

2 Literaturübersicht

2.1 Methoden zur Oberflächenkeimzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Oberflächenkeimzahl stehen unterschiedliche Methoden zur Verfügung. Nach der Einteilung von REUTER (1984b) unterscheidet man destruktive Methoden oder Abtragungsmethoden von nicht destruktiven Methoden. Bei den destruktiven Methoden trägt man die zu untersuchende Oberfläche entweder manuell mit einem Skalpell, einer Schablone, einer Stanze ab oder man entfernt die Oberfläche mechanisch mit einem Bohrer oder einer Fräse. Anschließend bestimmt man den Keimgehalt mit einem bakteriologischen Verdünnungsverfahren.

Die nicht destruktiven Methoden teilt man in Abwischverfahren (Tupfer-Technik), Abklatschverfahren (direkt: Agar-Platten und Streifen, indirekt: Klebestreifen, Membranfilter) und Abspülverfahren (manuell: Handspülgerät, mechanisch: Propellergerät, Vakuumgerät, Druckspülgerät und Ultraschallgerät) ein. CORETTI (1966) teilt die nicht-destruktiven Verfahren in Abstrich-/Abwischverfahren, Abspül-/Abschwemmverfahren, Abdruck-/Abklatschverfahren und in Direktaufgussverfahren ein.

Bei der Auswahl der Methode sollte man nach UPMANN (1996) das Probenmaterial und die Oberflächenbeschaffenheit berücksichtigen.

2.1.1 Nicht-destruktive Verfahren

2.1.1.1 Abwischverfahren

Tupfer- (Swab-) Technik

Bei den Tupferverfahren unterscheidet man das Trockentupferverfahren und das Nasstupferverfahren. Es können dabei Baumwolltupfer oder Alginat-Wattetupfer eingesetzt werden. Die Keime, die sich auf einer Fläche befinden, werden durch Abwischen mit einem Tupfer von der Oberfläche aufgenommen und entweder mit dem Tupfer direkt auf eine Agarplatte gestrichen oder in Flüssigkeit geschüttelt und anschließend auf ein Nährmedium gebracht.

Diese Methode der Oberflächenkeimzahlbestimmung eignet sich auch auf unebenen Flächen und zeichnet sich durch eine leichte Handhabung aus.

Alginat-Wattetupfer

Bei Alginat handelt es sich um das Salz der Alginsäure. Dieses Polysaccharid ist in Natriumcitrat und Natriumhexametaphosphat löslich. Nach der Probenentnahme wird der Tupfer in den

entsprechenden Lösungen aufgelöst und auf ein festes Nährmedium geimpft. Keimverluste durch Anhaften der Keime am Tupfer können somit vermieden werden. ANGELOTTI et al. (1957) und PATTERSON (1968, 1971) erzielten an Schlachttierkörpern mit dem Alginattupfer keine besseren Ergebnisse als mit Baumwolltupfern. Nach BARRY et al. (1972) liegt der Grund für diese Ergebnisse, die hinter den Erwartungen liegen, in der geringeren Adsorptionsfähigkeit des Alginats von Keimen auf Oberflächen.

Einfaches Tupferverfahren

Ein Standard-Baumwolltupfer wird über die zu untersuchende Fläche gestrichen. Nach BAUMGARD (1977), GERLACH und SABOLIC (1980) wird der Tupfer nach der Probenentnahme direkt auf einen Nährboden ausgestrichen. Alternativ kann der Tupfer in einem Verdünnungsmedium ausgeschüttelt und die Flüssigkeit anschließend auf einer Agarplatte verteilt werden (MURMANN und v.d. HEYDE, 1994; LOUWERS und KLEIN, 1994).

Nach SIBOMANA (1980) erzielte das Tupferverfahren eine deutlich geringere Wiederfindungsrate bei der Entnahme der Proben von Schlachttieroberflächen als das Abtrageverfahren. Allerdings lagen die Wiederfindungsraten in enger Beziehung zur tatsächlichen Oberflächengesamtkeimzahl.

Nasstupferverfahren

Hierbei wird der Standard-Baumwolltupfer vor der Probenentnahme angefeuchtet. Im Vergleich trockener oder angefeuchteter Tupfer erzielten KELCH und FRIES (1959) mit dem feuchten Baumwolltupfer eine höhere Keimzahl. Nach ELLNER und ELLNER (1966) kann die Überlebenszeit der Keime durch einen feuchten Tupfer verlängert werden. Der feuchte Tupfer muss nach der Probenentnahme innerhalb einer Stunde ausgewertet bzw. weiterverarbeitet werden (MARRIOTT et al., 1978) oder unter Lichtabschluss bei einer Temperatur zwischen 0°C und 10°C aufbewahrt werden. Durch die Kühlung des Tupfers auf 4°C kann die Keimvermehrung weitgehend unterbunden werden und die Aufarbeitung der Tupferproben auf bis zu 24 Stunden verlängert werden (MURMANN und HEYDE, 1994).

Nass-Trocken-Tupferverfahren

Die Nass-Trocken-Tupfertechnik wurde 1994 von LOUWERS und KLEIN beschrieben. Dabei wurde eine definierte Fläche zuerst mit einem angefeuchteten und anschließend mit einem trockenen Tupfer abgestrichen. Mittlerweile ist dieses Verfahren als DIN-Standard (DIN 10113-1, 1997) „Bestimmung des Oberflächenkeimgehaltes auf Einrichtungs- und Bedarfsgegenständen im Lebensmittelbereich“ eingetragen.

Nach KELCH und FRIES (1959), CORETTI (1966), LAMMERS et al. (1983), STOLLE (1985), HEIMANN (1990) und UPMANN (1996) ist der Zeitaufwand für die Probenentnahme gering und die Handhabung einfach. Allerdings ist die Probenaufbereitung und Keimbestimmung mit einem erheblichen Zeitaufwand verbunden (LOUWERS und KLEIN, 1994; HEILIGENTHAL, 1995 und UPMANN 1996).

2.1.1.2 Abdruckverfahren oder Abklatschverfahren

Bei den Abklatschverfahren unterscheidet man zwischen direkten Abklatschmethoden, bei denen die zu untersuchende Oberfläche direkt mit einem festen Nährboden in Kontakt gebracht wird und indirekten Abklatschmethoden, bei denen zuerst eine sterile Folie, ein Klebestreifen oder ein Metallgegenstand auf die Oberfläche gedrückt wird und dieser Gegenstand anschließend auf einen Nährboden überführt wird. Abklatschverfahren sind einfach in der Handhabung und nicht zeitaufwändig.

Agarwurstmethode oder Agaroid-Stangen-Verfahren

TEN CATE (1963) entwickelte diese Methode, indem er steriles Nährmedium in Rilsan-Kunstdärme füllte. Diese Wurst wird mit der Schnittfläche auf Oberflächen aufgedrückt. Danach wird die beprobte Fläche als Scheibe abgeschnitten. Die Würste können mit fast jedem Medium gefüllt werden und eignen sich somit auch zum Nachweis von allen Oberflächenkeimen. SIBOMANA (1980) beschrieb, dass die Würste fast unbegrenzt haltbar sind.

Nach SCHULZE (2000) besteht jedoch die Gefahr der Sekundärinfektion. Aus dem gleichem Grund veränderten PIETSCH und ZENNER (1973), RADAN (1974) und AK et al. (1994) diese Methode und füllten den Agar in Plastikzylinder von 60 ml-Spritzen. Mit dem Kolben konnte der Agar nach Bedarf aus dem Zylinder gedrückt werden. Die Agaroberfläche wurde mit dem Untersuchungsgegenstand in Berührung gebracht. Anschließend wurde mit einem sterilen Messer oder Skalpell die kontaminierte Scheibe, die von der Oberfläche abgenommen wurde, abgeschnitten.

