

## 3 Material/Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Materialien sind im Anhang aufgelistet.

#### 3.1.2 Nährmedien und Reagenzien

LB-Agar

Oxoid-Columbia-Agar mit Schafblut, Fertigplatten, Art.-Nr.: PO5084H

Oxoid-CLED-Agar, Fertigplatten, Art.Nr.: PO5009A

Oxoid-Abklatsch Caso-Agar, Fertigplatten, Art.-Nr.: PO5024H

Caseinpepton-Sojabohnenmehlpepton-Agar mit Enthemmer OXOID Art.-Nr.: CM131

Dip-Slides Uricult<sup>®</sup>, CLED-Nährmedium

Phosphate buffered saline (PBS), pH 7,4

H-Medium<sup>®</sup> (Heipha)

Oxoid Glucose-Bouillon (Art.-Nr. CM 175)

#### 3.1.3 Baumaterialien

##### Relatex

Naturkautschuk-Gummiboden-Estrich, Firma: Hellmann Gerden GmbH

Dicke: 18 mm

##### Bodenfliese

Bodenfliesen, glasiert, Dünnbrett 20/20, R12, Nennmaß: 20/20 cm, Oberfläche:  
rutschhemmend R 12, mit Sternnocken, Farbe: blau, Fliesenfabrikat: Ströher Secuton PG 38

##### Wandfliese

Wandfliese, uni, Dünnbrett, 15/15, keramische Fliesen, uni, matt glasiert, Farbe: weiß-matt,  
Oberfläche: eben, Nennmaß: 15/15 cm, Fabrikat: Steuler UNI weiß-matt

Dicke: 5 mm

##### Spanplatte

Dicke: 12 mm

### Trespa Athlon®

Ebene Platte auf Basis thermohärtender Harze, verstärkt mit Holzfasern, die unter Druck und Temperatur verpresst werden

Dicke: 13 mm

### Betoplan Top® (Spezial-Schalungsplatte), SCHNORZ AG

Großflächenschalungsplatte aus Furniersperrholz nach DIN 68792 und einer Filmbeschichtung von 550 g/m<sup>2</sup> je Seite mit eingebautem Faservlies

Dicke: 20 mm

### Aluminiumblech

Dicke: ca. 1 mm

### Kunststoffplatte TROVIDUREN®

PVC

Dicke: 8 mm

### Plexiglas

Dicke: 5 mm

### Kunstfelsen

hergestellt von der Firma „Deutsche Gehegebau“, ein Gemisch aus Sand, Zement, Glasfasern und einem Polymer

Die Dicke variiert zwischen 5 mm und 20 mm

### Glas

Dicke: 5 mm

### Betonkantenstein mit Prolapit®3000

Prolapit®3000 ist eine lösungsmittelfreie, umweltfreundliche Spezialimprägnierung bestehend aus verschiedenen Kombinationen von Siloxanen

Dicke: 50 mm

### Betonkantenstein ohne Prolapit®3000

Dicke: 50 mm

#### **3.1.4 Keimspezies**

Zur Bestimmung einer optimal für die Versuche geeigneten Keimspezies wurden in den Vorversuchen folgende Keime miteinander verglichen:

- *Escherichia coli* ATCC 25922

- *Escherichia coli* Wildstamm 1, von einem Vaginalabstrich einer 35-jährigen Frau isoliert
- *Escherichia coli* Wildstamm 2, von einem Vaginalabstrich einer 23-jährigen Frau isoliert
- *Escherichia coli* Wildstamm 3, von einem Vaginalabstrich einer 31-jährigen Frau isoliert
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- *Serratia marcescens* Wildstamm, Keim des Ringversuches 1. Oktober 1997 vom Institut für Standardisierung und Dokumentation im medizinischen Labor e.V.
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25913
- *Staphylococcus aureus* Wildstamm, von einem Vaginalabstrich einer 28-jährigen Frau isoliert
- *Streptococcus agalactiae* Wildstamm, von einem Vaginalabstrich einer 28-jährigen Frau isoliert
- *Candida albicans* ATCC 90028
- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

