnen Spüleluate in Abhängigkeit vom eingesetzten Spülmittel.

Tabelle 14 zeigt die Mittelwerte, Mediane, Standardabweichungen, Minima und Maxima der logarithmierten absoluten Konzentrationen der Spüleluate der fünf verschiedenen Spülmittel. Da bei Spülmittel V (SDS) kein Bakterienwachstum zu verzeichnen war, konnten auch keine Werte bestimmt werden. Die Mediane der übrigen gewonnenen Werte liegen zwischen 6,41 log<sub>10</sub> KBE/ml und 6,68 log<sub>10</sub> KBE/ml. Die Mediane schwanken somit um maximal 0,27 log<sub>10</sub>-Stufen. Das Maximum liegt bei 7,81 log<sub>10</sub> KBE/ml bei Spülmittel II und das Minimum bei Spülmittel III mit 5,54 log<sub>10</sub> KBE/ml.

**Tabelle 14: Mittelwerte, Standardabweichungen (SD), Mediane, Minima und Maxima der Rückgewinnung in log<sub>10</sub> KBE/ml der fünf verschiedenen Spülmittel**

Spülmittel	log <sub>10</sub> KBE/ml					n
	Mittelwert	Median	SD	Minimum	Maximum	
I	6,61	6,68	0,643	5,78	7,73	12
II	6,70	6,63	0,751	5,81	7,81	12
III	6,48	6,41	0,655	5,54	7,59	12
IV	6,54	6,50	0,628	5,88	7,79	12
V	-	-	-	-	-	12

Der Kruskal-Wallis-Test mit allen fünf Spülmitteln ergab einen hoch-signifikanten Unterschied innerhalb der unabhängigen Stichproben ( $p < 0,001$ ). Dieser bezeichnende Unterschied folgt aus der Tatsache, dass bei den Versuchen mit dem Spülmittel V (SDS) alle Bakterien abgestorben waren. Daher wurden aus methodischen Gründen bei den folgenden statistischen Betrachtungen die Werte der Versuche mit Spülmittel V ausgeschlossen.

Beim erneuten Kruskal-Wallis-Test mit den verbleibenden Spülmitteln in Bezug auf die absoluten Rückgewinnungsraten ergab sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Rückgewinnung zwischen den Spülmitteln I bis IV ( $p = 0,811$ ).

Die Konzentration des Prüforganismus *E. faecium* in der Prüfanschmutzung lag bei der Versuchsreihe Spüllösung im Bereich von 2 log-Stufen (6,63 log<sub>10</sub> KBE/ml bis 8,64 log<sub>10</sub> KBE/ml), ersichtlich in Tabelle 14.

Aufgrund des Unterschiedes der Ausgangskonzentration von 2 log-Stufen wurde zur besseren statistischen Vergleichbarkeit die Rest-Prüfkörper-Konzentration für jeden einzelnen Prüfkörper bestimmt.

Die Rest-Prüfkörper-Konzentration ist die Konzentration in KBE/ml der theoretisch im Prüfkörper verbliebenen Prüfanschmutzung in KBE/ml nach der Elution des Prüfkörpers.

Formel: 
$$C_{RPK} = C_1 - C_2$$

wobei:  $C_{RPK} \triangleq$  Rest-Prüfkörper-Konzentration in KBE/ml

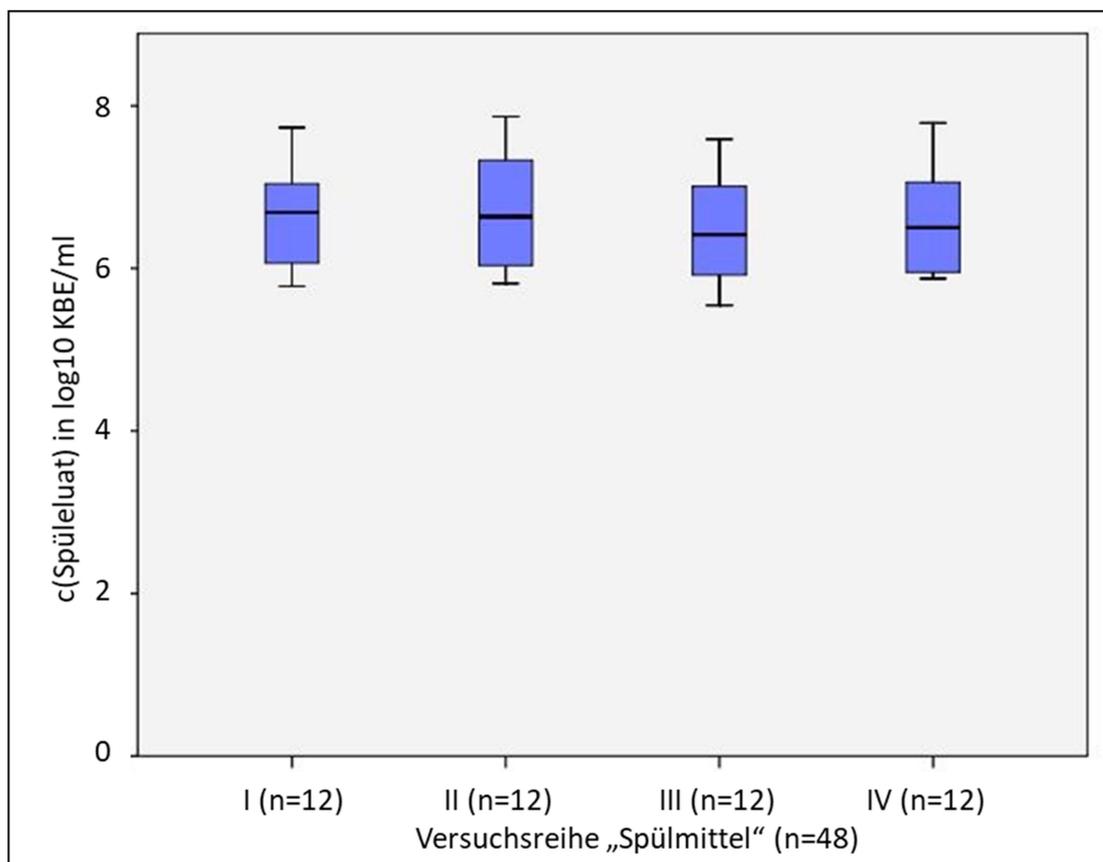
$C_1 \triangleq$  Konzentration der Prüfanschmutzung in KBE/ml

$C_2 \triangleq$  Konzentration des Spülluats in KBE/ml

Beim erneuten Kruskal-Wallis-Test der Rest-Prüfkörper-Konzentration zwischen den Spülmitteln I bis IV ergab sich kein signifikanter Unterschied ( $p = 0,994$ ).

Da der prozentuale Anteil der Konzentration der Spüleluate an der Konzentration der Prüfanschmutzung zwischen 1 bis 3,2 % liegt und es bei einer Konzentrationschwankung der Prüfanschmutzung von 2 log-Stufen keinen signifikanten Unterschied gibt, wurden bei den folgenden Berechnungen die absoluten Konzentrationen der Spüleluate verglichen, ohne die Rest-Prüfkörper-Konzentration zu bestimmen.

Abbildung 3 zeigt die logarithmierten absoluten Konzentrationen der Rückgewinnung der einzelnen Spüleluate in  $\log_{10}$  KBE/ml der Spüllösungen I bis IV. Es liegen keine Ausreißer oder Extremwerte vor.



**Abbildung 3:** Logarithmierte absolute Konzentrationen der Rückgewinnung nach Verwendung der Spülmittel I bis IV (I NaCl 0,9%ig, II NaCl 0,9%ig mit Tween, III TSB und IV TSB mit Enthemmern)

Es waren keine Unterschiede zwischen NaCl 0,9%, NaCl 0,9% mit Tween, TSB und TSB mit Enthemmern bestimmbar, daher wurden die folgenden Versuche mit 0,9%iger Natriumchlorid-Lösung durchgeführt, was mit guter Praktikabilität und Kosteneffizienz verbunden ist.

### 4.3 Versuchsreihe „Spülmethode“

Bei dieser Versuchsreihe wurde untersucht, ob die Methode des Spülens der Schlauchprüfkörper einen Einfluss auf die Rückgewinnung des Prüforganismus *E. faecium* aus den kontaminierten Prüfkörpern hat. Bei der Versuchsreihe „Spülmethode“ wurde in allen Fällen mit 0,9%iger Natriumchlorid-Lösung gespült.

Zunächst wurde manuell mit 50 ml gespült, dann manuell mit 20 ml und viermaliger Aspiration des Eluats. Bei Spülmethode III-1 bis III-5 wurde manuell mit 10 ml in fünf aufeinander folgenden Einzelspülungen gespült. Bei der Spülmethode IV und Spülmethode V wurde mit zwei unterschiedlichen Pumpensystemen jeweils mit 50 ml gespült. Es erfolgten insgesamt 81 Spüldurchgänge, dabei entfielen auf die neun verschiedenen Spülmethoden jeweils neun Spüldurchgänge.

**Tabelle 15: Mittelwerte, Mediane, Standardabweichungen (SD), Minima, Maxima und der Schiefe der logarithmierten absoluten Konzentrationen der Rückgewinnung beim Einsatz verschiedener Spülmethoden**

Spülmethode	log <sub>10</sub> KBE/ml					Schiefe	n
	Mittelwert	Median	SD	Minimum	Maximum		
I	6,38	6,43	0,351	5,88	6,81	-0,121	9
II	6,25	6,35	0,332	6,19	7,05	0,465	9
III-1	6,12	5,97	0,317	5,81	6,77	1,124	9
III-2	4,72	4,83	0,451	4,06	5,29	-0,299	9
III-3	4,73	4,81	0,338	4,20	5,18	-0,334	9
III-4	4,62	4,55	0,515	4,00	5,35	-0,096	9
III-5	4,45	4,37	0,482	3,93	5,18	0,517	9
∑ (III)	6,89	6,72	0,306	6,56	7,51	1,074	-
IV	5,89	5,72	0,346	5,54	6,57	0,915	9
V	6,47	6,43	0,43	6,03	7,11	0,472	9

Statistisch ausgewertet wurden die absoluten logarithmierten Konzentrationen der Rückgewinnung der einzelnen Spüleluate in Abhängigkeit von der verwendeten Spülmethode (siehe Tabelle 15).

Die Mediane der Gesamtkonzentrationen der Rückgewinnung von Spülmethode III-1 im Vergleich zu den Spülmethoden III-2 bis III-5 variieren um 2 log<sub>10</sub>-Stufen. Das Minimum bei den Einzelwerten lag bei 3,93 log<sub>10</sub> KBE/ml für Spülmethode III-5 und das Maximum bei 7,11 log<sub>10</sub> KBE/ml für Spülmethode V. Die Summe der Rückgewinnung der Spülmethoden III-1 bis III-5 lag im Median bei 6,72 log<sub>10</sub> KBE/ml, mit einem Maximum

von 7,51 log<sub>10</sub> KBE/ml und einem Minimum von 6,56 log<sub>10</sub> KBE/ml. Bei allen Werten liegen der Median und der Mittelwert dicht beieinander.