Nachteilig ist, dass nur ebene oder leicht gewölbte Flächen untersucht werden können. Um dem zu entgehen, gossen SINELL und LEVETZO (1964) den Agar in flexible Kunststoffschalen, mit denen auch unebene Oberflächen untersucht werden konnten.

Nach der Probenentnahme können die Agarwurstscheiben auf eine sterile Petrischale überführt und mit der Stempelseite nach oben im Brutschrank bebrütet werden, um anschließend die Koloniezahl zu bestimmen. Oder, wie bei CORETTI (1966) beschrieben, wird die Agarwurstscheibe homogenisiert und die Keimzahl mit dem Koch'schen Plattengussverfahren bestimmt.

Replicate Organism Direct Agar Contact- Platte (RODAC-Platte)

Bei der RODAC-Platte handelt es sich um einen mit Nährboden gefüllten Kunststoff- oder Glasträger, bei denen der Agar uhrglasförmig über den Trägerrand herausragt. Die Agarplatte wird zur Probennahme wie ein Stempel auf die zu untersuchende Fläche gedrückt (APHA, 1972 und SCHULZE, 2000). Anschließend werden die „beimpften“ RODAC-Platten in den Transportbehälter zurückgebracht und in diesem bebrütet. Die Auswertung erfolgt durch Zählen der sichtbaren Kolonien. Nach DIN 10113-3 ist das Verfahren als standardisierte Methode zur Überprüfung der mikrobiologischen Belastung von Oberflächen anerkannt. Allerdings ist es nach DIN 10113-3 nur zur orientierenden Keimzahlbestimmung anwendbar. Das RODAC-Verfahren ist kostengünstig, einfach und schnell durchzuführen. Seine Einsatzfähigkeit auf unebenen, porösen und feuchten Oberflächen ist zweifelhaft (SCHULZE, 2000). Bei vergleichenden Untersuchungen zwischen Tupfverfahren und RODAC-Verfahren hielten NISKANEN und POHJA (1977) das Tupfverfahren auf unebenen, flexiblen und hochkontaminierten Flächen für geeigneter, dagegen hielten sie das RODAC-Verfahren auf festen und glatten Oberflächen für die günstigere Methode. Eine genaue Bestimmung der Keimzahl ist bei hoher Keimbelastung nicht möglich, da die Bakterien dann als Rasen wachsen. Als Alternative dazu homogenisierte KUSCH (1977) den Nährboden der RODAC-Platte nach der Probenentnahme in Peptonwasser und legte Verdünnungsreihen an, um eine Koloniezählung zu ermöglichen. Bei dieser Art der Probenaufbereitung geht allerdings der Vorteil des geringen Arbeitsaufwandes verloren.

Dip-Slides

Bei den Dip-Slides handelt es sich um kommerziell hergestellte beidseitig nährbodenbeschichtete, flexible Kunststoffträger, die ursprünglich für die Urindiagnostik entwickelt wurden. MACKEY und SANDYS (1965) entwickelten diese Methode, indem sie Nährboden auf eine Art „Löffel“ aufbrachten. Durch GUTTMAN und NAYLOR (1967) wurde diese Methode weiterentwickelt. Ein Objektträger wurde beidseitig mit festem Nährboden beschichtet. Bei den meisten Dip-Slides zur Urinuntersuchung befindet sich auf einer Seite CLED-Agar zur Gesamtkeimzahlbestimmung und auf der anderen Seite MacConkey-Nährboden, der zur Identifizierung der vorhandenen Keime dienen soll. Mittlerweile wurden von verschiedenen Firmen Dip-Slides für Hygienekontrollen entwickelt. Nach HEILIGENTHAL (1995) eignen sich diese Dip-Slides gut zur innerbetrieblichen mikrobiologischen Kontrolle der Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen in Fleischgewinnungsbetrieben. Von den Herstellern werden Dip-Slides mit verschiedenen Nährmedien angeboten. Zum Beispiel Agar zur Gesamtkeimzahlbestimmung oder Selektivnährmedien zum Nachweis von Enterobakterien oder zum Nachweis von Hefen und Pilzen.

Mitunter ist dem Agar Lecithin und Tween zur Neutralisation von Desinfektionsmittelrückständen zugesetzt.

Dip-Slides werden in einem sterilen Röhrchen aufbewahrt. Nur zur Probennahme wird der Dip-Slide herausgenommen. Auf diese Weise wird das Risiko der Sekundärkontamination klein gehalten. Der Dip-Slide ist mit dem Deckel des Probengefäßes flexibel verbunden und die Objektträger weisen in sich eine gewisse Flexibilität auf. Je nach Hersteller ist das vollständige Abdrücken von Oberflächen, zum Teil auch auf unebenen Flächen, möglich.

Direct Surface Agar Plating-Verfahren (DSAP-Verfahren)

Direct Surface Agar Plating ist das direkte Aufgießen von flüssigem Agar auf die zu untersuchende Oberfläche. Diese Methode eignet sich zur Untersuchung von fast allen Oberflächen, da sich der Agar der Oberflächenstruktur anpasst. Durch einen Rahmen kann das unkontrollierte Verteilen des Agars verhindert werden. Problematisch wird allerdings das sterile Abnehmen des Agars von der Oberfläche. Nach BALDOCK (1974) besteht bei der Abnahme die Gefahr der Sekundärkontamination. Der Versuch von CORETTI (1966) mit dem DSAP-Verfahren Sporen von Holzgegenständen zu gewinnen, gelang nicht. Allerdings kann bei dieser Methode jede Art von flüssigem Agar eingesetzt werden. Daher ist auch der Nachweis von speziellen pathogenen Keimen möglich.

Gelatine-Gießverfahren

Bei diesem Verfahren wird flüssige Nährgelatine (circa 40°C) auf die zu untersuchende Oberfläche gegossen. Ein Rahmen, bestehend aus z.B. 2 Messingwinkeln, definiert eine bestimmte Fläche und verhindert das unkontrollierte Verteilen der Nährgelatine auf der Oberfläche.

Die Oberflächenkeime haften an der Nährgelatine und können nach dem Erkalten bzw. dem Erstarren der Gelatine, mit dem Gelatineblock von der Oberfläche entfernt werden. Die Gelatinemasse wird in ein Reagenzglas o.ä. überführt und mit Peptonwasser 30 Minuten bei circa 40°C verflüssigt. Anschließend werden Verdünnungsstufen angelegt und die Keimzahl bakteriologisch bestimmt.

Nach ACKEMANN et al. (1982) eignet sich dieses Verfahren zur Oberflächenkeimzahlbestimmung im Stall.

2.1.1.3 Indirekte Abklatschmethoden

Petrifilmverfahren

Der Petrifilm besteht aus einem dehydrierten Nährmedium in Gelform, das zwischen zwei permeablen Blättern liegt. Zur Probenentnahme muss das Gel gewässert werden. Der Petrifilm wird dann auf die zu untersuchende Oberfläche gedrückt und nimmt dabei einen Teil der Oberflächenkeime auf. Nach der Inkubation im Brutschrank können die Bakterienkolonien ausgezählt werden. Durch die Zugabe von Triphenyltetrazolium sind die Kolonien auf dem Petrifilm leicht zu zählen.

Es sind mittlerweile verschiedene Arten von Petrifilmen im Handel erhältlich. Zum Beispiel zum Nachweis der Gesamtkoloniezahl, zum Nachweis von Hefen und Schimmelpilzen und zum Nachweis von coliformen Bakterien sowie von *Escherichia coli*. Nachteilig ist die geringe Einsetzbarkeit auf unebenen Oberflächen und die nur geringe Wiederfindungsrate (CORRÉGÉ, 1995).

