

5 Diskussion der Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, verschiedene Baumaterialien auf ihre Einsatzfähigkeit im Veterinär- und Quarantänebereich eines Zoos zu testen.

In drei Vorversuchen wurden geeignete Verfahren zur Oberflächenkeimzahlbestimmung festgelegt, wurde ein geeigneter Keim für den Hauptversuch bestimmt und es wurde die Keimzahl festgelegt, mit der die Oberflächen im Hauptversuch kontaminiert wurden.

Im Hauptversuch wurden die verschiedenen Materialoberflächen in Bezug auf ihre Reinigungs- und Desinfektionsfähigkeit überprüft. Es stellte sich die Frage, ob Flüssigkeiten in das Innere der Materialien eindringen, oder ob sich die Oberflächen durch den Einsatz von Reinigungs- und Desinfektionsmittel bzw. unter mechanischer Einwirkung verändern.

Des Weiteren sollten die im Vorversuch bestimmten zwei Probeentnahmeverfahren zur Oberflächenkeimzahlbestimmung DSAP-Verfahren und das Nasstupferverfahren bezüglich ihrer Wiederfindungsraten beurteilt werden.

5.1 Methodenvergleich in Vorversuchen

In einem ersten Vorversuch zum Methodenvergleich wurden das Nasstupferverfahren, das RODAC-Abklatschverfahren, das Trockentupferverfahren, die Dip-Slides, die Agarwurstmethode und das DSAP-Verfahren miteinander verglichen. Das Nasstupferverfahren und das DSAP-Verfahren wurden als günstigste Methoden befunden und für den Hauptversuch ausgewählt.

Der unter 3.2.5 beschriebene Vorversuch diente der Ermittlung der geeigneten Verfahren zur Durchführung des Hauptversuches. Die sechs Verfahren wurden anhand der Wiederfindungsraten und der Handhabung beurteilt. Für den Hauptversuch mussten die Methoden der Oberflächenkoloniezahlbestimmung auch auf unebenen Flächen gut anzuwenden sein, um die Reinigung und Desinfektion der Baumaterialien zu überprüfen.

5.1.1 Vorversuch zur Dip-Slide-Technik

Die Wiederfindungsraten bei diesem Verfahren waren in der 1×10^3 KE/ml Verdünnung und in der 1×10^4 KE/ml Verdünnung im Vergleich zum Agarwurstverfahren, dem Nasstupferverfahren und dem DSAP-Verfahren sehr niedrig. Ursächlich hierfür kann das grundsätzliche Problem von Kontaktnährböden, dass eine Kolonie auf dem Agar nicht nur einer einzelnen Bakterie, sondern einem Bakterienaggregat entspricht, sein (MOSSEL et al., 1966; LOUWERS und KLEIN, 1994). Die Dip-Slides wurden im Vorversuch nur an Bodenfliesen angewandt. Auf gewölbten Materialien fehlte ihnen der direkte Kontakt zur Oberfläche. Auf rauen und unzugänglichen Untergründen wie zum Beispiel Kunstfelsen war das Aufbringen

des Kontaktnähragars unmöglich. Diese Erfahrungen machten auch LOUWERS und KLEIN (1994). Ihrer Meinung nach ist es aus dem obengenannten Grund nicht möglich die Ergebnisse der Dip-Slides auf rauen Oberflächen in Bezug zur tatsächlichen Keimbelastung der Oberfläche zu setzen.

Nach HEILIGENTHAL (1995) eignen sich die kommerziell hergestellten „Hygicult“-Dip-Slides gut zur routinemäßigen Kontrolle von Reinigung und Desinfektion in einem Fleischgewinnungsbetrieb. Durch die Verwendung von Bewertungsskalen des Herstellers ist eine anschließende Zuordnung der Resultate zur Gesamtkeimzahl möglich.

Allerdings wurden auch hauptsächlich glatte Oberflächen, wie Waschbecken und Nachsäuberungstisch, getestet.

5.1.2 Vorversuch zum Agarwurstverfahren

Mit dem Agarwurstverfahren konnten gute Wiederfindungsraten erzielt werden. Die Wiederfindungsraten von 15 Keimen in der Verdünnung 1×10^2 KE/ml, von 116 Keimen in der 1×10^3 KE/ml Verdünnung und 1218 Keime in der Verdünnung 1×10^4 KE/ml entsprechen den Erwartungen in der 1×10^2 KE/ml Verdünnung, in der 1×10^3 KE/ml Verdünnung und in der 1×10^4 KE/ml Verdünnung, da jeweils nur 0,1 ml der Keimsuspension auf die Fläche geimpft wurde. Auch die Verhältnisse zwischen diesen Verdünnungen liegen mit 7,7 und 10,45 nahe an dem Idealwert von 10. Die Agarwurstscheibe hatte lediglich den Rilsan-Kunstdarm als Träger, der sich schnell von der Agarscheibe löste, daher war ihre Handhabung schwierig. Nach dem Aufbringen der Agarwurst auf die zu testende Oberfläche musste diese auch wieder steril mit der Kontaktseite nach oben auf eine Petrischale gelegt werden. Oft hatte sich bis dahin der Kunstdarm komplett gelöst, und die Abnahme musste mit anderen Hilfsmitteln, wie z.B. sterilen Ösen, erfolgen. Obwohl sich die Agarwurstmethode nach SCHULZE (2000) auch zur Keimzahlbestimmung auf gekrümmten Flächen eignet, ist deren Einsatzfähigkeit nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zur Bestimmung der Oberflächenkeimzahl auf Kunstfelsen gering, da die schwierige Handhabung und der fehlende Kontakt zur Oberfläche eine exakte Keimzahlbestimmung verhindert.

5.1.3 Vorversuch zum DSAP-Verfahren

Dieses Verfahren hatte in allen Verdünnungsstufen die höchste Wiederfindungsrate. Das lag sicherlich an der Tatsache, dass der Agar den besten Kontakt zur Oberfläche hatte.

Auch ANGELOTTI et al. (1957) erzielten mit dem DSAP-Verfahren verglichen mit verschiedenen Abstrich-, Aufguss- und Abklatschverfahren die höchsten Wiederfindungsraten von *Micrococcus pyogenes var. aureus* und *Bacillus globigii* Sporen auf Porzellankeimträgern.

Durch die Verwendung von flüssigem Agar war die anschließende Haftung des Agar an der Oberfläche bedeutend besser als bei anderen Agarkontaktverfahren. Durch den Rahmen mit

elastischem Isolierband wurde der Agar auf der definierten Fläche gehalten. Die Abnahme des erstarrten Agars mit einer sterilen Pipettenspitze war jedoch arbeitsintensiv.

5.1.4 Vorversuch zum Trockentupfverfahren

Die Wiederfindungsraten des Trockentupfverfahren waren in der 1×10^2 KE/ml Lösung mit durchschnittlich 5,5 Kolonien, in der 1×10^3 KE/ml Lösung mit durchschnittlich 50,5 Kolonien und in der 1×10^4 KE/ml Lösung mit durchschnittlich 255,5 Kolonien niedrig. Durch das dichte Wachstum der Keime auf dem Impfstrich war die genaue Keimzahlbestimmung bereits ab einer Keimdichte von 1×10^3 KE/ml schwierig. Gegenüber dem Nasstupfverfahren hatte dieses Verfahren den Vorteil, dass es einfach und schnell zu handhaben war und dass der Schritt des Ausschüttelns in PBS entfiel. Für die Überprüfung der Reinigungs- und Desinfektionsfähigkeit der Baumaterialien war dieses Verfahren auf Grund der schlechten Koloniebestimmung nicht geeignet.

5.1.5 Vorversuch zum Nasstupfverfahren

Beim Nasstupfverfahren waren die Wiederfindungsraten in den 1×10^2 KE/ml und 1×10^3 KE/ml Lösungen mit durchschnittlich 4,5 Kolonien und 75 Kolonien ebenfalls niedrig. In der 1×10^4 KE/ml Verdünnung erzielte das Nasstupfverfahren eine Wiederfindungsrate von 2227 Kolonien.