### **3.1.5 Keim des Hauptversuches**

Von den unter 3.1.4. aufgeführten Keimspezies wurde *Serratia marcescens*, Keim des Ringversuches 1. Oktober 1997 vom Institut für Standardisierung und Dokumentation im medizinischen Labor e.V. für den Hauptversuch eingesetzt. Aus dem „Farbatlas zur Diagnose bakterieller Infektionserreger der Tiere“ (BISPING und AMTSBERG, 1988):

*Serratia marcescens* sind gramnegative, aerob oder mikroaerophil wachsende, in der Kultur anspruchslose Stäbchen. *Serratia marcescens* Keime kommen natürlicherweise im Erdboden, Wasser und auf Lebensmitteln vor. Allgemein gilt *Serratia marcescens* als apathogen, kann aber gelegentlich an Entzündungsprozessen beteiligt sein. Zum Beispiel:

- Pferd: Konjunktivitis, Pneumonie, septikämische Erkrankungen, Endometritis
- Rind: Mastitis, Abort
- Vereinzelt Infektionen bei Hund, Katze, Schwein und anderen Tiergruppen.

### **3.1.6 Verwendete Reinigungs- und Desinfektionsmittel**

Von den auf dem Markt erhältlichen Reinigern wurde ein alkalischer Reiniger im Hauptversuch verwendet. Das Reinigungsmittel wurde bereits über Jahre im Zoo eingesetzt.

Für die Desinfektion von Tierställen werden hauptsächlich Desinfektionsmittel aus den Wirkstoffgruppen Aldehyde, Halogene und Phenole/Phenolderivate angewendet. Im vorliegenden Versuch wurde Lysovet®PA als Vertreter der Aldehyde eingesetzt.

### Ideal Neuzeitlicher Reiniger®

Hersteller: Schmidtke Ideal-Chemie GmbH, Dortmund

Inhaltsstoffe:

- Anionische Tenside
- Nichtionische Tenside
- 2-Propanol
- Natriumcarbonat
- Lösungsvermittler

pH-Wert unverdünnt: 10

Anwendung: Der Hersteller gibt für die Reinigung eine Konzentration von 1% bis 2,5% je nach Verschmutzungsgrad

### Lysovet®PA

Hersteller: Schülke & Mayr GmbH, Hamburg

Zusammensetzung (100g Lysovet®PA enthalten):

- 5 g Phenoxypropanol
- 9 g Formaldehyd (HCOH)
- 3,6 g Glyoxal (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)
- 3,75 g Glutaraldehyd [COH-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CHO]
- 5 g 2-Ethylhexanol

Anwendung: Nach den Angaben der 12. Desinfektionsmittelliste der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft für die Tierhaltung vom Mai 2003 sollte Lysovet®PA für die bakterizide Wirkung in der Gebrauchskonzentration von 2% mit 2 Stunden Mindesteinwirkungszeit zur speziellen Desinfektion und 1 Stunde zur vorbeugenden Desinfektion eingesetzt werden.

### **3.1.7 Methoden zur Oberflächenkeimzahlbestimmung**

Es wurden unterschiedliche Methoden zur Oberflächenkeimzahlbestimmung miteinander verglichen, um ein optimales Verfahren zur Beprobung unterschiedlicher Oberflächen und unterschiedlicher Keime zu ermitteln. Folgende Methoden wurden eingesetzt:

#### **Abklatschplatte**

Notwendiges Material: Abklatschplatten (Firma: Oxoid, Caso-Agar)

Die Agarplatte wurde auf die zu untersuchende Fläche gedrückt. Anschließend wurde sie durch den entsprechenden Deckel verschlossen und in den Brutschrank verbracht und

bebrütet.

### **Agarwurstmethode**

Notwendiges Material:

Agarwurst (LB-Agar, siehe 3.2.3), sterile Petrischalen, sterile Plastikösen

Die Agarwurst wurde in etwa 0,5 cm dicke Scheiben geschnitten. Eine Scheibe wurde auf die zu untersuchende Fläche gelegt. Anschließend wurde sie mit Hilfe der sterilen Öse auf die Petrischale, mit der beprobten Seite nach oben, überführt und bei 37°C 18 Stunden bebrütet.