Membranfilter-Methode

Hierbei handelt es sich um Zellulosenitratfilter. Die Filter werden wie die RODAC-Platten direkt auf die zu untersuchende Fläche gedrückt und circa dreißig Sekunden festgehalten. Anschließend kann der Membranfilter bebrütet werden, oder seine Oberfläche wird auf einen Nähragar aufgebracht, und anschließend wird der Nährboden bebrütet. Nach dem Bebrüten können die Kolonien ausgezählt werden. Die Genauigkeit dieses Verfahrens entspricht in etwa der des RODAC-Verfahrens. Allerdings liegt der Vorteil im deutlich langsameren Wachstum der Keime auf dem Membranfilter. Pro Membranfilter lassen sich bequem 4000 KE auszählen.

2.1.1.4 Abspül- und Absprühverfahren

Bei diesen Verfahren werden die Oberflächenkeime mit Flüssigkeit von der Oberfläche gelöst. Anschließend wird die Keimzahl bestimmt.

Die Abspül- oder Absprühverfahren werden weiter in Methoden mit und ohne Materialverlust eingeteilt. Das heißt, dass bei den Methoden ohne Materialverlust die Fläche mit steriler Spülflüssigkeit abgespült wird und anschließend die Keimzahl bestimmt wird. Bei den Methoden mit Materialverlust werden kleine Teile der zu untersuchenden Oberfläche in ein Gefäß mit Spülflüssigkeit gebracht und mit Hilfe von Instrumenten, wie z.B. eines elektrischen Schüttelgerätes, wird der Abspüleffekt erhöht. Anschließend wird die Keimzahl bestimmt.

Handspülgerät

Diese Methode wurde von REUTER et al. (1979) entwickelt. Nach Untersuchungen von SIBOMANA (1980) wurden 5 ml Pepton-Kochsalzlösung mit einer Einwegspritze in die Kammer des Handspülgerätes verbracht. Die Lösung wurde durch Aufspritzen und Aufziehen der Spülflüssigkeit insgesamt 15 mal in Kontakt mit der Fleischoberfläche gebracht. Anschließend wurde die Spülflüssigkeit in einem sterilen Reagenzglas aufgefangen und die Keimzahl bestimmt. Die hierbei gewonnenen Keimzahlen lagen deutlich unter denen des Abtrageverfahrens, allerdings in enger Beziehung zur tatsächlichen Gesamtzahl. Nach STRASSER (1979) streuen die Ergebnisse dieser Methode erheblich.

Probenahmegerät nach THRAN

Das von THRAN (1979) beschriebene Probeentnahmegerät arbeitet mit Kompressionsdruck und ist sowohl auf vertikalen als auch auf horizontalen Flächen einsetzbar. Das „Thran-Gerät“ bringt innerhalb von 60 Sekunden 100 ml Spülflüssigkeit mit 3-4 bar auf eine definierte Fläche von 5 cm². Mit Druckluft wird anschließend die Flüssigkeit in ein Sammelgefäß überführt und die Keimzahl bestimmt.

2.1.2 Destruktive Verfahren

Bei destruktiven Verfahren werden Teile der zu untersuchenden Oberfläche abgeschabt, abgeschnitten, gekratzt oder gefeilt. Anschließend wird die Keimzahl mit einem bakteriologischen Verdünnungsverfahren bestimmt. (MACHMERTH und BÜCHNER, 1972).

Diese Methoden sind sehr zeitaufwendig und eignen sich hauptsächlich zur Untersuchung von Schlachtkörpern (SIBOMANA 1980).

Nach RÖDEL et al. (1994) kann die Gesamtkeimzahl auf Holzschneidebrettern am besten mit einer destruktiven Methode der Keimzahlbestimmung bestimmt werden. Demnach konnten durch das Abhobeln einer 0,25 mm tiefen Schicht die Wiederfindungsraten gegenüber dem RODAC-Abklatschverfahren deutlich gesteigert werden.

2.1.3 Indirekte Methoden

Bei den indirekten Methoden werden bakterielle Stoffwechselprodukte oder Zellbestandteile nachgewiesen. Da die Bestimmung der Keimzahl auf das Koloniewachstum von Bakterien gegründet ist, sind die direkten Methoden immer mit einem mindestens zwölfstündigem Zeitaufwand verbunden. Mit den indirekten Methoden ist der Keimnachweis unmittelbar zu erbringen. Daher spricht man auch von Schnellmethoden des Keimnachweises.

ATP-Biolumineszenztechnik

Diese Methode macht es sich zu Nutze, dass alle lebenden Zellen Adenosintriphosphat (ATP) als Energiequelle für Stoffwechselprodukte nutzen.

Bei den ATP-Biolumineszenzverfahren wird der mikrobielle ATP-Gehalt (ca. 1×10^{-15} g/Zelle) quantitativ bestimmt. Nach vollständiger Extraktion wird dann vom ATP-Gehalt auf den Keimgehalt geschlossen.

Durch den Substrat-Enzym-Komplex Luziferin-Luziferase wird das ATP der Zellen enzymatisch in Lichtenergie umgewandelt und durch Biolumineszenz bestimmt, da zwischen Lichtintensität und ATP-Gehalt eine quantitative Beziehung besteht.

1. Schritt: ATP + Luziferin werden durch das Enzym Luziferase in Anwesenheit von Magnesium in den Luziferin-Luziferase-AMP-Komplex und Pyrophosphat umgebaut.
2. Schritt: Durch Sauerstoff (O_2) entsteht Oxyluziferin-Luziferase-AMP. Dieser Substrat-Enzymkomplex zerfällt zu Oxyluziferin, CO_2 und Luziferase, dabei wird Licht frei (die Lichtintensität ist proportional zur Menge des ATP).

Mit einem positivem Ergebnis ist erst ab einer Keimkonzentration von 1×10^3 Keime/ml bei Prokaryonten und ab 1×10^2 Keime/ml bei Eukaryonten zu rechnen. Ein weiteres Problem ergibt sich aus der Tatsache, dass ATP, außer in Keimen, auch in anderen lebenden Zellen vorkommt. Daher eignet sich dieses Verfahren nur, wenn mit einem negativen Ergebnis zu rechnen ist, d.h. zur Kontrolle von Reinigung und Desinfektion (SEEGER und GRIFFITHS, 1994).

Impedanzmessung

Das Impedanzverfahren wird als indirekte mikrobiologische Nachweistechnik eingesetzt. Es handelt sich bei diesem Verfahren um eine quantitative Methode. Das Messprinzip macht sich die Tatsache zunutze, dass Mikroorganismen in einem elektrolythaltigem Medium beim Wachstum und bei der Vermehrung hochmolekulare Inhaltstoffe abbauen und dadurch zunehmend kleinere geladene Moleküle entstehen. Dabei sinkt der elektrische Widerstand oder auch Impedanz genannt. Bei der Auswertung unterscheidet man zwischen der Impedanzänderung des Mediums (M-Wert) und der Impedanzänderung an den Elektroden (E-Wert). Zusammen bilden sie die Gesamtimpedanz.

Der M-Wert wird für die Keimzahlbestimmung benutzt. Je mehr Mikroorganismen in einer Probe vorliegen, desto schneller ändert sich der Widerstand. Die Zeit bis zum Erreichen eines vorher festgelegten Schwellenwertes nennt man Detektionszeit. Wenn man die Keimzahl mit der Impedanzmessung bestimmen will, so muss man im Vorfeld eine Kalibrierung anhand einer Standardmethode vornehmen. Die Kalibrierung dient der Festlegung der Detektionszeit. Bei den anschließenden Messungen wird beurteilt, ob die Detektionszeit unterschritten wurde, das heißt,

ob die Probe mehr Mikroorganismen enthält, als die Standardprobe. Oder ob die Detektionszeit überschritten wurde und die zu untersuchende Probe weniger Keime enthält.