Verglichen mit dem Trockentupfverfahren konnten die Wiederfindungsraten durch das Anfeuchten des Baumwolltupfers verbessert werden. Auch KELCH und FRIES (1959) steigerten die Keimausbeuten durch das Anfeuchten der Tupfer mit Peptonwasser. Durch das anschließende Ausschütteln des Tupfers in PBS und das Aufbringen dieser Keimflüssigkeit auf CLED-Agar waren die Keime gut auf dem Agar verteilt, und somit gut zu zählen. Die Handhabung dieses Verfahrens war gut. Mit dem Baumwolltupfer konnten auch Oberflächenvertiefungen erreicht werden. Nachteilig war der im Vergleich zum Trockentupfverfahren höhere Zeitaufwand.

Beim Vergleich des Nasstupfverfahren mit dem Gelatinegießverfahren auf Stallböden, lagen die Koloniezahlen des Nasstupfverfahren deutlich unter denen des Gelatine-Gießverfahren (ACKEMANN et al., 1982).

Nach DREßLER (1997) ist die Keimausbeute des Tupfverfahrens in niedrigen Konzentrationen höher als bei hohen Keimkonzentrationen, da bei hohen Konzentrationen nicht alle Keime mit dem Wattekopf aufgenommen werden können und ein Teil der Keime auf der Oberfläche zurückbleibt. In abgewandelter Form ist dieses Verfahren als Nass-Trockentupfverfahren (NTT) nach DIN 10113-3 zur quantitativen Keimzahlbestimmung anerkannt. Im Bereich der Lebensmittelhygienekontrolle wird dieses Verfahren als Referenzverfahren eingesetzt.

Auch mit dem NTT-Verfahren können nicht alle Keime wiedergefunden werden. Im Mittel ist eine Wiederfindungsrate von 70 bis 90% zu erwarten (LOUWERS und KLEIN, 1994 und UPMANN, 1996). Allerdings konnten diese Rückgewinnungsraten auch nur auf glatten Oberflächen erzielt werden.

DREßLER (1997) erreichte mit dem MEDKA-Tupfer (einem Tupfer mit großem Wattekopf) beim Nass-Trocken-Tupfverfahren Wiederfindungsraten von über 90% auf Edelstahlflächen in Großküchen der Bundeswehr. DREßLER (1997) verglich den MEDKA-Tupfer mit kleinen Rachenabstrichtupfern und erzielte mit den MEDKA-Tupfern eine um 1,5 Logarithmenstufen geringere Differenz zur ausgespatelten Keimmenge als beim Rachenabstrichtupfer. Das widerspricht den Ergebnissen von SCHULZE (2000), die durch den Einsatz von kleinen handelsüblichen SARSTEDT-Tupfern um etwa eine Zehnerpotenz höhere Keimausbeute erzielte als mit MEDKA-Tupfern.

Bei vergleichenden Untersuchungen des Nasstupfverfahren und des Nass-Trocken-Tupfermethode von DREßLER (1997) lagen die Wiederfindungsraten mit dem Nasstupfverfahren circa eine halbe log-Stufe unter der Wiederfindungsrate der Nass-Trocken-Tupfer-Methode.

SIBOMANA (1980) bemängelte bei dem Abstrichverfahren zur Probenentnahme die, verglichen mit den anderen Methoden der Oberflächenkeimzahlbestimmung, meisten variablen Parameter. So ist der ausgeübte Druck niemals gleich und auch besonders vom jeweiligem Probennehmer abhängig. Die Art des Tupfer spielt eine Rolle. Allerdings wurde diese Variable in den vorliegenden Versuchen durch den Einsatz von kommerziell hergestellten Baumwolltupfer standardisiert. Nach SIBOMANA (1980) hat der Winkel des Tupfers zur Probenentnahmefläche Einfluss auf die Wiederfindungsraten und natürlich die variable Anzahl an Keimen, die im Tupfer verbleiben. Nach SPECK und BLACK (1937) verbleiben etwa ein Viertel der Keime nach dem Auspressen der Tupferflüssigkeit im Tupfer. Im vorliegenden Versuch wurden die Tupfer in PBS-Lösung mit Hilfe eines Vortexers ausgeschüttelt. Das sollte die Anzahl der Keime, die im Tupfer verbleiben, minimieren. Allerdings ist auf die Bestimmung von *Serratia* Keimen im Tupfer verzichtet worden.

5.1.6 Vorversuch zum RODAC-Abklatschverfahren

Die Ergebnisse des RODAC-Abklatschverfahrens waren nicht zufriedenstellend. Die Wiederfindungsraten des Verfahrens in der 1×10^3 KE/ml und der 1×10^4 KE/ml lagen mit durchschnittlich 71,5 bzw. 390 Kolonien unter den Erwartungen von 100 Kolonien bzw. 1000 Kolonien für diese Verdünnungsstufen (es wurde nur 0,1 ml der Suspension auf die Oberfläche geimpft). Ebenso wie bei den Dip-Slides konnte hier das von MOSSEL et al. (1966) und LOUWERS und KLEIN (1994) beschriebene Problem, dass eine Kolonie auf dem Agar nicht

nur einer einzelnen Bakterie der Ausgangslösung entsprach, sondern einem Bakterienaggregat, verantwortlich sein.

In der Literatur werden die Wiederfindungsraten der RODAC-Platten mit 20 bis 25% angegeben (LEISTNER, 1956; GRÄF, 1974 und SCHULZE, 2000). Allerdings sind in Ringversuchen erhebliche Streuungen der Einzelergebnisse aufgetreten (SCHULZE, 2000). In Versuchen von CORETTI (1966) variierten die Wiederfindungsraten erheblich in Abhängigkeit der Materialien. Auf Aluminiumkeimträgern erzielte er mit dem Abklatschverfahren eine Wiederfindungsrate von 46%, während nur 2,8% der ursprünglichen Keimmenge auf Holz wiedergefunden wurde.

Im vorliegenden Vorversuch lagen die Wiederfindungsraten deutlich höher. Sicher war dafür die schnelle Probenentnahme nach dem Aufbringen der Keimsuspension verantwortlich. Denn feste Haftstrukturen der Keime zur Oberfläche, wie zum Beispiel die Bildung von Polymerbrücken, hatten sich nach fünf Minuten noch nicht ausgebildet. Nach NOTERMANS et al. (1983 und 1991) ist erst in der zweiten Stufe des Haftvorgangs von Bakterien „Verdichten der Bakterien an der Fläche“, die Umkehrung der Keimadsorption durch Waschen nicht mehr so einfach. Diese Verdichtungsphase beginnt aber erst zwei bis drei Stunden nach dem Aufbringen der Keime auf der Oberfläche.

Das RODAC-Verfahren war auf ebenen Flächen einfach und schnell auszuführen. Nach der Probenentnahme musste die RODAC-Platte nur in den Brutschrank gebracht und über Nacht bebrütet werden. Allerdings war auch bei diesem Verfahren, wie bei den Dip-Slides, die Anwendung auf unebenen und rauen Oberflächen ungünstig. Bei SCHULZE (2000) betragen die Wiederfindungsraten auf glatten Edelstahlflächen 5,1% während die Wiederfindungsraten auf Kunststoffschneidebrettern lediglich 2,6 % betragen. Für den deutlichen Unterschied wurde die raue Oberfläche der Schneidebretter verantwortlich gemacht.

Nach SIBOMANA (1980) geben Abklatschmethoden nur eine qualitative Orientierung des Oberflächenkeimgehaltes, sind aber für eine quantitative Bestimmung ungeeignet.

5.1.7 Auswahl des Verfahrens

Im Hauptversuch wurde das DSAP-Verfahren und das Nasstupferverfahren eingesetzt. Die Auswahl der Verfahren erfolgte aufgrund der Ergebnisse der Vorversuche bezüglich der Wiederfindungsraten und der Handhabung. Das RODAC-Abklatschverfahren und die Dip-Slides schieden wegen ihrer mangelnden Einsatzfähigkeit auf unebenen Flächen aus; das Trockentupferverfahren wegen den geringen Wiederfindungsraten. Das Nasstupferverfahren bot sich mit guten Wiederfindungsraten stellvertretend für ein Abstrichverfahren zur Bestimmung der Oberflächenkeimzahl an. Das Agarwurstverfahren hatte auch hohe Wiederfindungsraten in allen Verdünnungsstufen. Abgesehen von Kunstfelsen würde sich dieses Verfahren auch an den zu testenden Baumaterialien eignen. Hier war die schlechte Handhabung ausschlag-

gebend dafür, dass das Verfahren nicht im Hauptversuch zum Einsatz kam. Da der Agar nur durch den Kunstdarm geschützt war, bestand die Gefahr der Sekundärkontamination.