### **Dip-Slides**

Notwendiges Material: Dip-Slides (Firma: Orion Corporation Orion Diagnostica, CLED-Agar)

Der mit Nährboden beschichtete, biegsame Objektträger wurde auf die zu beprobende Fläche gedrückt. Geschützt durch einen Kunststoffbehälter wurde er in den Brutschrank verbracht und 37°C 18 Stunden bebrütet.

### **Direct Surface Agar Plating- Verfahren (DSAP-Verfahren)**

Notwendiges Material: LB-Agar, Rahmen aus Plastikrohr und Isolierband, sterile Pipettenspitzen, sterile Petrischalen

Beim DSAP-Verfahren wurde der Rahmen um das zu beprobende Feld (Maße: 4 cm X 4 cm) gesetzt. Flüssiger, ca. 40°C warmer LB-Agar wurde in den Rahmen gegossen. Nachdem der Agar erkaltet war, wurde er mit einer sterilen Pipettenspitze von dem Rahmen getrennt und auf eine sterile Petrischale überführt und 37°C 18 Stunden bebrütet.

### **Trockentupferverfahren**

Notwendiges Material: sterile Baumwolltupfer, Fertignährböden (CLED-Agar, Firma Oxoid)

Beim Trockentupferverfahren wurde mit einem sterilen Tupfer die Oberfläche von rechts nach links und von oben nach unten und am Rand entlang kräftig abgestrichen; anschließend wurde der Tupfer auf der Agarplatte ausgestrichen und 37°C 18 Stunden bebrütet.

### **Nasstupferverfahren**

Notwendiges Material: sterile Baumwolltupfer, sterile PBS-Lösung, Eppendorfhütchen, Vortexer, Fertignährböden (CLED-Agar, Firma Oxoid)

Beim Nasstupferverfahren wurde der Tupfer mit 50 µl steriler PBS-Lösung angefeuchtet. Anschließend wurde die Fläche von rechts nach links und von oben nach unten und am Rand entlang abgestrichen. Der Tupfer wurde 10 Sekunden lang in 100 µl PBS-Lösung ausgeschüttelt. Die Lösung wurde auf den Agar verbracht und mit dem Tupfer gleichmäßig auf dem Agar verteilt und bebrütet. Die Nährmedien wurden 18 Stunden bei 37°C bebrütet und anschließend wurden die Kolonien gezählt.

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Herstellung der Bakteriensuspension**

Die Bakterien und die Hefen (siehe 3.1.4) wurden auf einem Fertignährboden 18 Stunden angezüchtet. *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* und *Staphylococcus aureus* wurden auf CLED-Agar kultiviert. *Candida albicans* wurde auf Chromagar und *Streptococcus agalactiae* auf Blutagar angezüchtet. Für die Versuche, bei denen die Bakterien nicht in PBS, sondern in Glucose-Bouillon bzw. H-Bouillon gelöst auf die Baumaterialien gebracht wurden, wurden die Keime auch direkt in der Bouillon angezüchtet.

Zur Herstellung der Bakteriensuspension wurde eine gut abgegrenzte Bakterienkolonie mit einer sterilen Öse vom Nährboden abgenommen und in 1 ml PBS suspensiert.

Die Bestimmung der Bakterienanzahl in dieser Stammlösung wurde mit der Thoma-Zählkammer durchgeführt.

Als Kontrolle wurde parallel die Zellzahl durch Dichtemessungen im Küvettenphotometer bei  $\lambda = 600$  nm bestimmt, wobei eine optische Dichte von 1 einer Zellzahl von  $1 \times 10^9$  Keime/ml gleichgesetzt wurde. Da sich die erzielten Ergebnisse der Thoma-Zählkammer und des Küvettenphotometers deckten, wurde nach kurzer Zeit die Keimzahl aus zeitlichen Gründen nur noch mit dem Küvettenphotometer bestimmt.