**Tabelle 16: Ausgewählte Signifikanzniveaus (p-Werte) errechnet mit dem Kruskal-Wallis-Test und dem Mann-Whitney-Test für die Spülmethoden I bis V, zeilenweise grau unterlegt sind die Spülmethoden, die statistisch miteinander verglichen wurden**

p-Werte der Spülmethoden									
I	II	III-1	III-2	III-3	III-4	III-5	∑ III	IV	V
p = 0,066									
		p < 0,001							
			p = 0,59						
		p < 0,001							
								p = 0,015	
							p = 0,012		
									p > 0,6

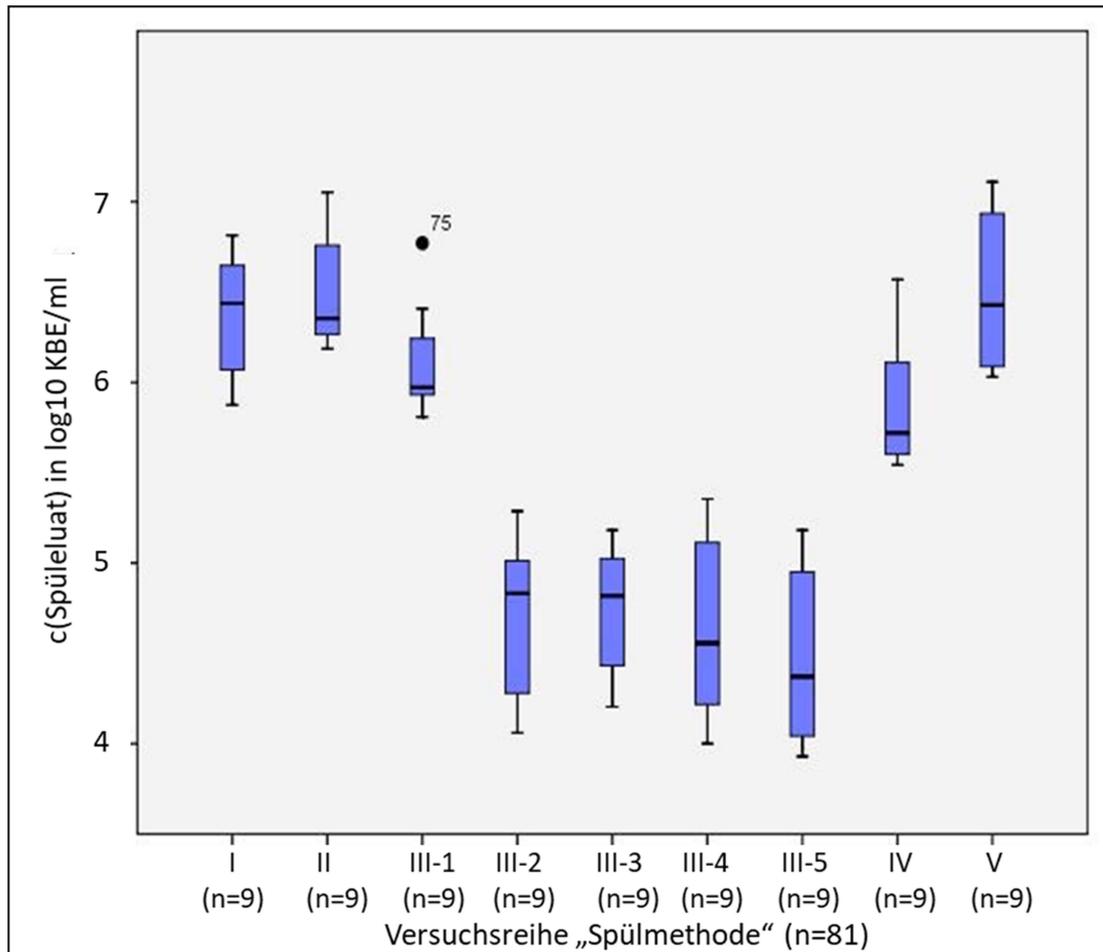
Der Kruskal-Wallis-Test für die Rückgewinnung bei den Spülmethoden I bis III-1 ergab keinen signifikanten Unterschied ( $p = 0,066$ ) (siehe Tabelle 16). Der Kruskal-Wallis-Test zwischen den Spülmethoden III-1 bis III-5 ergab einen p-Wert von  $< 0,001$ , d. h., es liegt ein signifikanter Unterschied vor. Der Kruskal-Wallis-Test der Spülmethoden III-2 bis III-5 ergab keinen signifikanten Unterschied ( $p=0,59$ ). Der Vergleich der Spülmethode III-1 und III-2 ergab einen hochsignifikanten Unterschied ( $p < 0,001$ ) mit dem Mann-Whitney-Test.

Die logarithmierte Summe der Rückgewinnung bei den Spülmethoden III-1 bis III-5 ergab im Mann-Whitney-Test mit Spülmethode I einen signifikanten Unterschied ( $p = 0,012$ ) zu den nachfolgenden 10 ml-Spülungen.

Der Vergleich der zwei verschiedenen Pumpensysteme mit dem Mann-Whitney-Test ergab einen signifikanten Unterschied ( $p = 0,015$ ) zugunsten der Sogpumpe. Die Sogpumpen-Spülung im Vergleich zur manuellen Spülmethode I ergab im direkten statistischen Vergleich jedoch keinen signifikanten Unterschied ( $p > 0,6$ ).

Abbildung 4 zeigt die logarithmierten absoluten Konzentrationen der Rückgewinnung in KBE/ml der Spülmethoden I bis V einschließlich der fünf 10 ml-Spülungen

(Spülmethode III-1 bis III-5). Es gibt einen Ausreißer bei Spülmethode III-1, sonst liegen keine Extremwerte oder weitere Ausreißer vor.



**Abbildung 4:** Logarithmierte absolute Konzentrationen der Rückgewinnung in KBE/ml der Spüleluate der Spülmethoden I bis V ( I =50 ml , II=20 ml viermal aspiriert, III-1 bis III-5 jeweils 10 ml hintereinander, IV = Infusomat®, V = Sogpumpe)

Abbildung 5 zeigt die logarithmierten absoluten Konzentrationen der Rückgewinnung der Spülmethode I in KBE/ml und die Summe der Spüleluate der Spülmethode III-1 bis III-5 in KBE/ml. Es gibt keinen Ausreißer und keine Extremwerte.

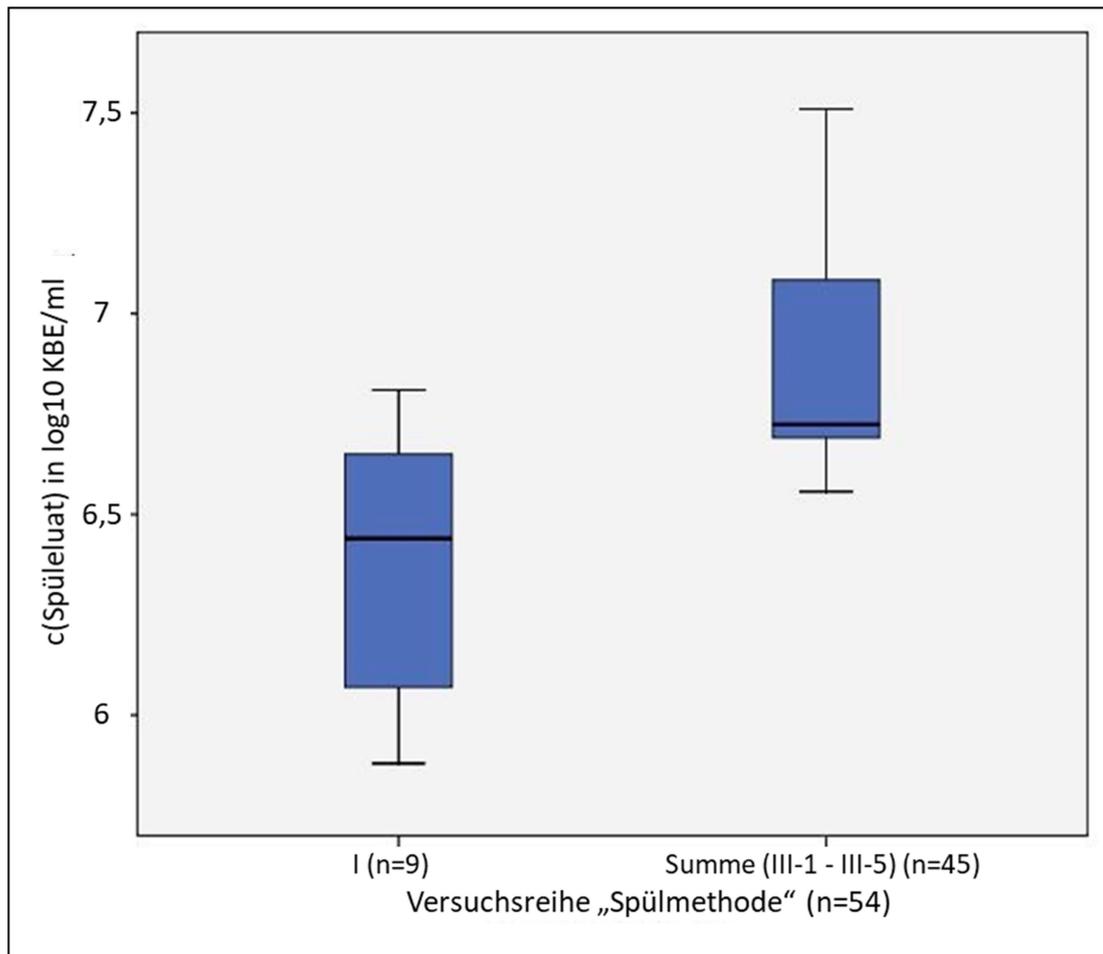


Abbildung 5: Logarithmierte absolute Konzentrationen der Rückgewinnung in KBE/ml der Spülluft der Spülmethode I und die Summe aus III-1 bis III-5

#### 4.4 Versuchsreihe „Eindringen von Ultraschall in die Prüfkörper“

In dieser Versuchsreihe wurde untersucht, ob Ultraschall in die Prüfkörper eindringt und wie hoch der Zerfallsgrad der 120 mm langen Aluminiumfolienstreifen in 150 mm langen Prüfkörperteilstücken in Abhängigkeit von der Zeit ist. Zur Auswertung wurde eine optische Zerfallsgradeinteilung verwendet, ersichtlich in Tabelle 10 in 3.2.5.

Tabelle 17: Optischer Zerfallsgrad der Aluminiumfolienstreifen 120 mm x 1,8 mm bzw. 3,8 mm im Prüfkörperteilstück von 150 mm Länge mit einem Durchmesser von 2 mm und 4 mm.

Ultraschallzeit	optischer Zerfallsgrad – 2 mm	optischer Zerfallsgrad – 4 mm
2 Minuten	1	nicht durchgeführt
5 Minuten	2	2
10 Minuten	2	3

Aufgrund der Tatsache, dass die Aluminiumfolienstreifen in den Prüfkörperteilstücken unter Ultraschallbehandlung zerfallen, liegt ein Eindringen in die Prüfkörper vor. Tabelle

17 zeigt zudem eine Zunahme des Zerfallsgrades der Aluminiumfolienstreifen in den Prüfkörperteilstücken bei längerer Ultraschallbehandlung. Je größer der Durchmesser des Prüfkörperteilstückes ist, desto größer ist auch der Zerfallsgrad des Aluminiumfolienstreifens.

#### 4.5 Versuchsreihe „Überlebensverhalten von *E. faecium* bei Ultraschall“

In dieser Versuchsreihe wurde das Überleben des Prüforganismus *E. faecium* unter Ultraschallbehandlung in Abhängigkeit von der Zeit untersucht und zwar bis zu einem zeitlichen Maximum von 20 min. Der Versuch wurde zweimal mit verschiedenen Bakterien suspension an zwei unterschiedlichen Versuchstagen durchgeführt. Die Bakterien suspension wurde in Reagenzröhrchen dem Ultraschall ausgesetzt.