Erstaunlicherweise wurden mit einzelnen Verfahren mehr Keime nachgewiesen als theoretisch auf die Oberfläche gegeben wurden. Dieses Phänomen lag wahrscheinlich an dem von MÜLLER und HILDEBRANDT (1989) beschriebenen Umstand, dass es unter gleichen Bedingungen und mit gleichem Testvolumen zu einer Schwankung der Keimzahl im ausgeimpften Testvolumen kam. Dieses führte wiederum zu einer entsprechenden Streuung der Koloniezahlen auf den Agarplatten.

5.2 Auswahl des Testkeimes

Die Auswahl des Testkeimes hat einen enormen Einfluss auf die Ergebnisse bei der Überprüfung einer Desinfektion (HANEKE, 1991). Nach BARNES (1952) und WERNER et al. (1977) hat die Keimart ebenfalls einen Einfluss auf die Wiederfindungsrate.

Um die Bedingungen in einem Zoo am besten nachzuahmen, könnte man sich auf ein Bakterium beschränken, das man vor Ort im Stall gewonnen hat. Oder man wählt einen Keim aus, der besonders widerstandsfähig gegen Desinfektionsmittel ist. Durch den Einsatz von besonders widerstandsfähigen Keimen gegen das Desinfektionsmittel, kann man anschließend das Ergebnis stellvertretend auf alle Mikroorganismen übertragen (REUTER, 1989).

Allerdings ist die Wirksamkeit von Lysovet® PA gegenüber den Keimen *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Enterococcus faecium* "Kulmbach Str. 2", *Proteus mirabilis* ATCC 14153, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Mycobacterium avium* Subspezies *avium* (Av 56) und *Candida albicans* ATCC 10231 durch die DVG bereits überprüft worden.

Daher wurde in dieser Arbeit nur die Überlebensrate nach Eintrocknung als Indikator verwendet. Somit wurden die Keime in Bezug auf ihre Widerstandsfähigkeit gegen Eintrocknung getestet. Es wurde die Keimart bestimmt, die nach 30 Minuten Eintrocknungszeit die höchste Wiederfindungsrate hatte.

Bei allen getesteten Keimen konnte ein negativer Einfluss auf die Wiederfindungsraten durch das Eintrocknen der Keimlösung festgestellt werden. Dabei sank die Wiederfindungsrate mit Zunahme der Trocknungszeiten. Die Auswirkungen waren bei den verschiedenen Keimen, aber auch zwischen den verschiedenen Spezies sehr unterschiedlich.

Von den im Vorversuch getesteten vier *Escherichia coli* Stämmen, konnten von *E.coli* ATCC 25922 nach dreißig Minuten Eintrocknung keine Keime wiedergewonnen werden. Von den anschließend getesteten drei verschiedenen Wildstämmen konnten von *E.coli* Wildstamm 1 und *E.coli* Wildstamm 2 nach dreißig Minuten 7 bzw. 2 Kolonien wiedergewonnen werden, während die Wiederfindungsrate von *E.coli* Wildstamm 3 nach dreißig Minuten bei 150 Kolonien lag.

Die Keime *Serratia marcescens* (Ringversuch) und *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25913 wurden durch die Eintrocknung weniger beeinflusst. Ihre Wiederfindungsraten lagen nach dreißig Minuten noch bei 28,5% und 26,8%. Das ist erstaunlich, denn normalerweise hat der Eintrocknungsprozess auf gramnegative Keime einen höheren Einfluss als auf grampositive Keime (SCHULZE, 2000).

Auch nach RÜHLMANN und FELDHUSEN (1995) ist die Wiederfindungsrate von *Escherichia coli* Keimen vom Grad der Trocknung der Keimsuspension abhängig.

SCHULZE und HILDEBRAND (1994) sowie RÜHLMANN und FELDHUSEN (1995) hatten bei vielen Keimarten bereits nach einer Trocknungszeit von sechs und fünf Minuten eine niedrige Wiederfindungsrate. SCHULZE (2000) fand einen umgekehrt proportionalen Zusammenhang zwischen Trocknungszeit und Wiederfindungsrate bei *Escherichia coli* und *Enterobacter cloacae* heraus.

DREßLER (1997) machte die Erfahrung, dass auf feuchten Oberflächen die Wiederfindungsraten des Nass-Trocken-Tupfverfahrens deutlich höher lagen als nach Antrocknung.

Da für den Hauptversuch Keime benötigt wurden, die mindestens eine Eintrocknung von dreißig Minuten überleben, wurde bei allen Keimen die Auswirkung der Trocknungszeiten von fünf Minuten und dreißig Minuten getestet und die Ergebnisse miteinander verglichen.

E.coli hatte nach dreißig Minuten Eintrocknung nur noch eine geringe Überlebensrate. Die Wiederfindungsraten wurden sowohl bei ATCC-Stämmen als auch bei Feldisolate gleichermaßen negativ durch den Trocknungsprozess beeinflusst. Auch DREßLER (1997) machte die Erfahrung, dass *Escherichia coli* Keime verstärkt beim Eintrocknungsprozess absterben. *Serratia marcescens* hatte trotz dreißig Minuten Eintrocknung von allen Keimen die höchste Wiederfindungsrate. Außerdem bildete dieser Keim auf CLED-Agar gut auszählende Kolonien. *Pseudomonas aeruginosa* hatte durchschnittlich hohe Wiederfindungsraten, allerdings wuchs dieser Keim auf dem CLED-Agar mit matter Oberfläche und rauem Rand (OXOID-Handbuch, 1993), und daher waren die einzelnen Kolonien bei höheren Keimzahlen nur schlecht abzugrenzen und damit schlecht zu zählen.

Durch Glucose-Bouillon konnte dem Trocknungsprozess entgegen gewirkt und die Überlebensfähigkeit der *Serratia marcescens* Keime noch verbessert werden.

Allerdings schwanken die Ergebnisse auch bei mehrmaliger Bestimmung der Wiederfindungsrate von ein und demselben Keim. Beispielsweise bei *Pseudomonas aeruginosa*.

Die Schwankungen der Ergebnisse lassen sich durch methodische Probleme (SCHULZE, 2000) erklären. Nach SCHULZE (2000) ist es unmöglich für jeden Arbeitsschritt standardisierte Bedingungen zu schaffen. Ein weiteres Problem ist nach SCHULZE (2000) die Variabilität der Mikroorganismen, ihr unterschiedliches Wachstumsverhalten, ihr Haftvermögen und ihre Umweltresistenz.

5.3 Einfluss der Keimdichte auf die Wiederfindungsrate

In den einzelnen Ansätzen des Vorversuchs wurden die Keime in den Verdünnungsstufen 1×10^3 KE/ml und 1×10^4 KE/ml auf ihre Widerstandfähigkeit gegenüber Eintrocknung getestet. Für den Hauptversuch war es von Interesse, inwieweit die Keimdichte Einfluss auf die Wiederfindungsrate nimmt.

Das Zählen der Kolonien stellt nach MÜLLER und HILDEBRANDT (1989) eine bedeutende Fehlerquelle da. Geringes Koloniewachstum führt beim Zählen durch die Gefahr des großen Stichprobenfehlers zu ungenauen Ergebnissen. Daher sollte man nach der Meinung dieser beiden Autoren im Vorfeld bei kulturellen Keimzahlbestimmungen Zählbereiche festlegen.

Nach WILSON (1922), LEMBKE und WASSERFALL (1963) ist der optimale Zählbereich erreicht, wenn die Summe des Stichprobenfehlers und des Überfüllungsfehlers minimal ist.

In der Literatur werden unterschiedliche Meinungen vertreten, wann sich ein Überfüllungsfehler ergeben würde. Während WILSON (1922) bereits eine Unterschätzung der wahren Keimzahl bei mehr als 300 Kolonien pro Platte erwartet, vertritt SCHUBERT (1942) die Ansicht, dass ein Überfüllungsfehler erst bei Platten mit mehr als 2000 Kolonien auftritt.

Unter Berücksichtigung dieser Aussagen kam für den Hauptversuch die Verdünnung 1×10^4 KE/ml zum Einsatz. Da für den Versuch nur 200 μ l der Ausgangslösung pro Probeentnahmefeld verwendet wurden, war theoretisch eine maximale Wiederfindungsrate von 2000 Kolonien auf 16 cm² zu erwarten.