Von den Stammlösungen ausgehend wurden Dezimalverdünnungen von  $1 \times 10^2$  Keime/ml bis  $1 \times 10^5$  Keime/ml hergestellt.

### **3.2.2 Behandlung der Baumaterialien**

Auf den Baumaterialien wurden mit Wachsstift vier mal vier Zentimeter große Felder aufgezeichnet. Anschließend wurden die Baustoffe in Autoklavierbeutel verpackt und bei 120°C und 1,1 bar 20 Minuten autoklaviert.

### **3.2.3 Herstellung der Agarwurst**

Kunstdarm, Rilsan 65/40 steril, wurde autoklaviert. Etwa 500 ml autoklavierter, flüssiger LB-Agar wurde bei einer Temperatur von ca. 60°C in den Darm gefüllt. Mit einem sterilen Band wurde der Kunstdarm am offenen Ende verschlossen und in den Kühlschrank gehängt. Nach dem Erkalten wurden von dieser Wurst etwa 0,5 cm dicke Scheiben abgeschnitten.

Diese Scheiben standen zur Oberflächenkeimzahlbestimmung zur Verfügung.

### **3.2.4 Herstellung der Rahmen für das DSAP-Verfahren**

Von einem PVC-Abwasserrohr mit 50 mm Durchmesser wurden ca. 25 mm hohe Scheiben mit einer Tischkreissäge abgeschnitten. Die Ränder wurden mit einer Raspel entgratet. An einem Ende wurde elastisches Isolierband befestigt, so, dass die Hälfte des Bandes über das Rohr

ragte. Dieser Rand wurde auf die Oberflächen gedrückt und dies verhinderte das Auslaufen von flüssigem Agar.

### **3.2.5 Vorversuch zur Ermittlung der geeigneten Verfahren für die Keimrückgewinnung**

In einem ersten Versuch wurde die günstigste Methode zur Keimgewinnung untersucht. Dazu wurde *Escherichia coli* ATCC 25922 auf Bodenfliesen aufgetragen und nach fünf Minuten durch verschiedene Methoden der Oberflächenkeimzahlbestimmung abgenommen.

Die Keimsuspensionen wurde in der Zeit zwischen Herstellung und Probennahme auf Eis aufbewahrt, um eine Keimvermehrung zu verhindern. Als Verfahren wurden die Dip-Slides, die Agarwurstmethode, das DSAP-Verfahren, das Trockentupfverfahren, das Nasstupfverfahren und das Abklatschverfahren angewendet.

Pro Verfahren wurden auf eine definierte Fläche von 16 cm<sup>2</sup> jeweils 100 µl von den Keimverdünnungen 1x10<sup>2</sup> KE/ml, 1x10<sup>3</sup> KE/ml, 1x10<sup>4</sup> KE/ml, 1x10<sup>5</sup> KE/ml aufgebracht. Die Bestimmung erfolgte im Doppelansatz. Nach fünf Minuten Eintrocknungszeit wurden die Bakterien mit den verschiedenen Methoden der Keimrückgewinnung abgenommen.

Alle Nährböden wurden 18 Stunden bei 37°C bebrütet. Nach Ende der Bebrütung wurde die Anzahl Kolonien pro Medium gezählt und das sensitivste Verfahren bestimmt.

### **3.2.6 Vorversuch zur Festlegung des geeigneten Keimes**

Es wurden verschiedene Keime ausgetestet, um festzustellen, bei welchem Keim die größte Wiederfindungsrate zu erreichen ist.

Weiterhin sollte die Verdünnungsstufe festgelegt werden, bei der möglichst viele Kolonien vorhanden sind, aber diese nicht als Rasen wachsen, sondern noch gut zu zählen sind. Für die Baumaterialprüfung war es wichtig, dass die Keime auf dem Agar gut abgrenzbare und damit gut zu zählende Kolonien bilden. Die Trocknungszeiten haben einen umgekehrt proportionalen Einfluss auf die Wiederfindungsrate der Keime (SCHULZE, 2000). In diesem Vorversuch sollte herausgefunden werden, welcher Keim nach einer Eintrocknungszeit von dreißig Minuten noch eine hohe Wiederfindungsrate hat, und in wieweit das Lösungsmedium Einfluss auf diese Rate nimmt.