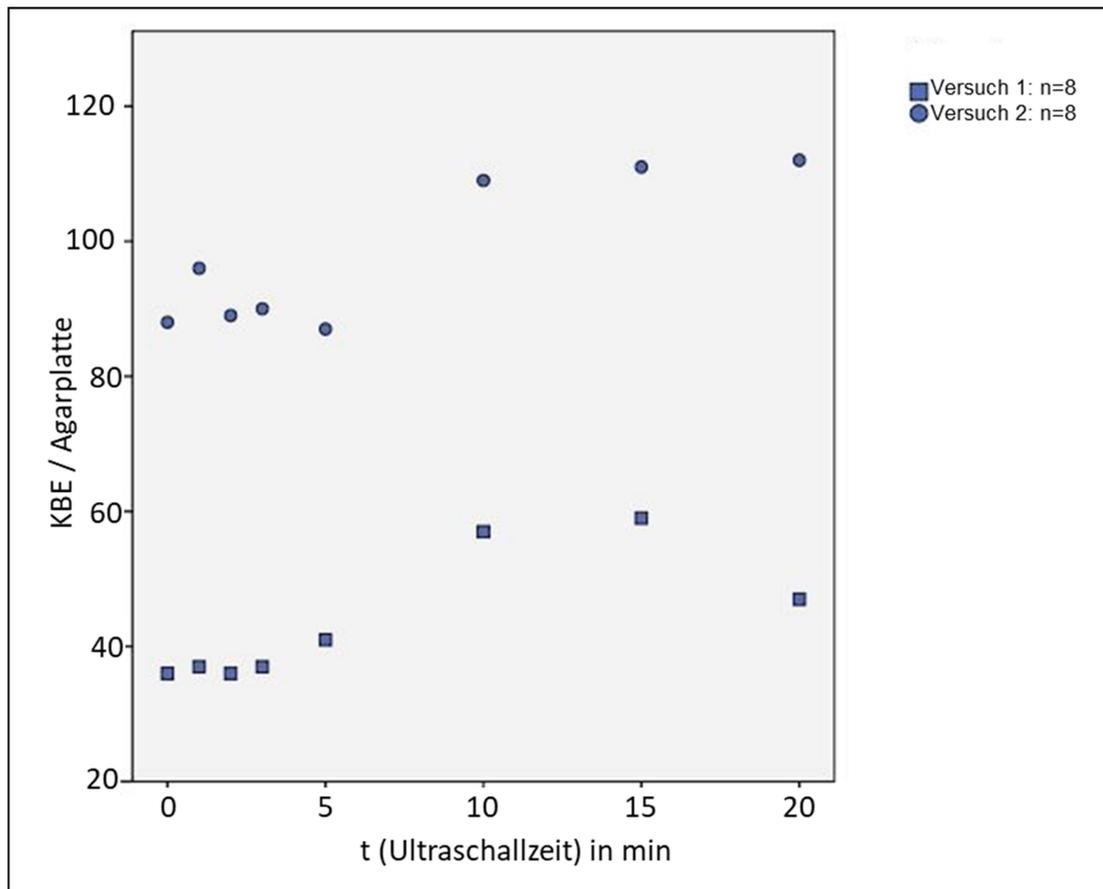


Abbildung 6: Koloniebildene Einheiten von *E. faecium* pro Agarplatte in Abhängigkeit von der Ultraschalldauer (t = 0 min, 1 min, 2 min, 3 min, 5 min, 10 min, 15 min, 20 min)

Abbildung 6 zeigt die Anzahl der koloniebildenden Einheiten pro Agarplatte nach Ultraschallbehandlung von 0 bis 20 Minuten. Ersichtlich ist bei beiden Versuchen eine

konstante Anzahl an KBE / Agarplatte in den ersten 5 Minuten. Nach 10 Minuten fällt in beiden Versuchen eine Erhöhung der KBE / Agarplatte auf , bei Versuch 1 handelt es sich um eine Erhöhung um 45% und bei Versuch 2 um 23% im Vergleich zur jeweiligen Ausgangskonzentration.

#### 4.6 Versuchsreihe „Behandlung der Prüfkörper mit Ultraschall“

Bei dieser Versuchsreihe wurde überprüft, ob eine Ultraschallbehandlung der kontaminierten Prüfkörper einen Einfluss auf die Rückgewinnung des Prüforganismus *E. faecium* aus den kontaminierten Schlauchprüfkörpern hat.

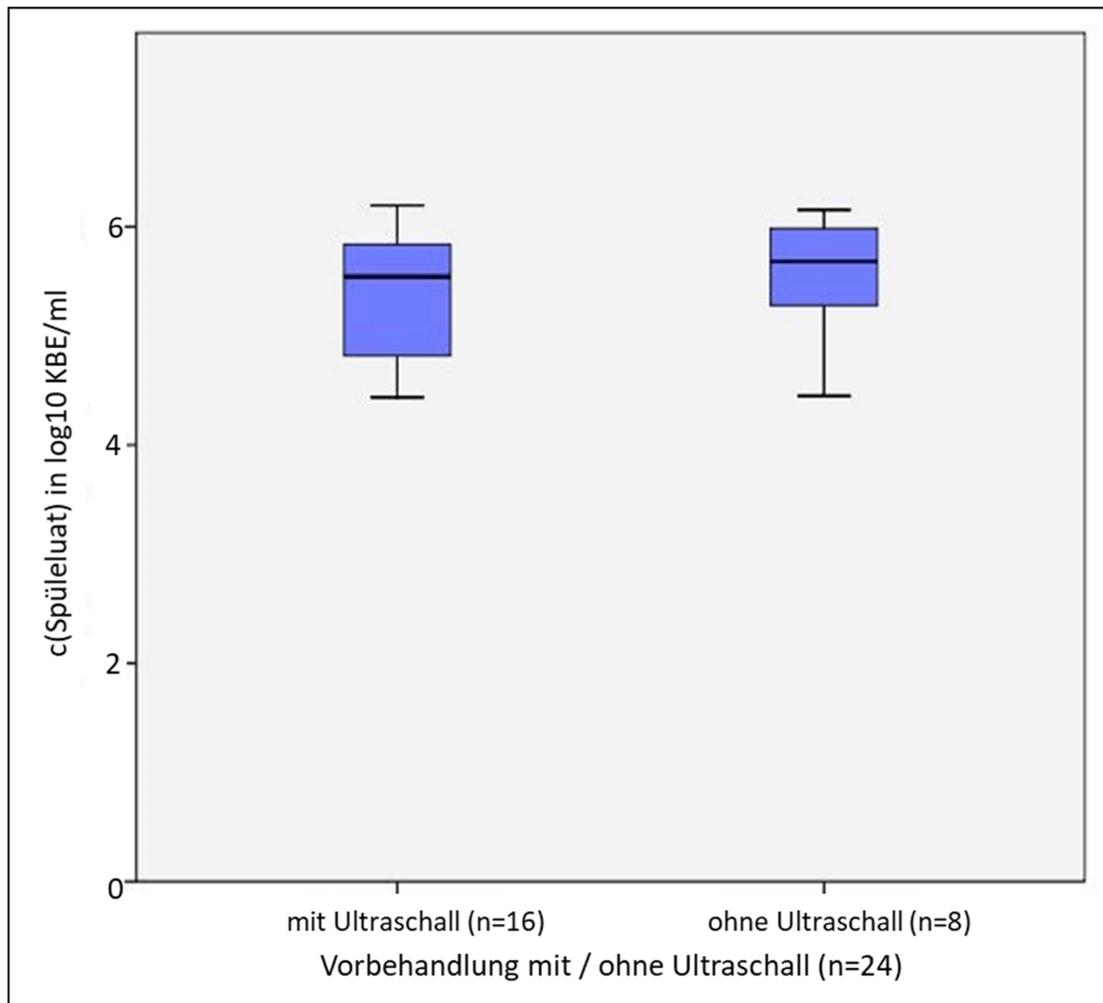
Hierzu wurden 16 der kontaminierten Schlauchprüfkörper vor dem Spülen 10 Minuten mit Ultraschall behandelt. Als Spülmethode wurde manuell einmalig mit 50 ml 0,9%iger Natriumchlorid-Lösung gespült.

Tabelle 18 zeigt die Mittelwerte, Mediane, Standardabweichungen, Minima und Maxima der logarithmierten absoluten Konzentrationen der Rückgewinnung der Spüeluete mit und ohne Ultraschallbehandlung. Die Mediane und Mittelwerte beider Gruppen liegen dicht beieinander. Das Minimum liegt bei 4,44  $\log_{10}$  KBE/ml, das Maximum bei 6,19  $\log_{10}$  KBE/ml.

**Tabelle 18: Mittelwerte, Mediane, Standardabweichungen (SD), Minima und Maxima der logarithmierten absoluten Konzentrationen der Rückgewinnung mit und ohne Ultraschallbehandlung**

Ultraschall	$\log_{10}$ KBE/ml					n
	Mittelwert	Median	SD	Minimum	Maximum	
+	5,40	5,54	0,553	4,44	6,19	16
-	5,56	5,68	0,584	4,45	6,15	8

Die statistische Betrachtung der Werte mit und ohne Ultraschallvorbehandlung mittels Mann-Whitney-Test ergab keinen signifikanten Unterschied ( $p = 0,452$ ) beider Gruppen.



**Abbildung 7: Logarithmierte Konzentrationen der Rückgewinnung der Spüleluate mit und ohne Ultraschallbehandlung**

Abbildung 7 zeigt die logarithmierten absoluten Konzentrationen der Rückgewinnung der einzelnen Spüleluate mit ( $n = 16$ ) und ohne ( $n = 8$ ) Ultraschallbehandlung. Es liegen keine Ausreißer oder Extremwerte vor. Erkennbar ist, dass eine Behandlung von 10 Minuten im Ultraschallbad keine höhere Rückgewinnung des Prüforganismus *E.faecium* bedingt.

## 5. DISKUSSION

Das Prüfmodell eines RDG-E besteht aus verschiedenen Teilprüfungen. Zum einen wird geprüft, ob der Innenraum des RDG-E gereinigt und desinfiziert werden kann. Dies ist wichtig, um Re- und Kreuzkontaminationen der Endoskope zu verhindern. Zum anderen ist es notwendig, die Funktionsweise des RDG-E mittels eines Schlauchprüfmodells in Analogie zur Aufbereitung eines Endoskops zu überprüfen. Beim Schlauchprüfmodell ist es erforderlich, die Reinigung und den Gesamtprozess (Reinigung und Desinfektion) getrennt voneinander zu untersuchen, da nur eine effektive Reinigung auch gute Desinfektionsergebnisse nach sich zieht. So vermag die beste Desinfektion im Gesamtprozess nicht ausreichen, wenn in der Reinigungsprozedur eklatante Fehler vorliegen.

Vor dem Einsatz des Schlauchprüfmodells in einem RDG-E steht die Validierung des Schlauchprüfmodells an sich. Dabei scheint das deutsche Schlauchprüfmodell nicht experimentell ermittelt zu sein, sondern in einer Arbeitsgruppe, bestehend aus führenden Hygienikern, Endoskop- und RDG-E-Herstellern und mehreren gesetzlichen Institutionen 1995 festgelegt worden zu sein [54]. Diese Festlegung beinhaltete auch den Einsatz von *E. faecium* als Prüforganismus für Verfahrenstemperaturen um 60°C, da es sich um einen hitzestabilen Prüforganismus handelt. Die Prüforganismuskonzentration in der Bakteriensuspension sollte dabei mindestens  $1 \times 10^9$  KBE/ml betragen. Als Prüfkörper dienten 200 cm lange PTFE-Schläuche mit 1,0 mm oder 2,0 mm Durchmesser. Diese wurden mit einem Blut-Bakterien-Protamin-Gemisch angeschmutzt und eine Stunde lang waagrecht gelagert. Nach Behandlung in einem „Dekontaminations- oder Desinfektionsautomaten“ wurden sie mit 50 ml Caseinpepton-Sojabohnenmehlpepton-Lösung (CLS) manuell mit einer Spritze eluiert und anschließend mittels Oberflächenkultur mögliche verbliebene Bakterien angezüchtet. Bei der Verwendung realer Endoskope wurde nach Anschmutzen und Aufbereitung der Arbeitskanal mit 50 ml CLS und für die übrigen Kanäle 10 ml CLS zur Elution verwendet. Der geforderte Reduktionsfaktor lag 1995 bei mindestens 5  $\log_{10}$ -Stufen [54]. Dies wurde 2001 revidiert und eine Reduktion von 9  $\log_{10}$  Stufen gefordert [55]. Grund hierfür waren die neuen Erkenntnisse zum tatsächlichen Bioburden von indikationsgerecht eingesetzten Endoskopen von maximal  $10^{10}$  KBE/Endoskop [3, 4, 5].