Somit wurde der Überfüllungsfehler minimal gehalten, trotzdem waren genügend Keime vorhanden, die durch die Reinigung und Desinfektion entfernt bzw. abgetötet werden konnten. Die Koloniedichte wird nicht nur von der Zahl der Kolonien, sondern auch von der Größe der Kolonien bestimmt. Daher sollten die Kolonien für den quantitativen Keimnachweis nicht so groß wachsen (MÜLLER und HILBEBRANDT, 1989). Nach NIEMELÄ (1965) kann dies durch kurze Inkubationszeiten und die Verwendung von nicht zu nährstoffreichen Medien erreicht werden. Die Dicke des Nährbodens beeinflusst die Größe der Kolonie, da mehr Nährstoffe für das Wachstum der Kolonien zur Verfügung stehen. Allerdings spielt hierbei auch die Länge der Inkubation eine entscheidende Rolle. Erst mit der Zeit diffundieren die Nährstoffe aus den tieferen Schichten des Agars an die Oberfläche (MÜLLER und HILDEBRANDT, 1989). Auch SINELL et al. (1965) sieht einen Zusammenhang zwischen Größe der Kolonien und Genauigkeit der Koloniebestimmung.

Im Vorversuch als auch im Hauptversuch wurden die Platten 18 Stunden bebrütet. Die auf den Platten gewachsenen Kolonien waren zu dieser Zeit noch klein und es kam in den Verdünnungsstufen 1×10^2 bis 1×10^4 KE/ml nur selten zur Rasenbildung.

5.4 Wiederfindungsraten auf den verschiedenen Baumaterialien mit dem DSAP-Verfahren und dem Nasstupfverfahren

Die Wiederfindungsraten auf den jeweiligen Materialien gaben Aufschluss über die Struktur der getesteten Oberflächen. Es bestand die Möglichkeit, dass die Keimflüssigkeit direkt in das Innere des Materials gelangen konnte, wie das zum Beispiel bei der Spanplatte oder beim Kantenstein der Fall war.

Zum anderen wiesen die Oberflächen von Baustoffen Vertiefungen auf, in denen sich Keime der Probenentnahme entzogen, beispielsweise beim Kunstfelsen.

Bei den Materialien Relatex[®], Bodenfliese, Wandfliese, Betoplan[®], Trespa Athlon[®] und Betonkantenstein mit Prolapit[®]-Versiegelung lag das arithmetische Mittel bei über 1500 wiedergefundenen Keimen.

Durchschnittlich 500 bis 1500 Keime wurden auf den Materialien Blech, Kunststoffplatte, Plexiglas und Glas wiedergefunden.

Bei der Spanplatte und dem Kantenstein ohne Prolapit[®]-Versiegelung waren die Wiederfindungsraten unter 500 Keimen.

Die Wiederfindungsraten auf der Kunstfelsenoberfläche variierten erheblich zwischen dem DSAP-Verfahren und dem Nasstupfverfahren. Mit dem Nasstupfverfahren wurden durchschnittlich 544 Keime aufgenommen, dagegen wuchsen auf dem LB-Agar des DSAP-Verfahrens 1365 Keime.

Bei der Bestimmung der Rückgewinnungsraten auf den Oberflächen wurden die auf dem jeweiligen Agar gewachsenen Kolonien gezählt. Auf Grund der hohen Koloniedichte war mit einem Ablesefehler zu rechnen (MÜLLER und HILDEBRANDT, 1989).

Nach UNTERMANN (1970) und FRUIN et al. (1977) ist die Größe des Zählfehlers von der Routine und Sorgfalt des Untersuchers abhängig. Im vorliegenden Versuch wurden die Kolonien zum Teil komplett gezählt oder es wurde stellvertretend ein Achtel der Agarplatte ausgezählt und das Ergebnis mit acht multipliziert. Der errechnete Wert wurde als Wiederfindungsrate angesehen. Durch den individuellen Zählfehler und der unterschiedlichen Koloniebestimmung war von großen Unterschieden der Zählgenauigkeit auszugehen. Für die Bewertung der Wiederfindungsraten wurden die Baumaterialien in Gruppen von 0-500, von 500-1500 und größer als 1500 eingeteilt, die die Schwankungsbreite schon berücksichtigten. Entsprechend der vorliegenden Ergebnisse lassen sich die Baumaterialien bezüglich ihrer Eignung als Materialien im Veterinär- und Quarantänebereich einteilen.

Sowohl die Materialien mit Wiederfindungsraten von 1500 und mehr Keimen als auch die Materialien mit Wiederfindungsraten von 500 bis 1500 Keimen weisen eine relativ glatte und versiegelte Oberfläche auf. Ohne eine Beschädigung der Oberfläche gelangen die Keime

nicht in das Innere des Materials, um sich somit der Reinigung zu entziehen. Daher ist davon auszugehen, dass die Keime bei den Versuchen: Wasserreinigung, Wasserreinigung mit Schwamm und Reinigungsmittel und Desinfektion mit Lysovet®PA von den Oberflächen entfernt bzw. abgetötet worden sind. Diese Materialien sind somit für den Einsatz in Veterinär- und Quarantänebereich geeignet.

Die Materialien Spanplatte und Betonkantenstein hatten niedrige Wiederfindungsraten von unter 500 Keimen. Auf Grund ihrer porösen Oberfläche konnte ein Teil der Keimsuspension direkt in das Innere des Materials geleitet werden. Auch CORETTI (1966), MAUNZ und KRANZ (1969) und MOUSSA (1977) erzielten auf porösen Oberflächen eine niedrige Keimrückgewinnungsrate verglichen mit versiegelten Oberflächen.

Bei diesen Materialien könnten sich, durch die Adsorption von keimhaltiger Flüssigkeit in tiefere Schichten, trotz Reinigung und Desinfektion überlebensfähige Keime im Inneren der Materialien befinden. Daher sind diese Materialien ein Hygienerisiko und für den Veterinär- und Quarantänebereiche nicht geeignet.

Beim Kunstfelsen eignet sich das Nasstupfverfahren nicht zum Nachweis der Oberflächenkeimzahl. Auf Grund der unebenen Oberfläche und den zahlreichen Unebenheiten können sich Keime dem Nachweis entziehen.

Dagegen werden bei diesem Baumaterial die meisten Keime mit dem DSAP-Verfahren erfasst. Durch den direkten Kontakt des LB-Agars zur Oberfläche und der Möglichkeit, dass sich der Agar der Oberflächenbeschaffenheit anpasst, wurden mit dieser Methode deutlich mehr Keime wiedergewonnen.

Auf Grund der Oberflächenstruktur des Kunstfelsens, konnten trotz Reinigung deutlich mehr Keime nachgewiesen werden, als auf den Oberflächen der anderen Materialien. Da sich die Keime zum Teil gut in den Vertiefungen einer Reinigung entziehen konnten, gilt Kunstfelsen auch als Hygienerisiko. Der Zeitaufwand für eine gründliche Reinigung liegt beim Kunstfelsen deutlich höher als bei glatten Oberflächen. Auf Kunstfelsen sollte daher im Veterinär- und Quarantänebereich verzichtet werden.

Untersuchungen von FRANK und CHMIELEWSKI (1996) in Betrieben der Lebensmittelverarbeitung haben ergeben, dass sich durch Anrauen der Oberflächen von rostfreiem Stahl als Material von Ausgüssen die Wirkung von Chlor und quaternären Ammoniumverbindungen nicht verschlechterte. Nach Meinung von FRANK und CHMIELEWSKI (1996) bedeutet eine erhöhte Porosität oder Rauheit nicht gleichzeitig eine schlechtere Desinfektionsfähigkeit. Allerdings verschlechterte sich die Reduzierung von Keimen auf aufgerauten Oberflächen durch Abspülen mit einfacher Pufferlösung um ca. eine log-Stufe. In den von FRANK und CHMIELEWSKI (1996) durchgeführten Versuchen hatten die eingesetzten *Staphylococcus aureus* Keime vier Stunden Zeit um sich an die Materialoberfläche zu haften. Das Anhaften

der Keime an die Oberfläche verhindert zum großen Teil das Abspülen der Keime mit Pufferlösung, aber beeinflusst nicht ihr Abtöten durch Desinfektionsmittel. Allerdings wird mit der Zeit die Haftung der Keime an der Oberfläche stärker. Nach NOTERMANS et al. (1983 und 1991) haften Keime erst zwei bis drei Stunden nach dem Aufbringen auf die Oberfläche so stark an, dass das Entfernen erschwert ist.