Es wurden, die unter 3.1.4. aufgeführten Keime: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus faecalis* und *Candida albicans* untersucht.

Die Oberflächen wurden parallel nach fünf Minuten und nach dreißig Minuten beprobt. Dazu wurden jeweils 200 µl der Keimsuspension auf eine 4 cm x 4 cm große Fläche eines autoklavierten Baumaterials mit den Zellzahlen 10<sup>3</sup>/ml und 10<sup>4</sup>/ml aufgebracht. Die Keimsuspensionen wurden auf Eis aufbewahrt, um eine Keimvermehrung zu verhindern. Nach einer Eintrocknungszeit von fünf Minuten bzw. dreißig Minuten wurden die Keime mit dem Nasstupfer-

verfahren bzw. dem DSAP-Verfahren abgenommen. Die Ergebnisse wurden mit der Positivkontrolle, dem direkten Aufbringen von 200 µl Keimsuspension auf den Agar, verglichen.

In den ersten Versuchreihen wurden die Keime in PBS gelöst. Vergleichend dazu wurden *Escherichia coli* Wildstamm 3, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* Wildstamm, *Serratia marcescens* (Ringversuch), *Candida albicans* ATCC 90028 und *Streptococcus agalactiae* Wildstamm auch in Glucose-Bouillon gelöst. Von *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 wurde die Keimsuspension in H-Bouillon hergestellt.

Pro Baumaterial wurde das Nasstupfverfahren bzw. das DSAP-Verfahren ohne vorherigen Bakterienauftrag einmalig durchgeführt (Nullkontrolle).

Nach der Bebrütung der Platten bei 37°C über 18 Stunden wurde die Anzahl der Bakterienkolonien auf den Nährböden gezählt.

### **3.2.7 Hauptversuch: Überprüfung von Baumaterialien auf ihre Reinigungs- und Desinfektionsfähigkeit im Vergleich: Nasstupfverfahren mit DSAP- Verfahren**

Zur Prüfung der Baumaterialien wurde im Labor versucht die Situation im Zoo nachzuahmen. Der Versuch war in vier Teile gegliedert, wobei sich jeder Teil auf die Vorgehensweisen bei Reinigung und Desinfektion in dem zu untersuchenden Zoo bezog.

- Im ersten Teil wurden die Wiederfindungsraten der Methoden festgelegt.
- Im zweiten Versuch wurde das tägliche Ausspritzen der Ställe durch das Abspritzen der Materialien unter dem Wasserhahn imitiert.
- Das Reinigen der Oberflächen mit einem Schwamm, Reinigungsmittel und warmen Wasser (circa 40°C) sollte dem mechanischen Reinigen mit einem Schrubber entsprechen.
- Im vierten Durchlauf wurden die Oberflächen mit Lysovet® desinfiziert. Dieses Desinfektionsmittel wird im Zoo häufig verwendet. Daher ist seine Wirkung und Verträglichkeit für die Baumaterialien von besonderem Interesse.

Als Methoden wurden das Nasstupfverfahren und das DSAP-Verfahren im Dreifachansatz eingesetzt. Als Keim wurde *Serratia marcescens*, Keim des Ringversuches 1. Oktober 1997 von Institut für Standardisierung und Dokumentation im medizinischen Labor e.V., verwendet.

Von *Serratia marcescens* wurde eine  $1 \times 10^4$  KE/ml-Suspension in Glucosebouillon hergestellt und diese bei ca. +4°C aufbewahrt .

Vor dem Autoklavieren der Baumaterialien wurden acht 4 cm mal 4 cm große Felder auf den Oberflächen markiert.

Je 200 µl der *Serratia*-Keimsuspension wurden auf sechs der acht Felder verteilt. Auf je einem Feld pro Baumaterial wurden die Verfahren ohne vorherige Keimaufbringung, zur Nullkontrolle,

angewendet. 200 µl der Keimsuspension wurden, als Positivkontrolle, direkt auf CLED-Agar gegeben.