Nach dem 1995 im Konsensus festgelegten Prüfprocedere [54, 55] erfolgte im Rahmen der Versuche dieser Arbeit die systematische Überprüfung verschiedener Parameter und deren Einfluß auf die Rückgewinnung. So muss die verwendete Prüfanschmutzung, das verwendete Spülmittel und die Spülmethode validiert sein. Zudem sollte der Prüfalgorithmus in der praktischen Anwendung schnell erlernbar, kosteneffizient, praxisnah und reproduzierbar sein und die erlangten Ergebnisse sollten einfach auswertbar und untereinander vergleichbar sein.

Nachfolgend werden zunächst im Rahmen einer Methodenkritik die grundlegenden Aspekte der Prüfmethode, bestehend aus Prüfanschmutzung, PTFE-Schlauchprüfkörper und der Einsatz von Ultraschall diskutiert.

## **5.1 Methodenkritik**

### **5.1.1 Prüfanschmutzung**

Eine geeignete Prüfanschmutzung sollte als eine grundlegende Eigenschaft eine gewisse Robustheit besitzen. Lässt sich eine Prüfanschmutzung bereits durch alleiniges Spülen des Prüfkörpers mit z.B. Wasser entfernen, so stellt dies keine ausreichende Hartnäckigkeit dar. Gleiches gilt, wenn bereits durch ein Beprobieren der Prüfkörper ein Großteil der Prüfanschmutzung herausgespült wird. So würde die notwendige Ausgangs-Prüforganismuskonzentration nicht mehr ausreichen, um den geforderten Reduktionsfaktor von  $9 \log_{10}$  Stufen [55] überhaupt erzielen zu können. Ist andererseits eine Prüfanschmutzung durch die Beprobung gar nicht entfernbar und damit zu hartnäckig, resultieren aus allen nachfolgenden Untersuchungen falsch-negative Ergebnisse, d.h. die Prüfanschmutzung ist komplett im Schlauch verblieben und kann somit für einen Nachweis gar nicht mobilisiert werden.

In Veröffentlichungen zum Thema „Überprüfung der Reinigung und Desinfektion von Endoskopen“ sind in den letzten Jahren eine Vielzahl an Prüfanschmutzungen zum Einsatz gekommen, welche kontrovers diskutiert wurden [56, 57]; so auch während der langjährigen Erarbeitung der CEN ISO/TS 15883-5 [47c]. Diese beschreibt sechs verschiedene Prüfanschmutzungen für Endoskope, entnehmbar aus der Tabelle 19. Die Vielfalt der Prüfanschmutzungen ergibt sich aus dem jeweiligen langjährigen Einsatz der unterschiedlichen Prüfanschmutzungen in den verschiedenen an der Normung beteiligten Nationen vor einer Übereinkunft auf eine Prüfmethode. Nach langjährigen

Diskussionen gelang 2016 die Einigung auf die deutsche Prüfanschmutzung mit Blut als erster Standard [52].

Damit einher geht nun auch eine Vergleichbarkeit der Resultate der verschiedenen europäischen Arbeitsgruppen. Dies wird sicherlich in vielerlei Hinsicht von Vorteil sein und die Standards in der Hygiene, speziell in der Endoskopaufbereitung, voranbringen.

**Tabelle 19: Prüfanschmutzungen für Endoskope der CEN ISO/TS 15883-5 [47c]**

Land	Bestandteile
Deutschland <sup>*1</sup>	Blut, Protamin und <i>E. faecium</i>
Österreich	Nigrosin, Weizenmehl, Hühnerei und <i>E. faecium</i>
Frankreich	Biofilm gebildet von <i>P. aeruginosa</i> (nur für RDG-E)
Niederlande	Rinderserumalbumin, Schweinemucin, Rinderthrombin und Rinderfibrinogen
UK	Glycerin, dehydriertes Schweinemucin, Pferdeserum, ungebleichtes reines Mehl, wässrige Safraninlösung und Wasser
USA	Organische Basis oder Proteinbasis (nach Belieben) + <i>B. atrophaeus</i> -Sporen

Eine Prüfanschmutzung sollte mehrere Anforderungen erfüllen. So sollte sie von ihrer Zusammensetzung her äquivalent zu den erwarteten Kontaminationen im normalen klinischen Gebrauch sein [58, 59]. Weiterhin sollte sie eine gewisse Resistenz gegenüber dem Reinigungsprozess haben, gefolgt von ihrer Nachweisbarkeit, auch in sehr kleinen Mengen. Die Prüfanschmutzung sollte benutzerfreundlich und umweltverträglich sein.

De Bruijn et al. empfehlen zudem den Verzicht auf biologische Materialien wie Blut. Dies steht jedoch in direktem Gegensatz zu der klinisch zu erwartenden Kontamination und ist damit nicht praxisnah, was die zu erwartende Kontamination betrifft [58]. Eine Arbeit von Alfa [59] beschreibt eine künstliche Prüfanschmutzung (ATS-T - artificial test soil thickened), welche neben Proteinen, Kohlenhydraten, Hämoglobin, anorganischen Salzen und Endotoxinen vier verschiedene Prüforganismen beinhaltet (*E. faecium*, *Mycobacterium chelonae*, *P. aeruginosa* und *Geobacillus stearothermophilus*-Sporen). Die Zusammensetzung der ATS-T wurde an eine von Alfa et al. festgestellten und

<sup>1</sup> Bei dem in der CEN ISO/TS 15883-5 [47c] als zweite deutsche Prüfanschmutzung angegebenen Reagenz, bestehend aus Tetramethylbenzidin, Wasserstoffperoxidlösung und Rinderhämoglobin, handelt es sich um eine Nachweismethode für Blutrückstände in einem Prüfschlauch und nicht um eine Prüfanschmutzung. Das aufgelistete Rinderhämoglobin dient dabei der Herstellung von Referenzfarbproben.

beschriebenen worst-case-Anschmutzung bei flexiblen Endoskopen angelehnt [59]. Eine Koagulierbarkeit bei ATS-T besteht nicht, durch die Andickung mit Xanthangummi wird dies jedoch simuliert, daher der Namenszusatz „thickened“. Die Komplexität der Zusammensetzung scheint, insbesondere die vier verschiedenen Bakterienstämme betreffend, einer einfachen Praktikabilität im Weg zu stehen. In einer im Rahmen dieser Arbeit in PubMed [60] durchgeführten Literaturrecherche fand die ATS-T keine weitere Anwendung außerhalb von Kanada durch Alfa selbst.

De Bruijn et al. definierten eine Reihe von Kriterien für eine Prüfanschmutzung, die erfüllt sein müssen, um als geeignet gelten zu können, die „RIVM-Kriterien“ [58]:

1. Nicht entfernbar durch 1 Minute Spülen mit kaltem Wasser (20°C) ohne Reinigungsmittel.
2. Nicht oder nur teilweise entfernbar durch nachfolgend 1 Minute Spülen mit warmem Wasser (45°C) ohne Reinigungsmittel.
3. Vollständig entfernbar durch 5 Minuten Reinigen mit einer heißen (60°C) Lösung eines alkalischen Reinigungsmittels.

Zu seinen Untersuchungen anzumerken ist, dass die Kriterien beim Einsatz von Edelstahlplättchen als Prüfkörper festgelegt wurden und nicht explizit für ein Schlauchprüfmodell erarbeitet wurden. Dennoch sind die dahinterstehenden Grundgedanken einer gewissen Robustheit und einer nicht zu starken Hartnäckigkeit auch auf das Schlauchprüfmodell übertragbar. Drei von neun der von de Bruijn et al. [58] untersuchten Prüfanschmutzungen entsprachen den „RIVM-Kriterien“, darunter auch die in dieser Arbeit verwendete Prüfanschmutzung, bestehend aus reaktiviertem Schafblut und *E. faecium*.

Köhnlein et al. [57] forderten 2008 Praxisrelevanz, eine genaue Spezifikation und die Koagulierbarkeit einer Prüfanschmutzung. Bei der Widerstandsfähigkeit gegenüber definierten Reinigungsschritten schlossen sie sich de Bruijn et al. [58] weitgehend an. Zusätzlich forderten sie eine sensitive quantitative Analyse der Ausgangs- und Restkontamination. Köhnlein et al. verwendeten in ihren Ringversuchen eine Prüfanschmutzung bestehend aus reaktiviertem Schafblut (ohne Prüforganismus), als Prüfkörper wurden Plättchen aus Mattglas und aus Edelstahl verwendet. Der Nachweis des Reinigungserfolges erfolgte optisch und mit Hilfe der modifizierten OPA-Methode [61]. Diese Methode beruht auf der quantitativen Bestimmung des proteinogenen

Kontaminationsgrades und wurde von Michels und Frister 2004 mit alternativer Thiolkomponente (2-Mercaptoethansulfonsäure) als gleichwertig zur bis dahin verwendeten klassischen OPA-Methode mit N, N-Dimethyl-2-mercapto-ethylammoniumchlorid getestet [61].

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Prüfanschmutzung, bestehend aus reaktiviertem Blut und *E. faecium* mit einer medianen Konzentration von  $10^8$  KBE/ml (SD: 0,346), wurde insgesamt 29 mal hergestellt (n = 29). Bei der Versuchsreihe „Spülmittel“ ist ein Ausreißer mit einer Prüfanschmutzungs-Konzentration von  $10^6$  KBE/ml dokumentiert. Dies ist dem Umstand geschuldet, dass sich die Methode zu diesem Zeitpunkt in der Etablierung befand. In den darauffolgenden Versuchen mit mehr Routine wurden homogene Werte gemessen. Dies stellt einen Indikator für die schnelle Erlernbarkeit der Methode zur Herstellung der Prüfanschmutzung dar.

Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte Prüfanschmutzung wurde ebenfalls 2005 von Zühlsdorf [51] und 2012 von Kircheis und Wehrl [62] verwendet. In der 2013 erschienenen Dissertation von Kumor wurde die verwendete Prüfanschmutzung bis auf den Prüforganismus (*P. aeruginosa*) unverändert hergestellt und eingesetzt; die Konzentration der Prüfanschmutzung lag hierbei bei durchschnittlich  $10^9$  KBE/ml [63]. Bezüglich der Reproduzierbarkeit der Bakterienkonzentration wiesen bereits Zühlsdorf und Martiny 2005 die Reproduzierbarkeit der Bakterienkonzentration der deutschen Prüfanschmutzung mit einer durchschnittlichen Konzentration von  $10^8$ - $10^9$  KBE/ml nach [64]. Dies entspricht dem zu erwartenden Bioburden von  $10^5$  bis  $10^{10}$  KBE im indikationsgerecht angewendeten Endoskop [3, 4, 5] .

Die Gerinnungszeit der Prüfanschmutzung lag bei  $12,5 \pm 3$  Minuten. Die in drei Fällen gemessenen 20- bis 25-minütigen Gerinnungszeiten wurden bei der Verwendung eines Becherglases anstelle eines Erlenmeyerkolbens festgestellt. Bei diesen drei Fällen kam Blut einer identischen Blutcharge zum Einsatz. Bei den übrigen 26 Prüfanschmutzungen lag die Gerinnungszeit zwischen 9 und 15 Minuten; bei Zühlsdorf [51] zwischen  $14 \pm 4$  Minuten. Spichers und Peters bestimmten in ihrer „Methode zur Kontamination von Testobjekten mit gerinnendem Blut“ eine durchschnittliche Koagulationszeit von 15 Minuten [53].