Durch die schnelle Probenentnahme nach dem Aufbringen der Keime im Hauptversuch (dreißig Minuten) hatten die Keime noch keine Möglichkeit extrazelluläre Polymere als Haftstrukturen zwischen sich und der Oberfläche zu bilden. Somit wurden die Wiederfindungsraten von *Serratia marcescens* auf den Oberflächen in den ersten drei Versuchsdurchläufen auch nicht beeinflusst.

5.5 Effekt der Reinigung

Bei der Reinigung der verschiedenen Baumaterialien mit Wasser haben sich die Aussagen von MOSTELLER und BISHOP (1993), BÖHM (2002), und METZLER (2002) bestätigt, dass durch eine Reinigung die Keimbelastung um drei Zehnerpotenzen reduziert werden kann.

Auffällig ist die hohe Wiedergewinnungsrate von durchschnittlich 24 Keimen des DSAP-Verfahrens auf Kunstfelsen. Das stärkt die Vermutung, dass sich auf Kunstfelsen Keime in den Unebenheiten ansiedeln und durch Reinigung nicht erreicht werden.

Durch die Zuhilfenahme von Geräten (Schwamm), Reinigungsmittel und einer Wassertemperatur von circa 40°C konnten die Keimzahlen auf den verschiedenen Baumaterialien, verglichen mit der Kaltwasserreinigung, noch weiter reduziert werden und es wurden nur noch vereinzelt Keime wiedergefunden.

Das zeigt, dass die mechanische Wirkung des Schwamms im Zusammenhang mit dem Reinigungsmittel Keime besser in Lösung bringt als Wasser alleine.

Nach Untersuchungen von STOY (1983) ist für eine Stallreinigung eine Wassertemperatur von 40°C ausreichend. Höhere Temperaturen verbessern die Keimreduktion nur geringfügig (Verbesserung der Keimreduktion bei der dritten Stelle hinter dem Komma).

Die hohen arithmetischen Mittel der Wiederfindungsraten des DSAP-Verfahrens auf Kunstfelsen (20 Keime), Spanplatte (15 Keime) und Betonkantenstein (13 Keime) nach der Reinigung mit Reinigungsmittel und Schwamm unterstreichen die These, dass unversiegelte oder zerklüftete Oberflächen Keimen besser die Möglichkeit geben sich der Reinigung zu entziehen (RÖDEL et al., 1994).

Nach BÖHM (2001) hängt die Reduktion der Keimzahl von der Art und Beschaffenheit der Oberfläche ab.

Untersuchungen von STOY (1983) bestätigten den bedeutenden Einfluss der Oberflächenbeschaffenheit auf den Keimgehalt nach einer Reinigung. Beim Vergleich der Wiederfin-

dungsraten von verschiedenen Stallfußbodenmaterialien nach Hochdruckreinigung bestand ein quantitativer Abfall der Wiederfindungsraten von Beton über Holz zu Gummi zu Aluminium.

Als Grund für den unterschiedlichen Reinigungseffekt nahm STOY (1983) an, dass die Keime auf porösen Oberflächen tiefer in das Material eindringen können und somit besser gegen Austrocknung geschützt sind, als auf glatten Oberflächen. Und, dass Keime auf glatten Oberflächen besser vom Reinigungswasser erfasst und abgeschwemmt werden.

Auf Grund der guten Ergebnisse der Wasserreinigung im vorliegenden Versuch könnte rückschließend das tägliche Ausspritzen der Ställe als Routinereinigung als ausreichend angesehen werden und nach Bedarf durch eine mechanische Reinigung noch verbessert werden.

Allerdings widerspricht das den Ergebnissen anderer Autoren (SCHALLER, 1972; BARTELS et al., 1973; TÄNDLER und HÄHNE, 1973; KERSKEN, 1973 und DREßLER, 1997), bei denen eine mechanische Reinigung mit Wasser und gegebenenfalls Reinigungsmitteln von Kunststoffschneidebrettern in Fleisch verarbeitenden Betrieben und in Großküchen nicht zu der gewünschten Keimreduzierung führte.

In den genannten Betrieben spielte die Eiweißbelastung auch eine größere Rolle als im vorliegenden Versuch. Ebenso hat die im vorliegenden Versuch kurze Eintrocknungszeit der Keimsuspension auf den Oberflächen und die dadurch bedingte geringere Haftung der Keime an der Oberfläche einen positiven Einfluss auf den Effekt der Reinigung. Nach NOTERMANS (1981) bilden sich feste Haftstrukturen zwischen Keim und Oberfläche erst nach zwei bis drei Stunden aus. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die Keime durch Antrocknen auf den Oberflächen absterben, konnte die Keimsuspension vor der Reinigung nicht über zwei Stunden auf den Materialien verbleiben.

Nach MÜLLER und SCHLENKER (2003) ergänzen sich Reinigung und Desinfektion bezüglich der Keimreduzierung. Die Reinigung hat die Aufgabe, Schmutz mit eingeschlossenen Mikroorganismen von den Oberflächen zu entfernen, damit das anschließende angewendete Desinfektionsmittel der Oberfläche anhaftenden Keime erreicht.

Nach HAFEZ und BÖHM (2002) ist das Ziel einer Reinigung im Stall die Entfernung von organischem Material, um die Wirksamkeit des Desinfektionsmittels zu fördern und das Eindringen des Desinfektionsmittels in poröse Flächen zu ermöglichen.

Im vorliegenden Versuch wurden die Oberflächen aber lediglich mit Keimsuspension kontaminiert. Auf die unter Praxisbedingungen zu erwartenden Verschmutzungen, wie zum Beispiel Kot, Urin oder Futterreste, wurde keine Rücksicht genommen. Daher spiegelt dieser Teil des Versuchs nicht die natürlichen Bedingungen im Zoo wider. Es bietet sich eine

Untersuchung der Reinigung vor Ort an und die Effizienz einer Reinigung im Stall zu überprüfen.

5.6 Ergebnis der Desinfektion

Das eingesetzte Desinfektionsmittel Lysovet®PA ist von der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG) für die Tierhaltung auf Wirksamkeit geprüft worden. Der Keimträger test, als standardisiertes Modell der Flächendesinfektion unter Stallbedingungen, hat mit Lindenholz stattgefunden.

Nach einem Gutachten von REUTER (1992) wurde das Desinfektionsmittel Lysovet®PA in 2% Gebrauchslösung nach den Richtlinie der DVG von 1988 auf Bakteriostase und Fungistase sowie Bakterizidie und Fungizidie ohne und mit Eiweißbelastung getestet und es wurde der Keimträger test durchgeführt. Anschließend wurde Lysovet®PA als wirksames Desinfektionsmittel in die Desinfektionsmittelliste der DVG für die Tierhaltung aufgenommen.

Der Keimträger test ist nach den Richtlinien der DVG ein qualitativer Keimträger test, d.h. das Desinfektionsmittel tötet alle Keime ab und ist somit wirksam oder das Desinfektionsmittel tötet nicht alle Keime ab und wird als unwirksam eingestuft.

Nach BÖHM (2001) kann ein Keimträgerversuch auch mit quantitativer Aussage durchgeführt werden. Demnach werden die Keimträger mit der Testsuspension beimpft und sechzig Minuten getrocknet. Anschließend wird der Keimträger mit Desinfektionsmittel überschichtet und nach dreißig Minuten Einwirkungszeit wird der Keimträger fünf Minuten im Neutralisationsmedium aufbewahrt. Danach wird die Keimzahl mittels Plattenguss- oder Oberflächenverfahren bestimmt. Mit diesem Verfahren wird die Keimreduzierung auf den Oberflächen bestimmt.

Im vorliegenden Versuch wurde ähnlich, wie beim quantitativen Keimträgerversuch nach BÖHM (2001) vorgegangen.

Allerdings stand in diesem Versuch nicht die Wirkung des Desinfektionsmittel im Vordergrund, dies wurde ja bereits durch die DVG untersucht, sondern es sollte gezielt die Wirkung des Desinfektionsmittels auf den zu untersuchenden Oberflächen bestimmt werden.