Da die exakte Keimzahlbestimmung mit dieser Methode nicht durchzuführen ist, wird sie eigentlich nur da eingesetzt, wo die Keime eine Beanstandungsgrenze nicht überschreiten dürfen, zum Beispiel in der Lebensmittelhygiene.

Der E-Wert kann für qualitative Untersuchungen verwendet werden. An der Elektrode sind bereits geringe Veränderungen der Ionenbesetzung messbar (FIRSTENBERG-EDEN und ZINDULIS, 1984; FIRSTENBERG-EDEN und FIRSTENBERG-EDEN, 1985; PLESS, 1991; und SCHÜTZLE, 2001).

Der E-Wert ist sensitiver, hier werden die Detektionszeiten schneller erreicht. Veränderungen werden auch bei hochmolekularen Medien noch deutlich. Daher können mit dem E-Wert Mikroorganismen erfasst werden, die mit anderen Geräten (die nur mit dem M-Wert arbeiten) nicht erfasst werden (CADY, 1975; FIRSTENBERG-EDEN und ZINDULIS, 1984; JÖCKEL, 1996).

Allerdings ist die Streuung bei den Elektrodenwerten deutlich höher als bei den Medium-Werten.

Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test (LAL-Test)

Dieses Verfahren dient nur zum Nachweis des Endotoxins von gramnegativen Bakterien, indem es die, bei allen gramnegativen Keimen in der Zellwand enthaltenen Lipopolysaccharide, nachweist. Das Prinzip beruht auf der Abwehrreaktion des Pfeilschwanzkrebse (*Limulus polyphemus*), bei dem das Blut, oder auch Hämolymphe genannt, bei Infektion mit gramnegativen Keimen koagulierte.

Beim Kontakt mit Endotoxinen wird über verschiedene Zwischenschritte ein im Limulus-Amöbozyten-Lysat enthaltenes Proenzym aktiviert. Das Enzym schneidet Proteine in verschiedene Untereinheiten. Bei der Reorganisation der Untereinheiten entsteht eine Gelbildung. Die Menge des aktivierten Enzyms wird durch die Konzentration des vorhandenen Endotoxins gesteuert.

Mittlerweile sind verschiedene kommerzielle Testverfahren zur Endotoxinkonzentrationsbestimmung entwickelt worden und werden hauptsächlich in den Bereichen Pharmaindustrie, Lebensmittelhygiene und Umwelthygiene eingesetzt.

Für die Bestimmung der Konzentration von luftgetragenen Endotoxinen wurden folgende Testverfahren entwickelt:

Gel-Clot-Methode:

Bei der Gel-Clot-Methode wird der oben beschriebene Reaktionsablauf nachgestellt. Ein kleines Volumen Limulus-Amöbozyten-Lysat wird mit der zu untersuchenden Lösung gemischt. Wenn sich nach der Inkubationszeit Gel gebildet hat, waren in der Probe ausreichend Endotoxine vorhanden um die Enzymkaskade auszulösen. Durch weitere Verdünnungsreihen kann die Endotoxinkonzentration einer Probe semiquantitativ bestimmt werden.

Turbimetrische Methode

Bei der turbimetrischen Methode findet bei Endotoxinanwesenheit eine Trübung der Probe statt. Entsprechend der Trübung kann die Endotoxinkonzentration quantitativ bestimmt werden.

Chromogene Methode

Bei der chromogenen Methode wurde das Koagulogen aus dem Limulus- Amöbozyten- Lysat entfernt und durch ein chromogenes Substrat ersetzt. Durch die Endotoxine wird das Enzym aktiviert und spaltet einen Farbstoff ab. Die Farbstoffentwicklung findet entsprechend der Menge an aktiviertem Enzym statt. Mit dieser Methode kann die Endotoxinkonzentration einer Probe quantitativ bestimmt werden.

Die Verfahren sind sehr empfindlich. Bereits Konzentrationen im Picogramm-Bereich (10^{-12} g/ml) sind ausreichend um die Enzymreaktion auszulösen.

2.2 Reinigung und Desinfektion

2.2.1 Begriffsbestimmung

Reinigung:

Unter Reinigung versteht man die mechanische Beseitigung von Schmutz und tierischen Ausscheidungen, die Träger von Krankheitserregern sein können. Bei der Reinigung ergänzen sich chemische und physikalische Komponenten (BÖHM, 2001). Die chemische Komponente wird durch das Reinigungsmittel bestimmt und die physikalische Komponente wird durch das Reinigungsverfahren definiert.

Desinfektion:

Die Desinfektion bezweckt die Vernichtung von Krankheitserregern. Sie sollte alle Gegenstände miteinbeziehen, die mit dem Erreger in Berührung gekommen sein könnten. Der Desinfektion hat stets eine Reinigung voranzugehen (DAS BUNDESAMT FÜR

VETERINÄRWESEN, 2001). Im PSCHYREMBEL (1994) wird Desinfektion wie folgt definiert: „Maßnahme, die durch Abtötung, Reduzierung, Inaktivierung bzw. Entfernung von pathogenen Mikroorganismen (Bakterien, Viren, Pilze, Protozoen) ein Material in einen nichtinfektiösen Zustand versetzt“.

Es werden verschiedene Formen der Desinfektion unterschieden:

- chemische Desinfektion
- physikalische Desinfektion (Strahlendesinfektion, Dampfdesinfektion, Heißluftdesinfektion, Auskochen, Pasteurisieren)
- mechanische Desinfektion

2.2.2 Reinigung

Mikroorganismen sind immer an Trägersubstanzen angelagert, d.h sie sind an Staub, Kot, Futtermittel, Blut, Harn oder ähnlichem gebunden (STRAUCH, BÖHM, 2002). Demnach ist eine gründliche Reinigung die Voraussetzung für eine wirksame Desinfektion. Nach DREßLER (1997) werden durch die Einwirkung des Reinigungsmittels, die auf den Oberflächen anhaftenden Schmutzpartikel in Lösung gebracht und können anschließend abgespült werden. Durch eine ausreichende Reinigung kann die Keimzahl um bis zu drei Zehnerpotenzen vermindert werden. Durch eine sinnvolle Kombination der Reinigung und Desinfektion kann nach METZLER (2002) die Keimbelastung um sechs Zehnerpotenzen herabgesetzt werden. Wird nach einer Nassreinigung eine Desinfektion durchgeführt, muss darauf geachtet werden, dass die Flächen vor der Desinfektion abgetrocknet sind. Ansonsten findet eine Verdünnung des Desinfektionsmittels statt und möglicherweise wird dadurch die Wirkung der Desinfektion gemindert.

2.2.3 Chemische Reinigungsmittel

Reinigungsmittel werden grob in alkalische, saure und neutrale Chemikalien eingeteilt.

Je nach Art der Verschmutzung (wasserlösliche Stoffe, Fette, Kohlenhydrate, Eiweiße oder wasserunlösliche Mineralstoffe) werden unterschiedliche chemische Reiniger eingesetzt (DREßLER, 1997). Die chemischen Reinigungsmittel können aus einzelnen Grundstoffen bestehen, oder mit anderen Chemikalien, wie zum Beispiel Tenside oder Komplexbildner, gemischt werden.

Alkalische Reinigungsmittel

Sie eignen sich zur Reinigung organischer Verschmutzungen. Alkalische Reinigungsmittel quellen Eiweißstoffe und emulgieren Fette (BERDING, 1991). Auf diese Weise werden die Schmutzpartikel in Lösung gebracht. Als Einzelwirkstoff werden hauptsächlich Natronlauge,

Natriumcarbonat und Natriumphosphate eingesetzt. Da Alkalien ein schlechtes Emulgiervermögen haben, werden sie mit Komplexbildner unterschiedlicher Art und Menge versetzt.