Die Abmessungen und Konfigurationen eines Gefäßes scheinen Einfluss auf die Gerinnungszeit zu haben. Möglicherweise gibt es auch einen Zusammenhang zwischen

der längeren Gerinnungszeit und der verwendeten Blutcharge. Dies wurde auch bereits von Köhnlein et al. 2008 vermutet [57]. In der vorliegenden Arbeit wurde die Blutgerinnungszeit der Prüfanschmutzung in Abhängigkeit zum verwendeten Gefäß oder der verwendeten Blutcharge nicht überprüft, es handelt sich um einen subjektiv empfundenen Umstand. Theoretisch scheint die nicht standardisierbare Gerinnungszeit von Nachteil zu sein, fällt jedoch bei einer Inkubationszeit der Prüfkörper von einer Stunde nicht ins Gewicht. Wichtig ist die generelle Fähigkeit zur Koagulation. Die Koagulationszeit und vor allem die Koagulationsfähigkeit sollte immer überprüft und dokumentiert werden.

Bei der Verwendung von tierischem Vollblut sollte auch das generelle Risiko der Übertragung einer möglichen Zoonose berücksichtigt werden, veröffentlichte Fälle diesbezüglich liegen jedoch nicht vor. Es scheint ein kalkulierbares Risiko zu sein, wenn Standard-Hygienemaßnahmen beim Herstellen und beim Gebrauch der Prüfanschmutzung eingehalten werden.

Vorteile neben der wichtigen notwendigen Ähnlichkeit zu der klinisch erwarteten Kontamination sind die einfache und reproduzierbare Herstellung mit konstanten Prüforganismuskonzentrationen. Weiterhin bestehen bereits langjährige Erfahrungen mit einer Prüfanschmutzung auf Blutbasis, nicht nur bei Endoskopen sondern auch bei chirurgischen Instrumenten [36]. Zusammenfassend ist die verwendete Prüfanschmutzung aus reaktiviertem Schafblut und *E. faecium* als praktikable und praxisnahe Kontamination in mehrfachen Versuchen überprüft und mehrfach als geeignet deklariert worden.

### **5.1.2 PTFE-Schlauchprüfkörper**

Borchers et al. untersuchten 2004 den Einfluß der Länge, des Materials und des Durchmessers von Hohlkörpern auf das Inaktivierungsverhalten eines Bioindikators bei der Behandlung mit feuchter Hitze (Dampf) [50]. Dabei stellten sie einen umgekehrt proportionalen Zusammenhang zwischen Länge des Hohlprüfkörpers und der Inaktivierung von Bioindikatoren fest. Je länger also ein Schlauchprüfkörper ist, desto geringer war der Reduktionsfaktor des Bioindikators (in diesem Falle Sporenbildner auf Quarzglasfäden). Außerdem verglichen Borchers et al. Silikonschläuche, Metallrohre und PTFE-Schläuche mit gleichen Dimensionen. Zusammenfassend stellten sie fest, dass ein Prüfkörper von 150 cm Länge aus PTFE mit einem Innendurchmesser von 4 mm

die höchsten Anforderungen bei der Dampfsterilisation stellt. Zwar handelt es sich bei dieser Untersuchung um den Einsatz als Prüfkörper bei der Dampfsterilisation, dies lässt aber dennoch Rückschlüsse auf die Verwendung von PTFE-Prüfkörpern in einem RDG-E zu. So sollten ausreichend lange PTFE-Prüfkörper von mindestens 150 cm Verwendung finden, da längere Prüfkörper die schwierigsten Anforderungen an die Aufbereitung zu haben scheinen und sie mit 150 cm auch eine praxisrelevante Länge darstellen. PTFE ist zudem aufgrund seiner hohen Wärmekapazität ( $1,0 \text{ J} \times \text{g}^{-1} \times \text{K}^{-1}$ ) und der andererseits niedrigen Wärmeleitfähigkeit ( $0,25 \text{ W} \times \text{m}^{-1} \times \text{K}^{-1}$ ) [50] ein für die thermische Aufbereitung sehr anspruchsvolles Material im Gegensatz zu Metallprüfkörpern.

In einem 2013 durchgeführten Ringversuch zur Reinigungsleistung von zehn verschiedenen RDG-E wurden neben den angeschmutzten PTFE-Prüfkörpern auch Negativkontrollen verschiedener PTFE-Schlauch-Chargen eingesetzt, um eine herstellungsbedingte Proteinbelastung auszuschließen. Das in den Negativkontrollen überprüfte Schlauchmaterial enthielt keine oder nur geringe Proteinmengen unterhalb der Bestimmungsgrenze und hatte somit keinen Einfluß auf die Prüfergebnisse in den RDG-E [49].

Als erste Prüfkörper für den Einsatz im Schlauchprüfmodell für RDG-E wurden 1995 [54] 200 cm lange PTFE-Schläuche mit einem Innendurchmesser von 1,0 mm und 2,0 mm festgelegt und verwendet. Dabei simulierte damals der 2,0 mm durchmessende Prüfkörper den Arbeitskanal. Bei den Prüfungen unterschieden wurde die Testung im Rahmen der Typprüfung, wobei beide Schlauchdurchmesser zum Einsatz kamen, und die periodische Prüfung im Rahmen der Leistungsqualifikation eines RDG-E mit alleinigem Einsatz des 200 cm langen und 2 mm durchmessenden Prüfkörpers.

Diese 1995 festgelegten Dimensionen wurden zunächst in die CEN ISO/TS 15883-5 [47c] aus dem Jahr 2005 für die deutsche Prüfmethode übernommen, die gleichen Prüfkörperabmessungen wurden in Österreich verwendet. Frankreich benutzte mit *Pseudomonas aeruginosa*-Biofilm speziell angeschmutzte Schlauchstücke von 300 mm und in Großbritannien kamen nicht näher spezifizierte PTFE-Schlauchstücke zum Einsatz.

In Teil 4 der DIN EN ISO 15883 in der Version von 2009 [47b] wird erstmals ein Prüfkörper gefordert, der einem Endoskop nachempfunden ist. Dieser besteht aus mindestens einem Trompetenventil in Kombination mit mindestens drei PTFE-

Schläuchen. Diese bilden den Wasserkanal (Innendurchmesser 2 mm, Länge 150 cm), den Luftkanal (Innendurchmesser 2 mm, Länge 150 cm) und den Biopsie-/Absaugkanal (Innendurchmesser 4 mm, Länge 150 cm) nach. In der aktuellen Version der prEN ISO 15883-4 von 2016 [47b] werden ebenfalls Surrogate gefordert, die jetzt aber noch komplexer und dem Aufbau der verschiedenen Endoskop-Familien (siehe 2.3.1) nachempfunden sind.

Seit 2009 gelten in der Typprüfung als Prüfkörper jedoch nicht die gesamten angeschmutzten Schläuche, sondern 150 mm lange PTFE-Teilprüfstücke. Diese können an jedem Surrogatgerät an verschiedenen Abschnitten angebracht werden. Diese 150 mm langen Prüfstücke sollen mit einem kurzen Silikonschlauchstück mit größerem Durchmesser an ihrem Platz gehalten werden, indem sie über den langen Prüfschlauch und das angeschmutzte Prüfstück geschoben werden.

Dieses festgelegte Verfahren birgt einige Schwierigkeiten. Zum einen sind die Anschlussstellen der Prüfstücke und Schlauchsurrogate potentielle Schwachstellen mit Kontaminationsnischen mit ihren konstruktionsbedingt nicht sicher dicht abschließenden Stoßkanten. Hiermit könnten theoretisch falsch-positive Prüfergebnisse erzeugt werden. Zudem ist zu vermuten, dass eine „worst-case“ Anschmutzung in Endoskopen nicht auf 150 mm beschränkt bleibt, sondern im Extremfall den gesamten Biopsie-/Saugkanal betrifft. Außerdem ist das Einsetzen und Fixieren von mehreren Prüfstücken in das Surrogatgerät zeitaufwendiger, als den gesamten Prüfschlauch anzuschmutzen.

Zusammenfassend stellt der in dieser Arbeit benutzte PTFE-Prüfkörper mit verschiedenen Innendurchmessern ein hinreichend geprüftes Surrogat für reale Endoskope dar.

### **5.1.3 Einsatz von Ultraschall**

Der Einsatz von Ultraschall in der Instrumentenaufbereitung ist weit verbreitet. Dabei wird das Ultraschallbad vor allem zur Reinigung jener Medizinprodukte empfohlen, deren komplizierte Konstruktion eine mechanische Reinigung durch Bürsten oder Spülen schwierig erscheinen lässt. Aktuell existieren jedoch keine Leistungsanforderungen für Ultraschallgeräte bei der Aufbereitung, auch existiert keine Validierung des Ultraschalleinsatzes innerhalb des Aufbereitungsprozesses. Zusätzlich besteht Uneinigkeit, wie genau Ultraschall auf Mikroorganismen wirkt. Einerseits wird von einer

bakteriziden Wirkung berichtet, andererseits von keinerlei Auswirkungen auf Mikroorganismen [65].

Pagán et al. identifizierten 1999 *E. faecium* als am resistentesten gegenüber Druck und Ultraschallwellen im Vergleich zu Listerien, Salmonellen und Aeromonas [66]. Ein komplettes Absterben von *E. faecium* wurde auch bei Maximierung des Druckes und der Ultraschallamplitude nicht beobachtet, erst beim zusätzlichen Einsatz von Hitze > 75°C wurde ein synergistischer Effekt aller Parameter bei der Inaktivierung beobachtet.

Bei den vorliegenden Versuchen zum Überlebensverhalten bei Ultraschalleinwirkung auf den Prüforganismus *E. faecium* zeigte sich ebenfalls kein Absterben des Bakteriums, vielmehr wurde nach 5 Minuten ein Anstieg der Bakterienkonzentration registriert. Auch Jatzwauk wies analog zu diesem Ergebnis keine Reduktion von Mikroorganismen bei Ultraschalleinsatz nach [65]. Die untersuchten Organismen waren *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Candida albicans*. Jatzwauk stellte ebenfalls eine Vermehrung der Bakterien mit Generationszeiten von 4 - 6 Stunden, auch unter kontinuierlicher Beschallung, fest. Dies scheint auch in den vorliegenden Versuchen der Fall zu sein und erklärt somit den Anstieg der Bakterienkonzentration in Abhängigkeit der Zeit.

Zur Sicherstellung, dass Ultraschall in die verwendeten PTFE-Schläuche dringt, erfolgte der „modifizierte Folientest“, der in Anlehnung an die international technische Regel IEC/TR 60886:1987-03 durchgeführt wurde [67]. Der Zerstörungsgrad der Aluminiumfolie gilt dabei als Maß für die Intensität und die Kavitation im Ultraschallbad. Die Modifikation bestand in der intraluminalen Bestückung der auf 150 mm verkürzten PTFE-Schlauchstücke mit schmalen Aluminium-Teststreifen.

Mit den vorliegenden Ergebnissen kann ein Eindringen von Ultraschall in die PTFE-Prüfkörper nachgewiesen werden. Mit längerer Anwendung des Ultraschalls steigt auch der optische Zerfallsgrad der verwendeten Aluminium-Teststreifen.

Da Ultraschall in die Versuchskörper eindringt und *E. faecium* während der Ultraschallbehandlung überlebt, war der nächste Schritt die Untersuchung des Einflusses der Ultraschallbehandlung auf die Rückgewinnungsrate.

Die prEN ISO 15883-4 [47b] in der Version von 2009 fordert beim Verfahren der Organismusrückgewinnung den Einsatz von Ultraschall über 10 Minuten bei 45 kHz. Doch wurde der Ultraschalleinsatz im Schlauchprüfmodell zuvor noch nicht syste-

matisch überprüft. Anzumerken ist, dass hierbei die kleinen Prüfstücke (150 mm) längs aufgeschnitten und dann dem Ultraschall ausgesetzt werden, wahrscheinlich erhofft man sich dadurch ein besseres „Ablösen“ des Prüforganismus von der Innenseite des PTFE-Schlauches. Ob dies der Fall ist, wurde bisher nicht experimentell untersucht bzw. publiziert.