Bei jedem der vier Versuchsdurchläufe wurde die Bakteriensuspension in der Konzentration  $1 \times 10^4$  KE /ml auf die Baumaterialien gegeben und anschließend wurde diese dreißig Minuten auf der Oberfläche belassen bis die Flüssigkeit völlig eingetrocknet war. Je nach Versuchsdurchlauf wurden die Baumaterialien entsprechend bearbeitet.

- Beprobung direkt nach dreißig Minuten

Auf den Materialoberflächen wurden das Nasstupferverfahren und das DSAP-Verfahren im Dreifachansatz angewendet. Die Agarplatten wurden 18 Stunden bebrütet und anschließend die Kolonien gezählt.

Eine Kolonie entsprach einer *Serratia marcescens*-koloniebildenden Einheit der Ausgangslösung. Die Anzahl der Kolonien wurden mit denen verglichen, die auf der Platte der Positivkontrolle wuchsen. Sie standen für die Wiederfindungsrate der Keime auf dem entsprechenden Baumaterial und dem entsprechenden Verfahren.

- Beprobung nach Reinigung unter fließendem Wasser

Die Baumaterialien wurden unter fließendem Wasser gereinigt. Dafür wurden die Materialoberflächen unter dem Wasserhahn mit starkem Strahl komplett abgespritzt. Die Materialien trockneten anschließend unter der Abzugshaube. Dann wurden die Verfahren im Dreifachansatz angewendet und die Proben für 18 Stunden in den Brutschrank bei 37°C gestellt. Die Kolonien wurden gezählt. Jede Kolonie entsprach einer koloniebildenden Einheit, die sich der Wasserreinigung widersetzt hatte.

- Beprobung nach Reinigung mit circa 40°C warmen Wasser mit Reinigungsmittel und mit einem Schwamm

Die Oberflächen der Baumaterialien wurden mit warmen Wasser, Reinigungsmittel und mit einem Schwamm gereinigt. Anschließend wurden die Oberflächen unter dem Wasserhahn abgewaschen, um Reste des Reinigungsmittels zu entfernen. Die Baumaterialien wurden unter der Abzugshaube getrocknet und anschließend wurden die Verfahren im Dreifachansatz angewendet. Die Agarplatten wurden für 18 Stunden bei 37°C bebrütet und anschließend die Kolonien gezählt. Jede Kolonie entsprach einer koloniebildenden Einheit, die durch die Reinigung nicht von der Oberfläche entfernt wurde.

- Beprobung nach Desinfektion mit Lysovet®

Auf die Oberflächen wurde 2%ige Lysovetlösung mit einer Sprühflasche aufgebracht. Und zwar soviel, dass die Oberflächen komplett feucht waren. Nach einer Einwirkungszeit von dreißig Minuten wurden die Baumaterialien unter fließendem Wasser abgespült (siehe Punkt 2.) und die Proben genommen. Die Proben wurden 18

Stunden bebrütet und anschließend die Kolonien gezählt. In diesem Durchlauf entsprach jede Kolonie einer koloniebildenden Einheit, die die Desinfektion überlebt hat.

### 3.2.8 Auswertung

#### 3.2.8.1 Bestimmung der Keimzahl

Es wurde jede einzelne Kolonie auf den Platten gezählt. Bei starkem Bewuchs wurde die Mediumplatte in acht gleiche Stücke unterteilt und stellvertretend 1/8 ausgezählt. Das Ergebnis wurde mit acht multipliziert.

Von den einzelnen Werten der Dreifachbestimmung wurde anschließend das arithmetische Mittel  $\bar{x}$  bestimmt.

#### 3.2.8.2 Wiederfindungsrate der einzelnen Verfahren auf den verschiedenen Baumaterialien

Von den im ersten Teil des Hauptversuches bestimmten Wiederfindungsraten wurden der größte Wert und der kleinste Wert der dreifachen Bestimmung in einer Tabelle aufgelistet.

$x_{\max}$  größter Wert der Bestimmung

$x_{\min}$  kleinster Wert der Bestimmung