Saure Reinigungsmittel

Sie enthalten organische oder anorganische Säuren als Wirkstoff. Häufig eingesetzte organische Säuren sind Zitronensäure, Weinsäure, Gluconsäure oder Sulfaminsäure. Von den anorganischen Säuren kommt Salzsäure, Phosphorsäure, Schwefelsäure und Salpetersäure häufig zum Einsatz.

Anorganische Säuren greifen Oberflächen stark an. Meist wird diesen Substanzen ein Inhibitor (hochmolekulare Alkohole, Aldehyde, Amine, Amide, Sulfonsäuren, Fettsäuren, quaternäre Ammoniumverbindungen) zugesetzt, um Korrosionen an den Oberflächen zu vermeiden. Organische Säuren sind weniger korrosiv, jedoch ist ihre Reinigungskraft geringer als die von anorganischen Säuren. Die sauren Reinigungsmittel eignen sich besonders für die Entfernung von anorganischen Ablagerungen (Kalkstein, Milchstein, Wasserstein).

Neutrale Reinigungsmittel

Sie werden häufig in Kombination mit einem oder mit mehreren anionenaktiven und/oder nichtionogenen Tenside angewendet. Ihr pH-Wert liegt zwischen 6 und 8. Als wichtigste Vertreter sind Dinatriumhydrogenphosphat und Natriumsulfat zu nennen. Zusätzlich können ihnen Komplexbildner, Lösungsvermittler, Korrosionsinhibitoren, Schaumregulatoren und Enzyme zugesetzt sein. Ihre Reinigungskraft ist geringer als die von sauren oder alkalischen Reinigern. Allerdings überzeugen diese Reiniger durch ihre Haut- und Materialverträglichkeit (BERDING, 1991).

2.2.4 Einflussfaktoren auf die Reinigung (DIN 10516)

- Mechanik

Bei der Reinigung sollte der Wasserdruck, der Volumenstrom und die Fließgeschwindigkeit eine gründliche Entfernung von Schmutzpartikeln gewährleisten.

- Temperatur

Höhere Temperaturen verbessern die Reinigungswirkung. Für die Reinigung von fettigen Verunreinigungen sollte die Wassertemperatur den Schmelzpunkt des zu entfernenden Fettes haben. Bei eiweißhaltigen Verschmutzungen sollte allerdings auf die Koagulationstemperatur geachtet und diese nicht überschritten werden.

- Einwirkzeit

Unter der Einwirkungszeit versteht man die Kontaktdauer zwischen Reinigungsmittel und Verschmutzung. In dieser Zeit finden chemische und/oder chemisch-physikalische

Prozesse statt, zum Beispiel das Quellen von Stärke- und Eiweißresten oder der Abbau von Eiweißsubstanzen.

Außerdem muss dem Reinigungsmittel die Möglichkeit gegeben werden, auch in tiefere Schichten eindringen zu können.

- Reinigungsmittel

Das Reinigungsmittel sollte über ein hohes Wasserhärtebindungsvermögen verfügen. Je nach der Art der Verschmutzung muss ein schnelles Anquellen und Ablösen des Schmutzes gewährleistet sein. Es ist sinnvoll, dass die entfernten Substanzen in der Reinigungslösung gelöst bleiben. Das Reinigungsmittel sollte für die Oberflächen nicht korrosionsauslösend sein, ökologisch verträglich und für Mensch und Tier keine Gefahr darstellen.

2.2.5 Anwendungsweise der Reinigung

Bei den Reinigungsverfahren unterscheidet man zwischen Nass- und Trockenreinigung.

Bei der Trockenreinigung werden Verschmutzungen manuell oder maschinell von den Oberflächen entfernt. Hilfsmittel der manuellen Reinigung sind Besen (unterschiedlich hart), Handfeger, Bürsten, Kratzer, Pinsel und Schaufeln. Bei der maschinellen Reinigung kommen Kehrmaschinen oder Staubsauger zum Einsatz. Durch eine Trockenreinigung wird in der Regel nur locker aufliegender Schmutz erfasst. Nach BERDING (1991) besteht die Gefahr, dass sich Mikroorganismen auf den Reinigungsgeräten ansiedeln und vermehren und dadurch ein Hygienierisiko darstellen. Auf eine trockene Vorreinigung sollte daher eine Nassreinigung folgen. Hierbei können Druckgeräte zur Hilfe genommen werden. Man unterscheidet zwischen Hochdruckgeräten (circa 25 bar bis 120 bar) und Niederdruckgeräten (< 25 bar), die jeweils mit und ohne mechanische Hilfsmittel eingesetzt werden können.

Bei der Reinigung mit Druckgeräten besteht die Gefahr der Materialschädigung und der weiträumigen Verteilung von Schmutzpartikeln und Mikroorganismen (Aerosolbildung). Um diese Nachteile einzudämmen sollte ein gewisser Spritzabstand, Spritzwinkel und die entsprechende Beschaffenheit der Düse und der Wasservolumenstrom eingehalten werden. Eine Sonderform der Reinigung mit Druckgeräten ist die Schaumreinigung. Ein entsprechender Druckbehälter ist mit einem Schaumreinigungsmittel gefüllt. Mit einem Schlauch oder einer Lanze wird der Schaum auf die zu reinigende Oberfläche gebracht. Nach der Einwirkungszeit werden der Schaum und die Schmutzpartikel mit Wasser abgespült. Nach BERDING (1991) bestehen Probleme bei senkrechten Flächen, da der Schaum dort abläuft und nicht die Möglichkeit einer ausreichenden Einwirkungszeit hat.

2.2.6 Wirkungsmechanismen der chemischen Desinfektion

Bei einer Desinfektion spielen viele Faktoren eine Rolle. So wird die Desinfektion durch die Konzentration des Desinfektionsmittels, die Einwirkzeit und die Temperatur bestimmt. Viele Desinfektionsmittel reagieren mit Eiweiß. Daher sollte vor der Desinfektion eine gründliche Reinigung stattfinden (STEUER et al., 1998). Die keimabtötende Wirkung eines chemischen Desinfektionsmittels hängt unter Feldbedingungen von vielen Faktoren ab (DVG, Richtlinien für die Prüfung chemischer Desinfektionsmittel 2000):

- Wasserhärte
- Temperatur
- Verschmutzungsgrad

RENGELING (1982) unterteilt die Faktoren, die eine chemische Desinfektion beeinflussen, in vier Punkte.

Als ersten Punkt nennt sie das Desinfektionsmittel. Die Wirkung eines Desinfektionsmittels hängt demnach von der Art und Anwendung ab. Auf welcher Wirkstoffbasis ist das Desinfektionsmittel hergestellt? Welche Affinität hat der Wirkstoff zum Keimträger? In welcher Gebrauchskonzentration wird das Desinfektionsmittel eingesetzt? Wie lange ist die Einwirkungszeit?

Des Weiteren spielt die Reaktionstemperatur eine Rolle. Bei niedrigen Temperaturen kann die Wirkung des Desinfektionsmittels herabgesetzt sein.

Ebenso spielt das Reaktionsmilieu, d.h. der pH-Wert, Begleitstoffe und/oder der Verschmutzungsgrad u.ä. und die Beschaffenheit, Art und Lage der Oberfläche eine Rolle. An Wänden hat jedes Desinfektionsmittel Schwierigkeiten genügend Einwirkungszeit zu haben. Daher sollte die Einwirkungszeit so gewählt werden, dass das Desinfektionsmittel genügend Zeit hat, in den Mikroorganismus einzudringen bzw. mit ihm in Wechselwirkung zu treten.

Als letzten Punkt nennt RENGELING (1982) die Tenazität des Keimes. Bei Keimen mit hoher Widerstandsfähigkeit müssen Desinfektionsmittel, Gebrauchskonzentration und Einwirkungszeit sorgsam ausgewählt werden. Generell gilt, dass kein Desinfektionsmittel alle Arten von Mikroorganismen abtötet. Eventuell müssen Produkte mit ergänzendem Wirkungsspektrum kombiniert werden.