Viele Autoren haben bereits Desinfektionsmittel auf ihre Effektivität an bestimmten Oberflächenmaterialien überprüft (FRANK und CHMIELEWSKI, 1996), Wirksamkeitsprüfungen von Desinfektionsmitteln unter praxisnahen Bedingungen durchgeführt (HANEKE, 1991) oder die Effizienz einer Reinigung und Desinfektion in bestimmten Einrichtungen überprüft (STOY, 1983; HEILIGENTHAL, 1995 und DREßLER, 1997).

Bei den Vorgehensweisen lassen sich Parallelen ziehen. Sowohl die Keimträger tests der DVG (2000) und der DGHM (1984) als auch die Untersuchungen von FRANK et al. (1996) gliedern die Untersuchungen in bestimmte Abschnitte (HANEKE, 1991):

- Keimaufbringung und Antrocknungsphase
- Desinfektionsphase
- Keimrückgewinnung
- Auszählen der überlebenden Keime

In der vorliegenden Arbeit wurden die bewährten Arbeitsabschnitte beibehalten. Allerdings unterscheiden sich die Versuche durch unterschiedliche Einwirkungszeiten. So hatte die Keimsuspension in dieser Arbeit nur dreißig Minuten Einwirkungszeit auf den Oberflächen vor der anschließenden Desinfektion. Diese Zeit wurde auf Grund der Ergebnisse im Vorversuch festgelegt, um die Absterberate der Keime durch Eintrocknung möglichst gering zu halten.

Auf die, bei der Desinfektionsmittelprüfung übliche Inaktivierung des Desinfektionsmittels vor der Keimrückgewinnung durch eine entsprechende Inaktivierungssubstanz, wurde im vorliegenden Versuch verzichtet. Die Baumaterialien wurden nach der Desinfektion unter dem Wasserhahn komplett abgewaschen. Daher ist nicht davon auszugehen, dass sich auf den Oberflächen noch Desinfektionsmittelreste befanden. Auch HEILIGENTHAL (1995) setzte den Nährmedien nach erfolgter Desinfektion keine Inaktivierungssubstanzen zur Keimkultivierung bei. DREßLER (1997) untersuchte verschiedene Abklatschmedien und fand heraus, dass der speziell für die Untersuchung von desinfizierten Oberflächen hergestellte Agar-Kontaktträger Difco D/E mit Zusatz von Enthemmsubstanz (je eine Seite mit Caseinpepton-Sojamehlpepton und D/E-Neutralisierungagar) zur Überprüfung von desinfizierten Oberflächen keine Vorteile gegenüber anderen Abklatschmedien hatte.

Das Desinfektionsmittel Lysovet[®]PA zeigt unter Laborbedingungen eine fast 100-prozentige Wirksamkeit gegen *Serratia marcescens*, obwohl die von der DVG angegebene Einwirkungszeit von sechzig Minuten deutlich unterschritten wurde.

Grundsätzlich sollte die von der DVG festgelegte Einwirkungszeit von sechzig Minuten unter Praxisbedingungen aber nicht unterschritten werden, weil sonst das unter 2.2.6 und 2.2.9 beschriebene Problem der zu kurzen Einwirkungszeit und der damit verbundenen Desinfektionsmittelresistenz auftreten kann.

Allerdings zeigten Untersuchungen von REUTER (1992) das Lysovet[®]PA in 2% Gebrauchslösung in Suspensionsversuch mit und ohne Eiweißbelastung nach dreißig Minuten Einwirkungszeit ein Bakterien- und Hefewachstum komplett verhinderte.

Im Holzkeimträgerversuch konnten in einer 2% Gebrauchslösung von Lysovet[®]PA nach dreißig Minuten teilweise Keime rückgewonnen werden. Erst nach einer Einwirkungszeit von sechzig Minuten war bei allen Prüfstämmen eine 100%ige Abtötung erreicht.

Im vorliegenden Versuch wurde das Desinfektionsmittel nur für dreißig Minuten auf die Oberflächen gegeben, weil das den Anwendungspraktiken im Zoo entsprach. Für die Zukunft soll-

ten die Zoomitarbeiter Lysovet®PA in 2% Gebrauchslösung mit einer Einwirkungszeit von sechzig Minuten einsetzen, um eine optimale Desinfektion zu gewährleisten.

Mit dem Nasstupferverfahren und dem DSAP-Verfahren konnten nur einzelne Kolonien nachgewiesen werden. Das Nasstupferverfahren wies in einer Einfachbestimmung auf Trespa Athlon® eine Kolonie und in einer Einfachbestimmung auf Relatex® drei *Serratia marcescens* Kolonien nach. Das DSAP-Verfahren wies eine Kolonie nach Probenentnahme auf der Wandfliese nach.

Bei der Spanplatte und bei dem Kantenstein ohne Prolapit® wäre der zusätzliche Nachweis mit einem destruktiven Verfahren der Keimzahlbestimmung sinnvoll gewesen. Auf Grund der Ergebnisse unter 4.4.1 ist damit zu rechnen, dass ein großer Teil der Keimflüssigkeit in das Innere der Materialien gezogen ist. Nach RÖDEL et al. (1994) konnten durch das Abhobeln einer 0,25 mm tiefen Schicht von den Oberflächen von Holzschneidebrettern auch die Keime nachgewiesen werden, die durch die Saugkraft des Holzes in tiefere Schichten absorbiert wurden.

Auch das Desinfektionsmittel war im vorliegenden Versuch in das Materialinnere gezogen, jedoch könnte die Wirkung des Desinfektionsmittels in tieferen Schichten nur beurteilt werden, wenn man den Nachweis von vermehrungsfähigen *Serratia marcescens* Keimen im Inneren der Materialien erbringt.

Grundsätzlich ist aber von einer fast 100-prozentigen Wirkung des Desinfektionsmittels Lysovet®PA nach einer Einwirkungszeit von dreißig Minuten auszugehen.

Es sollte aber bedacht werden, dass der vorliegende Versuch unter Laborbedingungen stattgefunden hat. Demnach ist das Desinfektionsmittel auf den sauberen Oberflächen der Materialien wirksam. Durch zusätzlichen Schmutz, wie zum Beispiel Kot und Futterresten auf den Oberflächen, ist nicht von einer kompletten Keimabtötung nach einmaliger Desinfektion auszugehen.

Nach MÜLLER und SCHLENKER (2003) ist auf Stallböden erst nach mehrmaliger Desinfektion eine komplette Keimabtötung möglich. Nach einmaliger Reinigung und Desinfektion verbleiben etwa 1000 KE/cm² auf den Stallböden.

Auf Grund der fast kompletten Keimabtötung nach der Desinfektion mit Lysovet®PA ist nicht von einer Beeinträchtigung des Desinfektionsmittels durch die überprüften Materialien auszugehen.

BRILL (1991) stellte sich die Frage, ob Desinfektionsmittel, die durch die DVG auf Holzkeimträger getestet wurden, auch auf Beton die gleiche Wirksamkeit haben. In seinen Untersuchungen testete er den Einfluss von Beton auf die Wirksamkeit von aldehydbasierten Desinfektionsmitteln (Lysovet®PA) und säurebasierten Desinfektionsmitteln.

Als Ergebnis stellte er fest, dass aldehydbasierte Präparate durch die Alkalität von Beton nicht in ihrer Wirkung beeinträchtigt wurden, allerdings war die Wirkung des säurebasierten Desinfektionsmittel deutlich reduziert.

Das entspricht dem Ergebnis der Desinfektion von Betonkantenstein. Durch Lysovet[®]PA wurden die *Serratia marcescens* Keime auf der Oberfläche des Kantensteins abgetötet.

Durch die Deutsche Landwirtschaftsgesellschaft (DLG) ist Lysovet[®]PA auf seine Anwendungseigenschaften (Korrosionsverhalten, Benetzungsfähigkeit, Aufschäumen im Hochdruckreiniger, Tierverträglichkeit etc.) geprüft worden und ihm wurde das entsprechende Gütesiegel der DLG verliehen.

Nach BÖHM (2002) sind die Prüfungsrichtlinien der DLG die einzigen kodifizierten Richtlinien für die anwendungstechnische Prüfung von Desinfektionsmitteln.

Somit hat Lysovet[®]PA den Korrosionstest, die Überprüfung der Grenzflächenaktivität, die Verträglichkeit in unbelegten und belegten Stallungen und den Anwendungstest bezüglich Schaumverhalten bei der Anwendung mit Hochdruckreiniger, Dampfstrahler, Verdampfungsgerät und Vernebelungsgerät bestanden.