Bei der Verwendung von Ultraschall bei angeschmutzten Prüfplättchen (EN DIN 15883-1) [47a] zur Rückgewinnungsoptimierung wurde 2007 von Friedrich et al. [68] gezeigt, dass es bei Ultraschalleinsatz (Dauer: 20 min, Frequenz: 35 Khz, Temperatur: 22°C) zu einer Verbesserung der Rückgewinnungsrate auf über 70% kommt. Bei diesem Versuchsaufbau kamen Prüfplättchen aus Metall zum Einsatz. Ein Rückschluss auf das PTFE-Schlauchprüfmodell ist nicht möglich. Im Rahmen dieser Arbeit zur Rückgewinnung beim Einsatz von Ultraschall wurden die 200 cm langen Prüfkörper in ihrer ganzen Länge verwendet und ohne diese längs aufzuschneiden. Es wurden keine höheren Rückgewinnungsraten des Prüforganismus *E. faecium* gemessen. Auch bei Kumor [63], unter der Verwendung des mit Haftfimbrien ausgestatteten *P. aeruginosa* als Prüforganismus, ergab sich keine Steigerung der Rückgewinnungsraten mit Ultraschallbehandlung.

Zusammenfassend bewertet hat die Ultraschallbehandlung keinen Nutzen bei der Rückgewinnung der Prüfanschmutzung bei der Anwendung im Schlauchprüfmodell mit 200 cm langen intakten Schlauchprüfkörpern in Analogie zu realen Endoskopen. Ob eine höhere Rückgewinnungsrate bei der Verwendung von 150 mm kurzen und längs aufgeschnittenen Prüfkörperstücken besteht, ist bisher nicht hinreichend untersucht.

## **5.2 Effekte der Parameter „Spülmittel“ und „Spülmethode“ auf die Rückgewinnung**

In der vorliegenden Literatur kommt eine Vielzahl von Spülmitteln und Spülvolumina bei der Elution von Endoskopkanälen und Schlauchprüfkörpern zum Einsatz. Gespült wird in der Regel manuell mit einer aufgesetzten Spritze. Exemplarisch sind hier einige ausgewählte Beispiele aufgeführt.

Alfa et al. benutzten bei der Untersuchung des Bioburden von Endoskopen 10 ml steriles Wasser aus Umkehr-Osmoseanlagen zur Elution der Endoskopkanäle [5, 69-71]. Bei einigen europäischen Fallserien bei Kontaminationen von Endoskopen mit

multiresistenten Erregern kamen 20 ml sterile isotone Kochsalzlösung [30, 72] oder 80 ml sterile isotone Kochsalzlösung [26] zur Elution zum Einsatz. Die DGKH empfahl 2010 das Eluieren der Endoskopkanäle mit 25 ml steriler 0,9%iger Kochsalzlösung zum Durchspülen bei der Überprüfung von flexiblen Endoskopen nach der Aufbereitung [73]. 50 ml TSB wurde vor allem von Martiny und Zühlsdorf zur Elution von Prüfkörpern eingesetzt [51, 64]. Bei der Überprüfung der Reinigungsleistung von RDG-E mit der modifizierten OPA-Methode findet 5 ml SDS Anwendung [49, 74]. Die aktuell gültige deutsche Empfehlung der KRINKO beim RKI und BfArM aus dem Jahr 2012 [2] fordert den Anwender zur regelmäßigen hygienischen Kontrolle der aufbereiteten Endoskope in Form eines mikrobiologischen Nachweises viertel- bis halbjährlich auf. Empfohlen wird hier, die Endoskopkanäle mit 20 ml physiologischer Kochsalzlösung und entsprechend des verwendeten Desinfektionsmittels versetzt mit einer geeigneten Enthammersubstanz zu eluieren [2]. Gleiches empfiehlt auf europäischer Ebene die Leitlinie der ESGE-ESGENA [48].

Dies sind exemplarisch gewählte Quellen, eine systematische Überprüfung der Eignung von Spülmitteln sowie der eingesetzten Spülmethode existiert bisher nicht, daher gibt es auch keine zum Vergleich heranziehbare Quellen. Am verbreitetsten scheint der Einsatz von physiologischer Natriumchlorid-Lösung zu sein.

### **5.2.1 „Spülmittel“**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die fünf verschiedenen Spülmittel NaCl 0,9%, NaCl 0,9% und Tween 80, TSB, TSB und Enthemmer und 1%ige SDS-Lösung miteinander verglichen. Beim Einsatz von 1%iger SDS-Lösung starb der Prüforganismus *E. faecium* ab. In den Versuchen von Kumor [63] war der Prüforganismus *Pseudomonas aeruginosa* ebenfalls beim Spülen mit 1%iger SDS-Lösung abgestorben. Dies lässt auf einen Spezies unabhängigen Effekt der 1%igen SDS-Lösung auf die Mikroorganismen schließen. SDS-Lösung eignet sich somit nicht zum Einsatz bei einer Methode mit einem Prüforganismus im Sinne einer mikrobiologischen Überprüfung. Auch ist zu berücksichtigen, dass SDS in der Biotechnologie und Biochemie als Denaturierungsmittel für Proteine Anwendung findet; es gilt als allergieauslösend und hautreizend.

Zwischen den übrigen vier Spülmitteln existiert kein signifikanter Unterschied in der Rückgewinnung des Prüforganismus. Insbesondere bestand beim Einsatz von Tween 80 als Detergens mit 0,9%igen Natriumchlorid keine signifikante Änderung der

Rückgewinnungsrate im Vergleich zum zusatzfreien 0,9%igem Natriumchlorid. Auch die Nutzung von zusätzlichen Enthemmernsubstanzen erbrachte keine Änderung in der Rückgewinnungsrate. Spülsubstanzenunabhängig sind die Mediane der Spülkonzentration homogen und mit nur geringer Streuung; sie liegen zwischen 6,41  $\log_{10}$  KBE/ml und 6,68  $\log_{10}$  KBE/ml und damit innerhalb einer halben log-Stufe.

In der 2011 erschienenen Veröffentlichung „Methode zur Überprüfung der Reinigungsleistung von RDG-E“ von Wehrl und Kircheis [74], welche auch in die „Leitlinie von DGKH, DGSV, DGVS, DEGEA und AKI für die Validierung maschineller Reinigung- und Desinfektionsprozesse zur Aufbereitung thermolabiler Endoskope“ als Anlage 8 Einzug gehalten hat [35], kommt zur Elution der Prüfanschmutzung SDS-Lösung zum Einsatz. Dies scheint zunächst bei dem bestehenden Fakt des Abtötens der Prüforganismen durch SDS widersinnig. Jedoch handelt es sich bei der von Wehrl und Kircheis [74] verwendeten Methode um die Überprüfung der alleinigen Reinigungsleistung und nicht des Gesamtprozesses (Reinigung und Desinfektion). Diese Methode nutzt den quantitativen Proteinnachweis mit Hilfe der modifizierten OPA-Methode [61] zur Bestimmung des Proteingehaltes nach der Reinigung als Surrogatparameter. Bei der von Wehrl und Kircheis verwendeten Prüfanschmutzung (reaktiviertes Schafblut) kommen keine Mikroorganismen zum Einsatz [74].

An dieser Stelle sei nochmals die Notwendigkeit der Überprüfung der Reinigungsleistung unabhängig vom Gesamtprozess (Reinigung und Desinfektion) erwähnt, da Fehler in der Reinigung eine falsch-positive Auswirkung auf die Desinfektionsleistung haben könnte. „Eine effiziente Reinigung ist Voraussetzung für eine effiziente Desinfektion“ [35]. Bei der Methode der mikrobiologischen Überprüfung der Gesamtprozessleistung [62] wird nach der Reinigung und Desinfektion mit 50 ml eines geeigneten Neutralisationsmittels in Abhängigkeit des verwendeten Desinfektionsmittels eluiert und dann weiter verarbeitet.

Zusammenfassend stellt physiologische Natriumchlorid-Lösung ein hinreichend geprüftes Spülmittel dar, welches reproduzierbare Elutionsergebnisse erbringt. Auch der zusätzliche Einsatz von Detergenzien oder Enthemmernsubstanzen gemeinsam mit Natriumchlorid-Lösung, wie in den aktuell gültigen Leitlinien empfohlen, erbringt äquivalente Elutionsergebnisse.

### 5.2.2 „Spülmethode“

Da sich aus der Versuchsreihe zum Spülmittel 0,9%ige Natriumchlorid-Lösung als geeignet, praktikabel, leicht herstellbar und preisgünstig herausgestellt hat, wurde für die Überprüfung einer möglichen Abhängigkeit der Rückgewinnungsrate von der Spülmethode Natriumchlorid-Lösung als alleiniges Spülmittel verwendet. Bei den verschiedenen Spülmethoden wurden einerseits verschiedene Volumina des Spülmittels (10 ml, 20 ml und 50 ml Spülmittel) eingesetzt sowie das Verfahren des Eluierens variiert. Hierbei kamen neben der manuellen Spülung auch zwei verschiedene Pumpensysteme zum Einsatz.

Es besteht kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des verwendeten Volumens des Spülmittels. So waren die Rückgewinnungsraten beim Einsatz von 50 ml, 20 ml und auch 10 ml Natriumchlorid-Lösung nahezu identisch, wobei bei den 20 ml Volumina 4malig aspiriert wurde. Der zeitliche Aufwand der mehrfachen Aspiration hat keine Effekt auf die Rückgewinnungsrate und ist somit nicht gerechtfertigt. Die Ergebnisse legen auch nahe, dass die Elution mit lediglich 10 ml ausreichend ist. Die Handhabung einer kleinen 10 ml-Spritze, im Vergleich zu einer 50 ml-Blasenspritze, ist vom manuellen Aspekt weniger geeignet. Die Blasenspritze ist griffiger und beim Spülvorgang gleichmäßiger anwendbar, dies begünstigt einen kontinuierlichen und reproduzierbaren Spülvorgang. Mehrfach, auch mit entsprechender Übung, rutschte bei den Versuchen die 10 ml Spritze vom Anschlusskonus ab.

Bereits mit der zweiten 10 ml-Spülung ergibt sich zu den vorherigen ersten 10 ml eine deutlicher Unterschied von 1,5 log-Stufen in der Rückgewinnungsrate zugunsten der ersten 10 ml-Elution. Der erste Spülgang ist somit der Effektivste für die Rückgewinnung. Wichtig ist somit das konsequente Auffangen bereits der ersten Milliliter bei jeder Elution. Ein Verwerfen der ersten Milliliter verfälscht die Ergebnisse und muss unbedingt vermieden werden.

2010 untersuchten Köhnlein et al. die Rückgewinnungsrate von *E. faecium* beim Einsatz von 4 verschiedenen Spüllösungen - TSB-Lösung, 0,85%-ige Natriumchlorid-Lösung, vollentsalztes Wasser und Neutralreiniger. Zur Rückgewinnung wurde fünfmalig mit 20 ml des Spülmittels eluiert und portionsweise à 20 ml aufgefangen und weiterverarbeitet. Auch Köhnlein et al. erreichten mit dem ersten Spülgang die höchste Rückgewinnungsrate, unabhängig vom verwendeten Spülmittel [75].

Ein großes Spülmittelvolumen bringt keinen Vorteil in der Rückgewinnung, das Volumen sollte in Anbetracht der Praktikabilität und der weiteren Ausbreitung und Verarbeitung des Eluats zu Gunsten der 50 ml ausfallen, bleibt jedoch variabel.

Teilweise kamen Pumpensysteme zur Elution in einer Arbeitsgruppe zum Einsatz. Diese Arbeitsgruppe entwickelte Verfahrensvorschriften zur Überprüfung von RDG-E. Eine Veröffentlichung der Daten mit Pumpensysteme liegt nicht vor. Das dennoch Pumpen zum Einsatz kamen, ist aus Verfahrensgutachten zu entnehmen. Die Arbeitsgruppen gingen davon aus, dass der Pumpeneinsatz eine höhere Rückgewinnungsrate zur Folge hat [52]. Der Einsatz der beiden unterschiedlichen Pumpensysteme ergab im direkten Vergleich miteinander einen Vorteil für die Sogpumpe. Dies hängt am ehesten mit dem höheren Druck zusammen, den die Sogpumpe im Vergleich zum Infusomaten in der Lage war aufzubringen. Ein Unterschied zu allen manuellen Spülung mit 50 ml, 20 ml und 10 ml lag nicht vor. Die Verwendung einer mechanischen Pumpe bringt keine Verbesserung der Rückgewinnungsrate. Der Aufwand des Einsatzes eines zusätzlichen Gerätes, welches einer erneuten Prozessvalidierung und einer regelmäßigen Wartung unterliegt, ist aufgrund der Ergebnisse der manuellen Spülungen nicht gerechtfertigt.