Auch können Keime gegen bestimmte Desinfektionsmittel resistent werden. Daher ist die Wirkung eines Desinfektionsmittels von Zeit zu Zeit zu überprüfen. In der Praxis sollte man in regelmäßigen Abständen das Desinfektionsmittel wechseln. „Ist für ein Desinfektionsmittel unzureichende Wirksamkeit festzustellen, müssen insbesondere die Qualität der vorangegangenen Reinigung, die Möglichkeit der Neutralisation des Desinfektionsmittels durch Rückstände des Reinigungsmittels, die nach der Reinigung vorliegende Art und Höhe der mikrobiellen Belastung und im Hinblick darauf die Eignung und Dosierung des Desinfektions-

mittels sowie die Einhaltung von deren Einwirkungszeit überprüft werden." (KRÜGER et al.,2001, Kap. 2 des Kommentars der DIN 10516). Nach der DIN 10516 können durch eine sachgerechte Reinigung und Desinfektion die Mikroorganismen zwischen fünf und acht Logarithmenstufen reduziert werden.

2.2.7 Chemische Desinfektionsmittel

Nach REUTER (1984 a) und EDELMEYER (1982) werden die Desinfektionsmittel nach ihrem Wirkprinzip in folgende Gruppen eingeteilt:

- Alkoholische Desinfektionsmittel

Alkohole werden in Konzentrationen von 70-80% eingesetzt. Ihre Wirkungsweise besteht in der Denaturierung von Eiweiß. Bei Konzentrationen über 80% bewirken sie einen Zellmembranverschluss und sind nur reversibel zellschädigend. Ihr Wirkungsspektrum umfasst vegetative Mikroorganismen, wobei auch Mycobakterien abgetötet werden. Gegen Bakteriensporen sind Alkohole nicht wirksam. Alkohole werden hauptsächlich zur Hautdesinfektion und zur Raumlufthdesinfektion eingesetzt. Wegen ihrer leichten Entflammbarkeit mit Brand- und Explosionsgefahr sind sie für die Flächendesinfektion nicht geeignet.

Als Beispiele für alkoholische Desinfektionsmittel sind Ethanol, n-Propanol und Triethylenglykol zu nennen.

- Phenole und ihre Derivate

Phenol oder auch Karbolsäure ist das älteste phenolische Desinfektionsmittel. Durch die Einführung von Alkylketten, Arylresten und Halogenen konnte die Effektivität des Phenols stark gesteigert werden. Daher spielt Phenol als Desinfektionsmittel kaum noch eine Rolle, statt dessen werden die wirksameren Phenolderivate eingesetzt. Mit der Länge der Alkylkette und mit der Anzahl der Halogenatome nimmt die Wirksamkeit zu. Phenole und ihre Derivate sind membranaktive Stoffe, sie gehen Reaktionen mit Zell- und Enzymproteinen ein und sind ein Protoplasmagift. In 2%iger Lösung wirken sie auf vegetative Bakterien und bei hohen Konzentrationen auch auf Mycobakterien, Pilze und Viren. Bakteriensporen werden nicht abgetötet. Im sauren Milieu und bei höheren Temperaturen nimmt die Wirksamkeit zu (METZLER, 2002).

Zu den Derivaten gehören zum Beispiel:

- Kresole (o-,m-,p-Methylphenol, bzw. -Kresol);
- Lysol: 50% Kresol, das mit einer neutralen Seifenlösung emulgiert ist;
- halogenierte Phenole, wie zum Beispiel p-Chlorkresol.

- Aldehyde

Aldehyde werden universell als Desinfektionsmittel eingesetzt. In Konzentrationen von 1-3% kommen sie als Flächendesinfektionsmittel zum Einsatz. Das Wirkungsspektrum umfasst Bakterien, Pilze (auch Sporen) und Viren, allerdings ist eine lange Einwirkungszeit erforderlich. Die Wirkungsweise besteht in der Reaktion mit Zellproteinen und Nukleinsäuren.

Da die Wirkung der Aldehyde stark temperaturabhängig ist, sollten zur Desinfektion Temperaturen um 20°C oder höher vorherrschen. Unterhalb von 10°C ist die Wirkung stark eingeschränkt; bei 0°C kann eine Wirkung nicht mehr nachgewiesen werden.

Aldehyde reagieren stark mit Eiweiß und sind daher zur Desinfektion von beispielsweise Fäkalien nur bedingt geeignet.

Der bekannteste Vertreter der Aldehyde ist das Formaldehyd. Formaldehyd vermag durch seinen hohen Dampfdruck in feine Risse und Spalten einzudringen und eignet sich gut als Raumdesinfektionsmittel beim Aerosoldesinfektions- und Formaldehydverdampfungsverfahren (STEIGER, 1986). Da Formaldehyddämpfe Nasen- und Rachenschleimhäute reizen, kann es nach der entsprechenden Einwirkungszeit durch Ammoniakgas beseitigt werden.

Bei der Raumdesinfektion sollte die relative Luftfeuchtigkeit bei 90% liegen.

Glutardialdehyd ist im pH-Bereich von 7,5-8,5 wirksamer als Formaldehyd. Die Wirkung kann durch 0,3% Natriumhydrogencarbonat, 70%igen Alkohol und Tenside noch verbessert werden.

- Amphotere Tenside/Amphotenside

Hierbei handelt es sich um hochmolekulare Aminosäuren, die zu den oberflächenaktiven Substanzen zählen. Die Moleküle liegen je nach pH-Wert anionisch, kationisch oder amphoter vor. Das Wirkungsspektrum umfasst Bakterien, einschließlich Mycobakterien, Pilze und Viren. Gegen Sporen sind sie unwirksam (siehe auch Abbildung 1). Ihre Wirkung beruht auf Enzymblockaden und Reaktionen mit Oberflächenlipiden. Sie sind geruchsneutral, weitgehend ungiftig und nicht aggressiv. Der geringe Eiweißfehler und die gute Hautverträglichkeit sind charakteristisch für diese Wirkstoffgruppe. Die Wirkung wird durch Seifen herabgesetzt.

- Quaternäre Tenside (Quats)

Quaternäre Tenside gehören ebenfalls zu den oberflächenaktiven Substanzen. Es handelt sich um kationische Tenside. Ihr Wirkungsspektrum umfasst grampositive Keime. Pseudomonasarten neigen zur Resistenzbildung. Quats haben eine eingeschränkte Wirkung gegenüber Viren (behüllte Vertreter). Gegenüber Mycobakterien besteht nur eine geringe und gegen Bakteriensporen keine Wirkung (siehe Abbildung 1).

Kationische Tenside entfalten die optimale Leistung im alkalischen Milieu. Durch hohe Temperaturen kann die Wirkung gesteigert werden. Eine Kombination mit Seifen verringert ihre Wirkung. Beispiele: Benzalkoniumchlorid, Benzetoniumchlorid.

- Säuren und Alkalihydroxide

Säuren und Alkalihydroxide wirken durch plötzliche pH-Verschiebung und Veränderungen des osmotischen Druckes innerhalb der Zellen.

Organische Säuren haben ihr Wirkungsoptimum im sauren Bereich. Wichtige Vertreter dieser Gruppe sind Ameisensäure, Essigsäure, Milchsäure und Propionsäure. Sie werden u.a. zur Desinfektion von Raumluft und von Molkereinebenprodukten eingesetzt.