Auch die im Versuch eingesetzten Materialien zeigten optisch keine Veränderungen durch Lysovet[®]PA.

5.7 Vergleich des Nasstupferverfahrens mit den DSAP-Verfahren im Hauptversuch

Im Hauptversuch wurden die Verfahren DSAP-Verfahren und das Nasstupferverfahren angewandt.

Beide Probeentnahmeverfahren eigneten sich für die Oberflächenkeimzahlbestimmung auf den zu untersuchenden Materialien und ergänzten sich bezüglich ihrer Vorteile.

Der Arbeitsaufwand ist wie unter 4.1.1.2 beschrieben bei beiden Verfahren hoch. Bei Routineuntersuchungen, die lediglich eine orientierende Keimzahlbestimmung benötigen, sollte auf Grund des geringeren Arbeitsaufwandes, auf Schnellverfahren, wie zum Beispiel RODAC-Abklatschplatten, zurückgegriffen werden.

Bei den Bestimmungen der Wiederfindungsraten auf den jeweiligen Oberflächen der verschiedenen Baumaterialien erzielten das Nasstupferverfahren und das DSAP-Verfahren ähnliche Ergebnisse. Auf den Oberflächen von Betoplan[®] und Relatex[®] konnte das Nasstupferverfahren durchschnittlich hundert Prozent und mehr Keime wieder gewinnen. Das DSAP-Verfahren hatte bei diesen Materialien Wiederfindungsraten von X_{\max} gleich 85%.

Ursächlich für die, verglichen mit dem Nasstupferverfahren, niedrige Wiederfindungsrate kann die kleinere Agaroberfläche des DSAP-Verfahrens sein.

Beim DSAP-Verfahren wurde der flüssige Agar auf die definierte Fläche von 16 cm² aufgebracht. Der Rahmen hielt den Agar auf dieser Fläche. Anschließend wurde der erstarrte Agar von den Oberflächen abgenommen und im Brutschrank bebrütet.

Beim Nasstupferverfahren wurde auch die definierte Fläche von 16 cm² beprobt, allerdings wurde anschließend der Tupfer in PBS-Lösung aufgeschüttelt und die Keim-PBS-Lösung wurde auf CLED-Agar ausgestrichen. Die Oberfläche des CLED-Agars beträgt ca. 64 cm². Somit sind die Keime auf einer größeren Fläche verteilt und die Wachstumsbeeinflussung durch die Keime ist geringer als bei dem DSAP-Verfahren.

Auch LOUWERS und KLEIN (1994) beschrieben diesen Vorteil von Tupferverfahren im Vergleich mit Abklatschverfahren. Mit dem Tupfer können die Keime von der Oberfläche abgenommen werden und jeder abgetragene lebensfähige Keim kann eine Kolonie auf dem Nährboden bilden, während bei einer hohen Keimdichte einzelne Kolonien beim DSAP-Verfahren ursprünglich aus einem Keimaggregat entstanden sein können (LOUWERS und KLEIN, 1994).

Dagegen war das DSAP-Verfahren bei der Überprüfung der Wasserreinigung und der Reinigung mit Schwamm und Reinigungsmittel vor allem auf unebenen Oberflächen das sensitivere Verfahren. Die Wiederfindungsraten des DSAP-Verfahrens auf Kunstfelsen waren mit durchschnittlich 24 Keimen nach der Wasserreinigung und 20 Keimen nach der Reinigung mit Schwamm und Reinigungsmittel deutlich höher als die des Nasstupferverfahrens. Das Nasstupferverfahren erzielte nach Wasserreinigung durchschnittlich nur 0,67 Keime und nach mechanischer Reinigung (mit Schwamm und Reinigungsmittel) konnte das Verfahren keine Keime wiedergewinnen.

Durch das DSAP-Verfahren konnten auf unebenen Flächen Keime durch den direkten Kontakt des Agars mit der Oberfläche besser aufgenommen werden.

Bei der Überprüfung der Desinfektion ließen sich auf Grund der nur vereinzelt wieder gewonnenen Keime keine Vergleiche bezüglich der Sensitivität der Verfahren anstellen.

Auch nach ANGELOTTI et al. (1957) hat das DSAP-Verfahren eine hohe Genauigkeit zur Bestimmung von Oberflächenkeimen. ANGELOTTI et al. (1957) verwendeten das DSAP-Verfahren als Referenzverfahren beim Methodenvergleich zur Bestimmung der Oberflächenkontamination. Bei den von ihnen geprüften sechs Verfahren erzielte das DSAP-Verfahren durchschnittlich die höchsten Wiederfindungsraten.

Tupfer-Abstrichverfahren werden wie in der vorliegenden Arbeit häufig als Untersuchungsverfahren von Oberflächenkontamination eingesetzt (SIBOMANA, 1980; HEILIGENTHAL, 1995; UPMANN, 1996; DREßLER, 1997).

ACKEMANN et al. (1982) überprüften den Keimgehalt von verschiedenen Stallböden und verglichen gleichzeitig das Nasstupferverfahren mit dem Gelatine-Gießverfahren. Sie erziel-

ten auf einem Stallgangfußboden, einer Kunstharz-Fußbodenmatte und einer Gummi-Fußbodenmatte mit dem Gelatine-Gießverfahren wesentlich höhere Keimzahlen.

Das Gelatine-Gießverfahren wurde wie das DSAP-Verfahren angewandt. Allerdings wurde nach der Probenentnahme die Gelatine verflüssigt und der Keimgehalt in Verdünnungsreihen bakteriologisch bestimmt.

Durch die Verwendung von LB-Agar statt Gelatine wurde der Arbeitsaufwand in der vorliegenden Arbeit verringert. Nach der Probenentnahme konnte der erstarrte Agar auf eine Petrischale überführt und in den Brutschrank verbracht werden.

Allerdings ermöglichen Verdünnungsreihen den Nachweis von höheren Keimkonzentrationen (LOUWERS und KLEIN, 1994).

Bei dem vorliegenden Methodenvergleich des DSAP-Verfahrens und des Nasstupferversfahrens ist zu berücksichtigen, dass die Todesrate der *Serratia marcescens* Keime und die zufällige Verteilung der Keime im Nährmedium und somit auch auf den Oberflächen, die Ergebnisse beeinflussen. Es war nicht zu bestimmen, ob sich immer gleich viele Keime pro Versuchsdurchführung auf den Oberflächen befanden, und des Weiteren, ob und wie viele Keime durch den Eintrocknungsprozess abgestorben waren.

5.8 Festlegung der Nährmedien

Die Tupfer des Nasstupferversfahrens wurden nach der Probenentnahme auf CLED-Agar der Firma OXOID ausgestrichen. CLED-Agar gilt als diagnostischer Nährboden zur Kultivierung von Mikroorganismen aus dem Urin (OXOID-Handbuch, 1993). *Serratia marcescens* bildete auf dem Agar gut abgrenzbare Kolonien, die anschließend gut zu zählen waren.

Für das DSAP-Verfahren wurde im Labor LB-Agar hergestellt. Der Agar wurde in Flaschen autoklaviert und für die Probenentnahme in der Mikrowelle verflüssigt. Auch auf dem LB-Agar hatte *Serratia marcescens* eine gute Wachstumsrate und bildete gut abgrenzbare Kolonien.

Nach MÜLLER und HILDEBRANDT (1989) ist bei der Keimzahlbestimmung von Reinkulturen die Festlegung eines Nährbodens unproblematisch, da Beeinflussungen durch andere Keime nicht stattfinden. So wurde in dieser Arbeit lediglich auf eine gute Auswertung der Keime auf dem Agar geachtet.

In den Vorversuchen wurden die verschiedenen Keime in unterschiedlichen Medien gelöst. Ursprünglich wurde die Keimsuspension mit PBS-Lösung hergestellt. Allerdings konnten die Überlebensraten der Keime auf den Materialien durch Nährlösungen gesteigert werden. Für den Hauptversuch (Festlegung der Wiederfindungsraten, Effekt der Wasserreinigung, Effekt der Reinigung mit Schwamm und Reinigungsmittel und Effekt der Desinfektion) wurde *Serratia marcescens* in Glucose-Bouillon gelöst, um optimale Bedingungen für die Keime zu

schaffen. Glucose ist eine schnell verfügbare Energiequelle, die auch zur Anzucht geschwächter Keime genutzt wird.