Theoretisch zu Bedenken ist, dass vor allem bei Mikroorganismen die in der Lage sind Biofilme zu bilden es zu einem falsch negativen Ergebnis in der mikrobiologischen Überprüfung kommen kann, wenn zur Probegewinnung lediglich durchgespült wird. So modifizierte Aumeran auf der Suche nach der Quelle einer rezidivierenden multi-resistenten Klebsiellenbakteriämie nach ERCP's das Verfahren der Probeentnahme. Die Kanäle der Endoskope wurden im Rahmen der Surveillance-Untersuchungen mit Tween 80-Lösung (Enthemmersubstanz) gespült und mit einer Bürste zusätzlich mechanisch behandelt. Hierbei gelang erstmalig der Nachweis des multiresistenten Erregers in den Surveillance-Kulturen [26].

Zusammenfassend ist der Einsatz von 0,9%iger Natriumchlorid-Lösung mit einem Spülvolumen von 10 - 50ml und einer einmaligen manuellen Spülung des Schlauchprüfkörpers am effektivsten und praktikabelsten. Der zusätzliche Einsatz von Enthemmersubstanzen ist möglich und erbringt identische Elutionsergebnisse. Die Ergebnisse zum Spülmittel und zur angewendeten Spülmethode im Schlauchprüfmodell können analog bei der Elution der Kanäle bei Endoskopen Anwendung finden. Hierbei sollte jedoch bei begründeten Verdacht auf mögliche falsch-negative mikrobiologische Ergebnisse, zum

Beispiel im Rahmen von Surveillance-Untersuchungen, zusätzlich ein geeignetes Neutralisationsmittel bei der Spülung verwendet werden und die Probegewinnung mit Hilfe von Bürsten erfolgen.

Auf Basis der Ergebnisse können die Fragen der Zielstellung wie folgt beantwortet werden:

1. Welche Methode zur Rückgewinnung der Prüfanschmutzung im Schlauchprüfmodell, bestehend aus reaktiviertem Schafblut und *E. faecium*, ist geeignet?

Zur Rückgewinnung geeignet ist die Verwendung von 10-50ml 0,9%iger Natriumchlorid-Lösung als einmalige manuelle Spülung.

2. Welchen Einfluss haben unterschiedliche Spüllösungen und unterschiedliche Spülmethoden auf die Konzentration der Rückgewinnungs-Eluate?

Die Spüllösungen mit Zusatz von Detergenzien und Enthemmern unterscheiden sich nicht in Bezug auf 0,9%ige Natriumchlorid-Lösung in der Rückgewinnungsrate des Prüforganismus. SDS-Lösung eignet sich nicht bei der Verwendung eines Prüforganismus, da dieser bei Verwendung von SDS-Lösung abstirbt. Spülmethode eignet sich ein Volumen von 10-50ml als einmalige manuelle Spülung. Der Einsatz einer Pumpe bringt keine Erhöhung der Rückgewinnungsrate.

3. Ist der zusätzliche Einsatz einer Ultraschallvorbehandlung der Prüfkörper sinnvoll?

Die Ultraschallbehandlung erhöht nicht die Rückgewinnungsrate des Prüforganismus im Schlauchprüfmodell für RDG-E.

4. Liefert das Schlauchprüfmodell reproduzierbare Ergebnisse?

Das Schlauchprüfmodell für RDG-E liefert reproduzierbare Ergebnisse. Die Prüfmethode ist standardisierbar, kostengünstig, effizient und leicht erlernbar.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Spaulding EH, Gröschel DH. 1974. Hospital disinfectants and antiseptics, p852-857. In Lennette EH, Truant JP(ed), *Manuel of clinical microbiology* 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington,DC.
- [2] Anforderung an die Hygiene bei der Aufbereitung von Medizinprodukten. Empfehlung der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) beim Robert Koch-Institut (RKI) und des Bundesinstitutes für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM). *Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz* 2012; 55; 1-67.
- [3] Chu NS, McAlister D, Antonoplos PA. Natural bioburden levels detected on flexible gastrointestinal endoscopes after clinical use and manual cleaning. *Gastrointest Endosc.* 1998;48:137-142.
- [4] Vesley D, Melson J, Stanley P. Microbial bioburden in endoscope reprocessing and an in-use evaluation of the high-level disinfection capabilities of Cidex PA. *Gastroenterol Nurs.* 1999;22:63-68.
- [5] Alfa MJ, Degagne P, Olson N. Worst-case soiling levels for patient-used flexible endoscopes before and after cleaning. *Am J Infect Control.* 1999;27:392-401.
- [6] Giusti de Marle M, Sgreccia A, Carmenini E, Morelli S. Infective endocarditis from *Enterococcus faecalis* complicating colonoscopy in Heyde's syndrome. *Postgrad Med J.* 2004;80:619-620.
- [7] Kimmey MB, Burnett DA, Carr-Locke DL, DiMarino AJ, Jensen DM, Katon R, MacFayden BV, Scobey MW, Stein TN, Steinberg SM. 1993. Transmission of infection by gastrointestinal endoscopy. *Gastrointest. Endosc.*39:885-888.
- [8] Rutala WA, Weber DJ. How to assess risk of disease transmission to patients when there is a failure to follow recommended disinfection and sterilization guidelines. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2007;28:146-155.
- [9] Gorse GJ, Messner RL. Infection control practices in gastrointestinal endoscopy in the United States: a national survey. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1991;12:289-296.
- [10] Seoane-Vazquez E, Rodriguez-Monguio R, Visaria J, Carlson A. Exogenous endoscopy-related infections, pseudo-infections, and toxic reactions: clinical and economic burden. *Curr Med Res Opin.* 2006;22:2007-2021.
- [11] Axon AT, Beilenhoff U, Bramble MG, Ghosh S, Kruse A, McDonnell GE, Neumann C, Rey JF, Spencer K; Guidelines Committee. European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE). Variant Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD) and gastrointestinal endoscopy. *Endoscopy.* 2001;33:1070-1080.
- [12] Birnie GG, Quigley EM, Clements GB, Follet EA, Watkinson G. Endoscopic transmission of hepatitis B virus. *Gut.* 1983;24:171-174.

- [13] Morris IM, Cattle DS, Smits BJ. Letter: Endoscopy and transmission of hepatitis B. *Lancet*. 1975;2:1152.
- [14] Seefeld U, Bansky G, Jaeger M, Schmid M. Prevention of hepatitis B virus transmission by the gastrointestinal fibrescope. Successful disinfection with an aldehyde liquid. *Endoscopy*. 1981;13:238-239.
- [15] Kovaleva J, Peters FT, van der Mei HC, Degener JE. Transmission of infection by flexible gastrointestinal endoscopy and bronchoscopy. *Clin Microbiol Rev*. 2013;26:231-254.
- [16] Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz. Transfusionsgesetz (TFG) in der Fassung der Bekanntmachung vom 28. August 2007 (BGBl. I S. 2169), das durch Artikel 49 des Gesetzes vom 29. März 2017 (BGBl. I S. 626) geändert worden ist. Hämotherapie-Richtlinien nach §§12 a und 18 TFG.
- [17] Mandelstam P, Sugawa C, Silvis SE, Nebel OT, Rogers BH. Complications associated with esophagogastroduodenoscopy and with esophageal dilation. *Gastrointest Endosc*. 1976 Aug;23(1):16-19.
- [18] Allen JI, Allen MO, Olson MM, Gerding DN, Shanholtzer CJ, Meier PB, Vennes JA, Silvis SE. Pseudomonas infection of the biliary system resulting from use of a contaminated endoscope. *Gastroenterology*. 1987 Mar;92(3):759-763.
- [19] Alvarado CJ, Stolz SM, Maki DG. Nosocomial infections from contaminated endoscopes: a flawed automated endoscope washer. An investigation using molecular epidemiology. *Am J Med*. 1991 Sep 16;91(3B):272S-280S.
- [20] Schliessler KH, Rozendaal B, Taal C, Meawissen SG. Outbreak of Salmonella agona infection after upper intestinal fibreoptic endoscopy. *Lancet*. 1980 Dec 6;2(8206):1246.
- [21] Langenberg W, Rauws EA, Oudbier JH, Tytgat GN. Patient-to-patient transmission of Campylobacter pylori infection by fiberoptic gastroduodenoscopy and biopsy. *J Infect Dis*. 1990 Mar;161(3):507-511. (Campylobacter pylori wurde 1989 umbenannt in Helicobacter pylori)
- [22] Tytgat GN. Endoscopic transmission of Helicobacter pylori. *Aliment Pharmacol Ther*. 1995;9 Suppl 2:105-110.
- [23] Patterson DJ, Johnson EH, Schmulen AC. Fulminant pseudomembranous colitis occurring after colonoscopy. *Gastrointest Endosc*. 1984 Aug;30(4):249-53.
- [24] Rutala WA, Gergen MF, Weber DJ. Inactivation of Clostridium difficile spores by disinfectants. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1993 Jan;14(1):36-9.
- [25] Wullt M, Odenholt I, Walder M. Activity of three disinfectants and acidified nitrite against Clostridium difficile spores. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2003 Oct;24(10):765-8.

- [26] Aumeran C, Poincloux L, Souweine B, Robin F, Laurichesse H, Baud O, Bommelaer G, Traoré O. Multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* outbreak after endoscopic retrograde cholangiopancreatography. *Endoscopy*. 2010 Nov;42(11):895-899.
- [27] Alrabaa SF, Nguyen P, Sanderson R, Baluch A, Sandin RL, Kelker D, Karlapalem C, Thompson P, Sams K, Martin S, Montero J, Greene JN. Early identification and control of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, originating from contaminated endoscopic equipment. *Am J Infect Control*. 2013 Jun;41(6):562-564.
- [28] Carbonne A, Thiolet JM, Fournier S, Fortineau N, Kassis-Chikhani N, Boytchev I, Aggoune M, Segquier JC, Senechal H, Tivolacci MP, Coignard B, Astagneau P, Jarlier V. Control of a multi-hospital outbreak of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* type 2 in France, September to October 2009. *Euro Surveill*. 2010 Dec 2;15(48) pii: 19734.
- [29] Gastmeier P, Vonberg RP. *Klebsiella* spp. in endoscopy-associated infections: we may only be seeing the tip of the iceberg. *Infection*. 2014 Feb;42(1):15-21.
- [30] Klefisch FR, Schweizer C, Kola A, Zweigner J, Moter A, Hummel M. Ein flexibles Bronchoskop als Quelle eines Ausbruchs mit OXA-48 Carbapenemase produzierender *Klebsiella pneumoniae*. *Hyg Med* 2015:40-1/2.
- [31] Orsi GB, García-Fernández A, Giordano A, Venditti C, Bencardino A, Gianfreda R, Falcone M, Carattoli A, Venditti M. Risk factors and clinical significance of ertapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in hospitalised patients. *J Hosp Infect*. 2011 May;78(1):54-58.
- [32] Orsi GB, Venditti M. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* transmission associated to endoscopy. *Am J Infect Control*. 2013 Sep;41(9): 849-850.
- [33] Kovaleva J. Infectious complications in gastrointestinal endoscopy and their prevention. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2016 Oct;30(5):689-704.
- [34] Kampf B, Makowski T, Weiss H, Henn H, Hoeschen-Luemmen M, Brümmer T, Blum R, Wietfeld K. ESGE newsletter. Definition of “endoscope families” as used in EN ISO 15883-4. *Endoscopy*. 2013;45(2):156-7. doi: 10.1055/s-0032-1326183. Epub 2013 Jan 30.
- [35] Leitlinie zur Validierung maschineller Reinigungs- und Desinfektionsprozesse zur Aufbereitung thermolabiler Endoskope. *Zentr Steril* 2011; Suppl. 3.
- [36] Leitlinie zur Validierung der manuellen Reinigung und manuellen chemischen Desinfektion von Medizinprodukten. 2013.
- [37] Leitlinie von DGKH, DGVS und AKI für die Validierung und Routineüberwachung maschineller Reinigungs- und thermischer Desinfektionsprozesse für Medizinprodukte. *Zentr Steril Suppl*. 2014: 4. Auflage.