Alkalihydroxide finden in 2%iger Konzentration als Grob- und Flächendesinfektionsmittel Anwendung. Das Wirkungsspektrum umfasst Bakterien, Pilze und Viren, allerdings wirken die Desinfektionsmittel nicht gegen Bakteriensporen. Die Wirkungsweise beruht auf Proteindenaturierung. Nachteilig sind ihre ätzenden und korrosiven Wirkungen. Wichtige Vertreter sind Natron- und Kalilauge.

- Oxidantien (Halogene, Peroxide, Peressigsäure, Kalium- und Calciumpermanganat, Hypochloride, Chloramine)

Die einzelnen Vertreter dieser Gruppe entfalten ihre keimtötende Wirkung durch irreversible Oxidation von Enzymeiweißen oder direkten Reaktionen mit Zellproteinen. Das Wirkungsspektrum umfasst Bakterien, Pilze und Viren, bei Vertretern wie zum Beispiel Jodverbindungen (Jodoform) und O₂-abspaltenden Verbindungen (Peressigsäure) ist auch eine Wirkung gegenüber Bakteriensporen nachweisbar.

Die Anwendungsbereiche dieser Gruppe sind vielfältig. Chlor und Chlorverbindungen werden hauptsächlich zur Flächendesinfektion und zur Desinfektion von Jauche und Fäkalien eingesetzt. Jod und Jodverbindungen werden meist bei Haut- und Wunddesinfektion angewendet. Peroxide finden in der Grob- und Gerätedesinfektion breite Anwendung.

2.2.8 Einflussfaktoren auf die Wirkung der chemischen Desinfektion

Nach BÖHM (2001)

- Umgebungstemperatur, pH-Wert
- Wasserhärte des Verdünnungswassers
- Reinheitsgrad und Beschaffenheit der zu desinfizierenden Fläche
- Art und Konzentration des Desinfektionsmittels
- Menge und Einwirkungszeit der Desinfektionsmittellösung
- Art und Anzahl der Mikroorganismen
- Relative Luftfeuchte und Luftgeschwindigkeit (Abtrocknung)

2.2.9 Fehlerquellen bei der Desinfektion

Nach BERDING (1991)

- Ungenügende Vorreinigung
- Durch die Eiweißrückstände wird die Wirkung des Desinfektionsmittels beeinträchtigt.
- Zu kurze Einwirkungszeit

Das Desinfektionsmittel kann nur teilweise wirken.

- Unterdosierung des Desinfektionsmittels

Die Wirkung des Desinfektionsmittels ist nicht ausreichend. Die Keime entwickeln eine Resistenz gegen das verwendete Desinfektionsmittel oder die Keime können sich in der Desinfektionslösung vermehren.

- Überdosierung des Desinfektionsmittels

Die Umwelt wird unnötiger Weise belastet. Das Desinfektionsmittel kann auf den Oberflächen Korrosionsschäden verursachen.

- Einsatz eines ungeeigneten Desinfektionsmittels

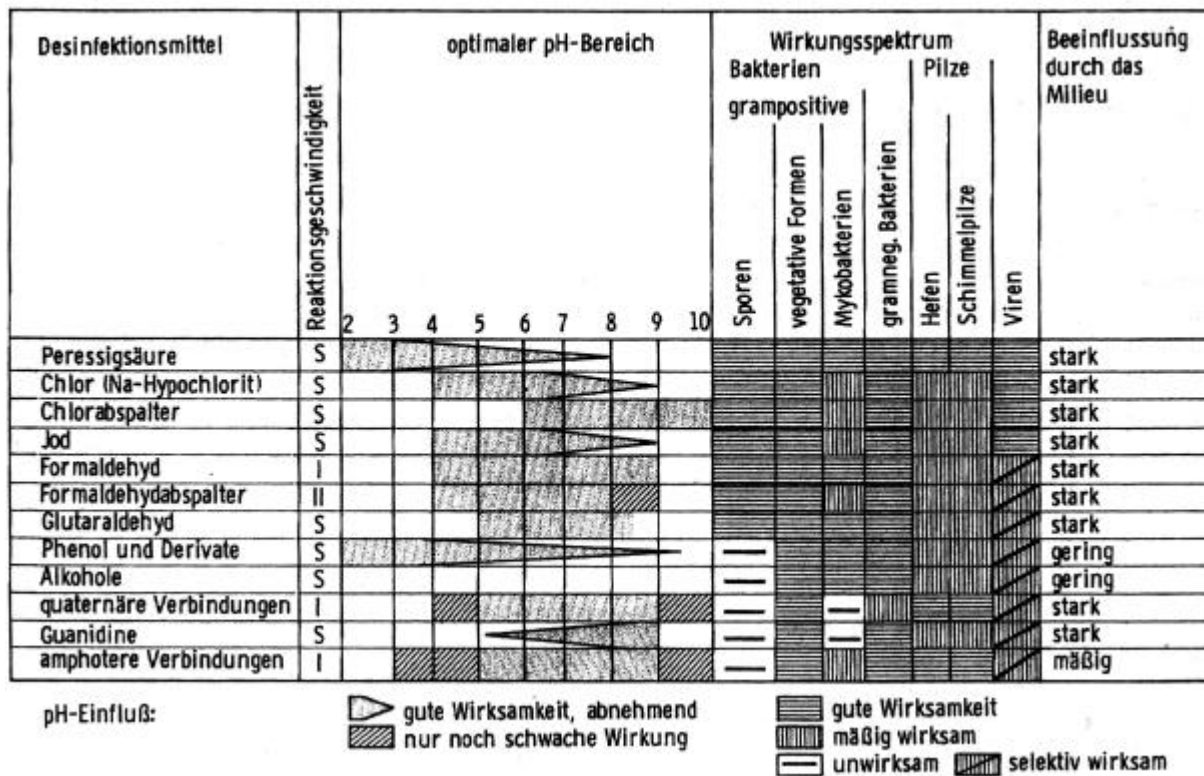
Das Desinfektionsmittel ist für die Desinfektion der Oberflächen nicht geeignet und verursacht Verfärbungen oder Beschädigungen (Beispiel: Formalin auf Schneidbrettern) oder das Desinfektionsmittel hat nur eine selektive Wirkung und ist gegen bestimmte Keime nicht wirksam.

- Unkorrekte Arbeitsweise

Die Desinfektion wird nicht sorgsam ausgeführt. Bestimmte Flächen werden vom Desinfektionsmittel ausgespart.

- Keine Trockenphase

Das Desinfektionsmittel muss die Möglichkeit haben in der entsprechenden Verdünnung auf der Oberfläche zu wirken. Durch zusätzlichen Wassergebrauch wird die Desinfektionsmittelkonzentration verdünnt und entsprechend in seiner Wirkung eingeschränkt.



S = schnell wirksam, I = langsam wirksam, II = sehr langsam wirksam

Abbildung 1 Wirkungsspektrum und pH-Abhängigkeit der wichtigsten Desinfektionsmittel (WALLHÄUSSER, 1996)

2.3 Desinfektionsmittelpfung

Um eine wirksame Desinfektion mit einem chemischen Desinfektionsmittel sicherzustellen, muss im Vorfeld dessen Wirksamkeit geprüft werden. Mittlerweile sind viele chemische Desinfektionsmittel auf dem Markt und für den Verbraucher ist es schwierig, die Wirkung der verschiedenen Angebote zu beurteilen. Aus diesen Grund haben die Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) und die Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (DVG) Richtlinien für die Prüfung chemischer Desinfektionsmittel herausgegeben. Die geprüften und als wirksam befundenen Desinfektionsmittel werden anschließend in einer entsprechenden Liste aufgenommen.

Nach WELLHÄUSER (2002) sind Desinfektionsmittel, die nach anerkannten Verfahren auf ihre Wirksamkeit geprüft sind, z.B. durch die Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft, durch die Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, durch die Deutsche Landwirtschafts-Gesellschaft sowie nach DIN-EN-Normen geprüfte Präparate als geeignet anzusehen.