5.9 Eignung der Baumaterialien bezüglich ihrer Reinigungs- und Desinfektionsfähigkeit

Im vorliegenden Versuch wurden Materialien getestet, die im Veterinär- und Quarantänebereich eingesetzt werden sollen, zum Beispiel Fliesen und Plastikwandverkleidungen.

Darüber hinaus wurde Relatex[®], ein besonderes Material für den Stallbereich, getestet.

Ein weiteres Material war Betonkantenstein, der mit der Glasur Prolapit[®] behandelt wurde, bzw. als Vergleich dazu Betonkantenstein ohne Glasur.

Außerdem wurde Kunstfelsen, ein Beton-Glasfasergemisch, das beim Umbau des Zoos vermehrt eingesetzt wurde, verwendet.

Weiterhin wurden relativ preisgünstige Materialien, wie zum Beispiel Spanplatten, Glas und Plexiglas auf ihre Reinigungs- und Desinfektionsfähigkeit überprüft.

Auf Grund der unterschiedlichen Oberflächenstrukturen lassen sich die Baumaterialien in drei Gruppen einteilen:

1. Materialien mit glatter und versiegelter Oberfläche:

Glas, Plexiglas, Kunststoffplatte, Wandfliese, Blech, Betoplan[®], Trespa Athlon[®], Betonkantenstein mit Prolapit[®] Versiegelung

2. Materialien mit unebener und versiegelter Oberfläche:

Bodenfliese, Relatex[®], Kunstfelsen

3. Materialien mit glatter und poröser Oberfläche:

Spanplatte, Betonkantenstein.

ACKEMANN et al. (1982) stellten fest, dass der Keimnachweis mit den drei Methoden der Oberflächenkeimzahlbestimmung Gelatine-Gießverfahren (siehe 2.1.1.2.5), Tupferabstrichverfahren und dem Thran-Gerät (siehe 2.1.1.4.2) von der Art der Oberfläche beeinflusst wurde.

Nach STOY (1983) ist die Keimreduktion nach Reinigung und Desinfektion umso höher, je glatter die Materialoberfläche ist.

Die Materialien mit glatter, versiegelter Oberfläche hatten Wiederfindungsraten von X_{\max} zwischen 100% und 60%. Plexiglas bildete eine Ausnahme. Die Wiederfindungsraten X_{\max} mit beiden Verfahren lagen bei diesem Material bei ca. 50%.

Bei den Materialien Betoplan[®], Blech und Plexiglas lagen die Wiederfindungsraten mit dem DSAP-Verfahren deutlich unter den Wiederfindungsraten des Nasstupferverfahrens.

Ursächlich kommt die schlechte Benetzbarkeit der Materialien in Frage (HANEKE, 1991). Die Keime verteilen sich nicht auf der gesamten Fläche von 16 cm² und Kolonien können somit auch aus Bakterienaggregaten entstanden sein (LOUWERS und KLEIN, 1994).

Nach der Wasserreinigung lagen die Wiederfindungsraten von *Serratia marcescens* Keimen auf den Materialoberflächen durchschnittlich bei unter zehn Kolonien. Nach der Warmwasserreinigung mit Reinigungsmittel und Schwamm wurden nur vereinzelt ein bis zwei Kolonien wieder gefunden. Nach der Desinfektion wurde *Serratia marcescens* fast vollständig von den Materialoberflächen entfernt. Nur von der Wandfliese und vom Trespa Athlon[®] konnte jeweils eine Kolonie angezüchtet werden.

Diese Materialien konnten auf Grund ihrer Oberflächenstruktur (glatt und versiegelt) gut gereinigt und desinfiziert werden.

FRANK und CHMIELEWSKI (1996) erzielten durch das Abwaschen der Oberfläche von glattem, rostfreiem Stahl mit steriler Pufferlösung die größte Keimreduktion. Durch die Aufrauung dieser Oberfläche wurden eine log-Stufe weniger Keime von der Pufferlösung entfernt.

Nach SCHLIESSER (1974, 1975) ergaben sich Schwierigkeiten bei der Reinigung und Desinfektion von glatten Oberflächen in vertikaler Stellung, da die auf die Oberflächen gebrachten Agenzien schnell abfließen und somit die Einwirkungszeiten verkürzt wurden.

Bei den Materialien mit unebener, versiegelter Oberfläche variierten die Wiederfindungsraten.

Die Wiederfindungsraten der Keime hingen vom Grad der Aufrauung ab. Während Bodenfliese und Relatex[®] hohe Wiederfindungsraten hatten, die mit denen der Materialien mit glatten und versiegelten Oberflächen vergleichbar waren, waren die Wiederfindungsraten auf Kunstfelsen niedriger und wiesen größere Schwankungen auf.

Je stärker das Oberflächenrelief ausgebildet war, desto schlechter ließen sich die Materialien reinigen. Das günstigste Verfahren zur Bestimmung der Oberflächenkeimzahl ist für diese Oberflächen das DSAP-Verfahren, da es den Keimnachweis aus den Tiefen der Furchen gewährleistet. Die Desinfektion dieser Oberflächen war problemlos und effektiv, da das Desinfektionsmittel, ebenso wie die Keimsuspension, in die Furchen eindringen konnte.

Bei den Materialien mit glatter, poröser Oberfläche konnten Flüssigkeiten direkt in das Innere des Materials einziehen. Somit konnten auf ihren Oberflächen wesentlich weniger Keime wieder gefunden werden, als bei den anderen Materialien.

Durch die Reinigung mit Wasser bzw. die mechanische Reinigung mit Reinigungsmittel wurden die Oberflächenkeime reduziert, aber möglicherweise befand sich ein größter Teil der Keime im Inneren des Materials.

Zur Überprüfung der Reinigung von Holz wurden bereits Versuche von anderen Autoren durchgeführt.

Nach RÖDEL et al. (1994) ist der Reinigungs- und Desinfektionseffekt auf Holz schwer einzuschätzen. Durch Feuchtigkeit quillt Holz auf und die Permeabilität des Materials wird noch weiter erhöht. Bei der Anwendung von nicht destruktiven Methoden zur Bestimmung des Oberflächenkeimgehaltes kann eine scheinbare Selbstreinigung vorgetäuscht werden.

Dieses Problem erkannte auch HANEKE (1991). Demnach lagerten sich Bakterien in gequollenem Holz in die Holzstrukturen ein und waren somit für Reinigung und Desinfektion unzugänglich. Nach Untersuchungen von STOY (1983) wurden auf Sperrholzplatten gute Reinigungs- und Desinfektionserfolge erzielt, die mit denen auf glatten Oberflächen übereinstimmten.

Der häufig erwähnte Selbstreinigungseffekt von Holz (keimhemmende Wirkung) konnte nach Untersuchungen von RÖDEL et al. (1994) lediglich bei Eichenholz festgestellt werden. Allerdings gehen die Autoren auch hier davon aus, dass sich die selbstreinigende Wirkung mit der Zeit verliert.

Betonkantenstein hat zwar keine quellende Eigenschaft, weist aber tiefe Poren auf. Auch hier können sich Keime der Reinigung und Desinfektion entziehen.

Nach Untersuchungen von BRILL (1997) hat Beton keinen negativen Einfluss auf die Wirksamkeit von Lysovet[®]PA, aber auf Grund der Struktur des Kantensteins ist die Effizienz einer Desinfektion nicht zu beurteilen.

Durch die Spezialimprägnierung mit Prolapit[®] wurde die Oberfläche des Kantensteins nachträglich versiegelt. Anschließend war die Oberfläche glatt. Beide Verfahren erzielten hohe Wiederfindungsraten von X_{\max} gleich 92% und 81% der *Serratia marcescens* Keime. Sowohl die Reinigung als auch die Desinfektion waren erfolgreich. Demnach können Oberflächen durch Prolapit[®] nachträglich erfolgreich versiegelt und die Reinigungs- und Desinfektionsfähigkeit von porösen Materialien verbessert werden.

Bei den verwendeten Materialien muss bedacht werden, dass es sich um neue Produkte handelte. Mit der Zeit ist auf den Materialien mit Gebrauchsspuren zu rechnen, die unterschiedlich stark ausgeprägt sein können und somit die Reinigungs- und Desinfektionsfähigkeit beeinflussen können.