- [38] Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz. Medizinproduktegesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 7. August 2002 (BGBl. I S. 3146), zuletzt geändert durch Artikel 16 des Gesetzes vom 23. Dezember 2016 (BGBl. I S. 3191).
- [39] Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz. Medizinprodukte-Betreiberverordnung in der Fassung der Bekanntmachung vom 21. August 2002 (BGBl. I S. 3396), die zuletzt durch Artikel 2 der Verordnung vom 27. September 2016 (BGBl. I S. 2203) geändert worden ist.
- [40] Das Fünfte Buch Sozialgesetzbuch – Gesetzliche Krankenversicherung – (Artikel 1 des Gesetzes vom 20. Dezember 1988, BGBl. I S. 2477, 2482), das zuletzt durch Artikel 7 des Gesetzes vom 23. Mai 2017 (BGBl. I S. 1228) geändert worden ist. §§135 - 137.
- [41] Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz. Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen (Infektionsschutzgesetz - IfSG) vom 20. Juli 2000 (BGBl. I S. 1045), das zuletzt durch Artikel 4 Absatz 20 des Gesetzes vom 18. Juli 2016 (BGBl. I S. 1666) geändert worden ist.
- [42] Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz. Trinkwasserverordnung in der Fassung der Bekanntmachung vom 10. März 2016 (BGBl. I S. 459), die durch Artikel 4 Absatz 21 des Gesetzes vom 18. Juli 2016 (BGBl. I S. 1666) geändert worden ist.
- [43] Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz. Biostoffverordnung vom 15. Juli 2013 (BGBl. I S. 2514), die zuletzt durch Artikel 146 des Gesetzes vom 29. März 2017 (BGBl. I S. 626) geändert worden ist.
- [44] Deutsche Gesetzliche Unfallversicherung. Unfallverhütungsvorschrift Grundsätze der Prävention (bisher: BGV A1) November 2013.
- [45] TRBA 250 - Biologische Arbeitsstoffe im Gesundheitswesen und in der Wohlfahrtspflege. Ausgabe März 2014 GMBI 2014, Nr. 10/11 vom 27.03.2014, 3. Änderung vom 17.10.2016, GMBI Nr. 42.
- [46] DIN EN ISO 14971:2013-04, Medizinprodukte - Anwendung des Risikomanagements auf Medizinprodukte (ISO 14971:2007, korrigierte Fassung 1. Oktober 2007); Deutsche Fassung EN ISO 14971:2012.
- [47] DIN EN ISO 15883: Reinigungs- Desinfektionsgeräte.
- [47a]: Reinigungs-Desinfektionsgeräte - Teil 1: Allgemeine Anforderungen, Begriffe und Prüfverfahren (ISO 15883-1:2006 + Amd 1:2014); Deutsche Fassung EN ISO 15883-1:2009 + A1:2014.
- [47b]: Reinigungs-Desinfektionsgeräte - Teil 4: Anforderungen und Prüfverfahren für Reinigungs-Desinfektionsgeräte mit chemischer Desinfektion

für thermolabile Endoskope (ISO/DIS 15883-4:2016); Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 15883-4:2016.

[47c]: Reinigungs-Desinfektionsgeräte - Teil 5: Prüfanschmutzungen und -verfahren zum Nachweis der Reinigungswirkung (ISO/TS 15883-5:2005); Deutsche Fassung CEN ISO/TS 15883-5:2005.

- [48] Beilenhoff U, Neumann CS, Rey JF, Biering H, Blum R, Schmidt V and the ESGE Guidelines Committee. ESGE–ESGENA guideline for quality assurance in reprocessing; Microbiological surveillance testing in endoscopy. 2007 Endoscopy; 39:175–181.
- [49] Biering H, Beilenhoff U, Heintz M. Prüfung der Reinigungsleistung von Reinigungs-Desinfektionsgeräten für thermolabile Endoskope - Ringversuch mittels eines Schlauchmodells mit Proteinnachweis 2013 Zentr Steril; (3): 185-189.
- [50] Borchers U, Mielke M. Einfluss von Material, Länge, Wandstärke und Durchmesser von Hohlkörpern auf das Inaktivierungsverhalten von Bioindikatoren bei der Behandlung mit feuchter Hitze. 2004 Zentr Steril; 12 (5): 314-322.
- [51] Zühlsdorf B. Bestimmung der Reinigungsleistung von Prozessen mit verschiedenen Reinigern in Reinigungs- und Desinfektionsgeräten für flexible Endoskope. Inaugural-Dissertation 2005.
- [52] Martiny, H. persönliche Mitteilung von Fr. Prof. Dr. rer. nat. Heike Martiny.
- [53] Spicher G, Peters J. Eine Methode zur Kontamination von Testobjekten mit gerinnendem Blut (A method of contaminating test objects with coagulating blood). 1985 Zbl Bakt Hyg B; 182: 89-94
- [54] Arbeitskreis Endoskopie der Deutsche Gesellschaft für Krankenhaushygiene (DGKH). Prüfung und Bewertung der Reinigungs- und Desinfektionswirkung von Endoskop-Dekontaminationsautomaten sowie Desinfektionsautomaten. 1995 Hyg Med; 20: 40-47
- [55] Deutsche Gesellschaft für Krankenhaushygiene (DGKH). Mitteilung des Vorstandes zur „Prüfung und Bewertung der Reinigungs- und Desinfektionswirkung von Endoskop-Dekontaminationsautomaten sowie Desinfektionsautomaten. 1995 Hyg Med; 20: 40-47“. 2001 Hyg Med; 26: 524
- [56] Crutwell M. Ein Vergleich der in ISO/TS 15883-5 veröffentlichten Prüfanschmutzungen für chirurgische Instrumente. 2008 Zentr Steril; 16(4): 256-265.
- [57] Köhnlein J, Glasmacher R, Heide V, Kunde D, Mohr M, Otto D, Roth K, Staffeldt J, Tiarks P, Wagenknecht S, Werner HP, Michels W. Ringversuch zur Standardisierung einer praxisrelevanten Prüfanschmutzung zur vergleichenden

- Quantitativen Bewertung der Reinigung in Anlehnung an EN ISO 15883. 2008 Zentr Steril ; 16(6): 424-435.
- [58] de Bruijn ACP, van Drongelen AW. EN ISO 15883: Norm prima, Testanschmutzungen eher nicht. 2005 Zentr Steril: 13(5): 330-333.
- [59] Alfa MJ, DeGagne P, Olson N. Validierung der künstlichen Testanschmutzung ATS zur Ermittlung der Reinigungs- und Sterilisationswirkung bei Instrumenten mit engem Lumen. 2005 Zentr Steril; 13(6): 387-402.
- [60] National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine via <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>.
- [61] Michels W, Frister H. Die modifizierte OPA-Methode mit alternativer Thiolkomponente. 2004 Zentr Steril; 12(2): 115-116.
- [62] Kircheis U, Wehrl M. Methode zur Überprüfung der Gesamtprozessleistung von Reinigungs-Desinfektionsgeräten für flexible Endoskope 2012 Hyg Med; 37(6): 245 -249.
- [63] Kumor M. Anwendung verschiedener Untersuchungsmethoden zur Rückgewinnung von *Pseudomonas aeruginosa* bei der Standardisierung einer Prüfmethode zur Aufbereitung von flexiblen Endoskopen nach DIN ISO/TS 15883-5. 2013 Dissertation
- [64] Zühlsdorf B, Martiny H. Intralaboratory reproducibility of the German test method of prEN ISO 15883-1 for determination of the cleaning efficacy of washer-disinfectors for flexible endoscopes. J Hosp Infect. 2005 Apr; 59(4): 286-91.
- [65] Jatzwauk L. Untersuchung zur Optimierung der chemischen Desinfektion durch Ultraschall niedriger Intensität bei der Aufbereitung von Medizinprodukten. 2006 Habilitationsschrift.
- [66] Pagán R, Mañas P, Raso J, Condón S. Bacterial resistance to ultrasonic waves under pressure at nonlethal (manosonication) and lethal (manothermosonication) temperatures. Appl Environ Microbiol. 1999 Jan;65(1):297-300.
- [67] Technische Regel IEC/TR 60886:1987-03
- [68] Friedrich T, Roth K, Gauer J, Heeg P. Untersuchungen zur Recovery-Rate von Restkontamination bei der Validierung von Reinigungs-Desinfektionsgeräten nach EN DIN 15883 Teil 1. Zentr Steril. 2007; 15(2): 93-108
- [69] Alfa MJ, Olson N, DeGagne P, Jackson M. A survey of reprocessing methods, residual viable bioburden, and soil levels in patient-ready endoscopic retrograde cholangiopancreatography duodenoscopes used in Canadian centers. Infect Control Hosp Epidemiol. 2002 Apr;23(4):198-206.

- [70] Alfa MJ, Sepehri S, Olson N, Wald A. Establishing a clinically relevant bioburden benchmark: a quality indicator for adequate reprocessing and storage of flexible gastrointestinal endoscopes. *Am J Infect Control*. 2012 Apr;40(3):233-6.
- [71] Alfa MJ, Olson N, Murray BL. Comparison of clinically relevant benchmarks and channel sampling methods used to assess manual cleaning compliance for flexible gastrointestinal endoscopes. *Am J Infect Control*. 2014 Jan;42(e1-e5)
- [72] Gavaldà L, Olmo AR, Hernández R, Domínguez MA, Salamonsen MR, Ayats J, Alcaide F, Soriano A, Rosell A; Bellvitge Hospital Bronchoscopy Quality Improvement Group. Microbiological monitoring of flexible bronchoscopes after high-level disinfection and flushing channels with alcohol: Results and costs. *Respir Med*. 2015 Aug;109(8):1079-1085.
- [73] Deutsche Gesellschaft für Krankenhaushygiene (DGKH). Mitteilungen des Vorstandes. Hygienisch-mikrobiologische Überprüfung von flexiblen Endoskopen nach ihrer Aufbereitung. 2010.
- [74] Wehrl M, Kircheis U. Methode zur Überprüfung der Reinigungsleistung von Reinigungs-Desinfektionsgeräten für flexible Endoskope. *Hyg Med* 2011; 36(10); 402-406.
- [75] Köhnlein J, Werner S. Quantitative Analyse praxisrelevanter Anschmutzung in Endoskopen zur Charakterisierung der Reinigungsleistung von Reinigungs-Desinfektionsgeräten. *Hyg Med* 2010; 35(9): 315-319.

## 7. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

„Ich, Franziska Schäfer, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Untersuchungen zur Standardisierung von Prüfmethode für Reinigungs- und Desinfektionsgeräte zur Aufbereitung flexibler Endoskope mit dem Prüforganismus *Enterococcus faecium*“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

---

Datum und Unterschrift

## **8. LEBENSLAUF**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## **9. DANKSAGUNG**

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Heike Martiny für die Ideen, ihre Inspiration und ihre unermüdliche Betreuung beim Erstellen der Dissertation.

Weiterhin danke ich Dr. Matthias Kumor für die kurzweiligen Laboreinheiten und Frau Judith Mahnkopf für ein stets offenes Ohr, insbesondere bei Formatierungsfragen.

Vor allem aber danke ich meinen Eltern, die mir diesen Weg erst ermöglicht und mich immer unterstützt haben.