2.3.1 Anforderungen an ein Desinfektionsmittel

Nach SCHLIESSER und STRAUCH (1981) und STRAUCH und BÖHM (2001) gibt es eine Reihe von Anforderungen, die ein Desinfektionsmittel erfüllen muss:

- breites Wirkungsspektrum und eine hohe selektive Wirksamkeit gegen bestimmte Keime
- rasche irreversible Wirkung in der Gebrauchskonzentration
- geringer Wirkungsverlust durch Eiweiß, Kot und pH-Wertverschiebung
- gleichbleibende Zusammensetzung auch nach Lagerung
- Unschädlichkeit für Mensch und Tier bei und nach der Anwendung
- gute Materialverträglichkeit
- Wirtschaftlichkeit

2.3.2 Desinfektionsmittelprüfung nach den Richtlinien der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft

Bei der Desinfektionsmittelprüfung legt die DVG (2000) besonderen Wert auf folgende Punkte:

- Die Versuche sollten alle mit einheitlichen Testorganismen durchgeführt werden, um anschließend Vergleiche zwischen den Desinfektionsmitteln ziehen zu können
- Die Ausgangskeimzahl sollte bekannt sein, damit anschließend der Reduktionseffekt bestimmt werden kann.
- Die Grenze zwischen Abtötung der Keime und Überlebensfähigkeit der Keime (minimale Hemmkonzentration) muss festgelegt werden.

Damit soll verhindert werden, dass für Desinfektionsmittel Konzentrationen angegeben werden, bei denen sich Keime noch eventuell vermehren und sich somit eine Desinfektionsmittelresistenz ausbilden kann.

In den Richtlinien der DVG zur Prüfung von Desinfektionsmitteln für die Tierhaltung an Bakterien und Pilzen ist eine Prüfung im Verdünnungstest, im Suspensionstest und im Keimträgerstest vorgesehen.

2.3.2.1 Bakteriostatische, tuberkulostatische und fungistatische Wirkung

Zur Bestimmung der bakteriostatischen und fungistatischen Wirkung wird das Desinfektionsmittel im Verdünnungstest eingesetzt. Das Desinfektionsmittel wird in abgestufter Verdünnung in eine 1×10^8 bis 1×10^9 Keim-Caseinpepton-Sojabohnenmehl-Pepton-Lösung gemischt. Die beimpften Röhrchen werden 72 Stunden bei 37°C bebrütet. Bei der Bestimmung der tuberkulostatischen Wirkung wird die Probe 14 Tage bei 37°C bebrütet. Bei *Candida albicans* wird der Caseinpepton-Sojabohnenmehl-Pepton-Lösung 4% Dextrose zugesetzt und nach 96 Stunden ausgewertet.

2.3.2.2 Bakterizide, tuberkulozide und fungizide Wirkung

In diesen Versuchen werden die gleichen Testorganismen eingesetzt wie bei der Bestimmung der bakteriostatischen und fungistatischen Wirkung. Die Desinfektionsmittel werden im qualitativen Suspensionstest mit und ohne Eiweißbelastung geprüft.

0,1 ml der 1×10^8 bis 1×10^9 Keim-Caseinpepton-Sojabohnenmehl-Pepton-Lösung wird 10 ml der zu prüfenden Desinfektionsmittelverdünnung zugesetzt, gut durchmischt und 5, 15, 30 und 60 Minuten bei 20°C gehalten. Anschließend werden 0,1 ml der Bakterienprobe in 10 ml Caseinpepton-Sojabohnenmehl-Pepton-Lösung, 0,1 ml des Desinfektionsmittel-Mykobakteriumgemisches auf Löwenstein-Jensen-Medium bzw. 0,1 ml der Candidaprobe in 10 ml Caseinpepton-Sojabohnenmehl-Pepton-Lösung mit 2% Dextrosezusatz und den jeweiligen Inaktivierungsmitteln geimpft. Die Proben werden bei den Bakterien 72 Stunden, 4 Wochen bei *Mycobacterium avium* und 4 Tage bei *Candida albicans*, bebrütet.

In einem weiteren Durchlauf wird den zu prüfenden Desinfektionsmittel 20 % Rinderserum beigemischt und anschließend wie oben beschrieben weiter vorgegangen, um auf diese Weise die Eiweißbelastbarkeit des Desinfektionsmittels zu prüfen.

2.3.2.3 Bestimmung der bakteriziden, tuberkuloziden und fungiziden Wirkung im Keimträgertest

Der Keimträgertest ist das standardisierte Modell der Flächendesinfektion unter Stallbedingungen. Nach den Richtlinien der DVG ist 3 mm dickes, unbehandeltes und abgelagertes Lindenholz zu verwenden. Dieser Desinfektionsmitteltest wird als qualitativer Test durchgeführt.

Der Keimträger wird 20 Sekunden in die 1×10^8 bis 1×10^9 Keim-Caseinpepton-Sojabohnenmehl-Pepton-Lösung eingelegt. Anschließend wird der Keimträger 30 Minuten zum Antrocknen der Keimsuspension auf saugfähiges Papier bei 20°C und 2°C gestellt.

Nach dem Trocknen wird der Keimträger 2 Minuten lang in 20 ml der Desinfektionsmittelverdünnung komplett eingelegt.

Die Keimträger werden aus dem Desinfektionsbad herausgenommen und vertikal 30, 60 und 120 Minuten aufgestellt. Danach werden sie mit dem Zusatz des Inaktivierungsmittels in Caseinpepton-Sojabohnenmehl-Pepton-Lösung überführt und bebrütet. Bei der Überprüfung der tuberkuloziden Wirkung wird der Keimträger nach den Einwirkungszeiten mit 10 ml Aqua dest. gespült und anschließend auf Löwenstein-Jensen-Medium übertragen. Der Candidaprobe wird 2% Dextrose in das Caseinpepton-Sojabohnenmehl-Pepton gemischt.

Bei den Bakterien wird die Probe 72 Stunden bei 37°C bebrütet, *Mycobacterium avium* wird 4 Wochen und die Candidaprobe 4 Tage bei 37°C inkubiert.

Des Weiteren existieren Richtlinien für die Desinfektionsmittelprüfung an Viren und an parasitären Dauerformen (siehe unter Richtlinien der Desinfektionsmittelprüfung chemischer Desinfektionsmittel der DVG).

2.3.3 Prüfkriterien zur Erlangung des DLG-Gütezeichens für chemische Stalldesinfektionsmittel

(Stand: März 2003 veröffentlicht im Deutschen Tierärzteblatt Mai 2003)

Die Voraussetzung für die Erlangung des DLG-Gütezeichens ist die Prüfung auf Wirksamkeit durch die DVG mit anschließender Aufnahme in die aktuelle Liste.

Für das Gütesiegel müssen folgende Prüfungen durchgeführt werden und als akzeptabel begutachtet werden

- ein analytisches Gutachten durch einen Sachverständigen
- die biozide Prüfung nach den Richtlinien der DVG
- eine Anwendungstechnische Prüfung, die folgende Untersuchungen einschließt:
 - Materialverträglichkeit
 - Grenzflächenaktivität
 - Tierverträglichkeit
 - Praktische Anwendungskriterien: Eignung für Hochdruckreiniger, Dampfstrahler, Vernebler und Verdampfer; Emulgierbarkeit, Eigenentmischung
- Umweltbelastung

Jährlich müssen folgende Prüfungen zur Aufrechterhaltung des Gütesiegels durchgeführt werden:

- das analytische Gutachten durch den Sachverständigen
- stichprobenartige Prüfungen der bioziden Prüfung, sowie der Anwendungstechnischen-, der Materialverträglichkeits- und der Grenzflächenaktivitätsprüfung, den praktischen Anwendungskriterien und der Umweltbelastung