Aus dem Institut für Technische Hygiene
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Anwendung verschiedener Untersuchungsmethoden zur Rückgewinnung von *Pseudomonas aeruginosa* bei der Standardisierung einer Prüfmethode zur Aufbereitung von flexiblen Endoskopen nach DIN ISO/TS 15883-5

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von
Matthias Georg Kumor
aus Kattowitz

Datum der Promotion: 25.10.2013

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung **7**

1.1 Aufbereitung . . . 9

1.1.1 Reinigung . . . 10

1.1.2 Desinfektion . . . 11

1.1.2.1 Manuelle Desinfektion . . . 12

1.1.2.2 Teilmaschinelle Desinfektion . . . 12

1.1.2.3 Maschinelle Desinfektion . . . 12

1.1.3 Sterilisation . . . 13

1.1.4 Reinigungs- und Desinfektionsmittellösungen . . . 13

1.1.5 Anforderung an die Aufbereitung . . . 14

1.2 Aufbau von flexiblen Endoskopen . . . 15

1.3 Mit endoskopischen Eingriffen assoziierte Infektionserreger . . . 17

1.3.1 Bakterien . . . 18

1.3.1.1 *Pseudomonas spp.* . . . 18

1.3.1.2 *Salmonella spp.* . . . 22

1.3.1.3 *Serratia spp.* . . . 22

1.3.1.4 *Helicobacter spp.* . . . 23

1.3.1.5 *Mycobacterium spp.* . . . 23

1.3.1.6 *Legionella pneumophila* . . . 24

1.3.2 Viren . . . 24

1.3.3 Pilze . . . 26

1.3.4 Prionen . . . 26

1.4 Zusammenfassung . . . 27

1.5 Zielstellung der Arbeit . . . 28

2 Materialien und Methoden **31**

2.1 Materialien . . . 31

2.1.1 Blut . . . 31

2.1.2 Testorganismus 32
2.1.3 Caseinpepton-Sojamehlpepton-Bouillon 32
2.1.4 Bakterienbouillon 32
2.1.5 Blut-Bakteriensuspension 32
2.1.6 Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agar 32
2.1.7 Bakteriensuspension 33
2.1.8 Prüfkörper 33
2.1.9 Spüllösungen 33
2.1.10 Geräte 34
2.2 Methoden 35
2.2.1 Herstellung der Bakterienbouillon 35
2.2.2 Herstellung der Bakteriensuspension 36
2.2.3 Herstellung der Blut-Bakteriensuspension 37
2.2.4 Herstellung der Testanschmutzung 37
2.2.5 Anschmutzung der Prüfkörper 37
2.2.6 Probengewinnung 37
2.2.7 Versuchsreihen 38
2.2.7.1 Wirksamkeit von Ultraschall im Reagenzglas 39
2.2.7.2 Überlebensverhalten von *P. aeruginosa* im Ultraschallbad 39
2.2.8 Durchführung der Versuchsreihen 39
2.2.9 Verdünnungsreihen 41
2.2.10 Ergebnisgewinnung 42

3 Versuchszusammenfassung und -auswertung 43
3.1 Unterschiedliche Spüllösungen 43
3.2 Unterschiedliche Spültechniken 43
3.3 Überlebensverhalten von *P. aeruginosa* im Ultraschallbad 43
3.4 Spülung nach Ultraschallbehandlung 44
3.5 Weitere Auswertung 44

4 Ergebnisse 45
4.1 Spülung mit unterschiedlichen Lösungen 45
4.2 Spülung mit unterschiedlichen Techniken 47
4.3 Überlebensverhalten von *P. aeruginosa* im Ultraschallbad 51
4.4 Spülung nach Einsatz der Ultraschallbehandlung 53

5 Diskussion **57**
5.1 Bewertung der Methode 58
5.1.1 Reproduzierbarkeit 58
5.1.2 Testanschmutzung 59
5.1.2.1 Bemerkung zur Entwicklung einer Testanschmutzung . . 59
5.1.3 Testorganismus 61
5.1.3.1 Biofilmbildung 61
5.1.4 Prüfkörper 61
5.1.4.1 Anforderung an die Aufbereitung 63
5.2 Diskussion der Ergebnisse 63
5.2.1 Der Einsatz verschiedener Spüllösungen 64
5.2.2 Der Einsatz verschiedener Spültechniken 64
5.2.3 Überlebensverhalten von *P. aeruginosa* 66
5.2.4 Der Einsatz von Ultraschall 66
5.3 Zusammenfassung der Schlussfolgerungen aus den Versuchsreihen 67

6 Zusammenfassung **69**

Abbildungsverzeichnis **71**

Tabellenverzeichnis **73**

Literaturverzeichnis **75**

7 Danksagungen **81**

8 Lebenslauf **83**

9 Eidesstattliche Versicherung **85**

1 Einleitung

Der Einsatz von flexiblen Endoskopen in Diagnostik und Therapie von Erkrankungen des oberen und unteren Gastrointestinlaltraktes, des Respirationstraktes sowie in der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde und auch Urologie nimmt immer mehr zu. Durch die Endoskopie und damit verbundener minimal invasiver Behandlungsmöglichkeit sollen Operationsrisiken, wie Wundinfektion und Wundheilungsstörungen, vermieden werden. Auch die Krankenhausverweildauer kann durch minimal invasiv durchgeführte Eingriffe verkürzt und somit Kosten gesenkt werden. Der Einsatz von teils toxischen Medikamenten für die Behandlung der Komplikationen kann verhindert werden. Aufgrund des Einsatzgebietes der Endoskope scheint es mehr als logisch, dass es zu Übertragungen von Infektionserregern von Patient zu Patient und von Patient zu Personal sowie von Personal zu Patient kommen kann [46, 57]. Die Berichte über Infektionen, assoziiert mit endoskopischen Eingriffen, haben unter anderem dazu beigetragen, dass die Blutspende in Deutschland erst vier Monate nach erfolgtem endoskopischen Eingriff durchgeführt werden darf [61, 65]. Dabei dürfte das diagnostische Fenster beim Nachweis viraler Infektionen (Hepatitis B und C, HIV) eine Schlüsselrolle gespielt haben. Jedoch auch Erkrankungen, die durch Bakterien und Pilze hervorgerufen werden, spielen eine große Rolle, wenn man ein Augenmerk auf die Aufbereitung flexibler Endoskope richtet.
Die Aufbereitung flexibler Endoskope (siehe 1.1) ist aufgrund ihrer komplexen Bauart (siehe 1.2) mit den Jahren der Weiterentwicklung immer komplexer und auch teilweise schwieriger geworden. Gerade die Entwicklung und der Einsatz von komplexen, in das Endoskop eingebauten elektronischen Bauteilen, die Möglichkeit, therapeutisch über Arbeitskanäle tätig zu sein, schaffte Aufbereitungsprobleme. Die Vielzahl von Ventilen und Bowdenzugkanälen zur Steuerung der Flexibilität ermöglichte viele Defektquellen. In der Vergangenheit beschäftigen sich Arbeitskreise mit dem Thema der validierbaren Aufbereitung von Endoskopen. Dabei konnten Grundsätze zur Reinigung und Desinfektion aufgestellt werden. Erfreulicherweise gehörten zu diesem Arbeitskreis nicht nur die Hersteller von Endoskopen an, sondern auch ärztliches und pflegerisches Personal als Anwender, Hersteller von Aufbereitungsgerätschaften, Hersteller von Reinigungs-

und Desinfektionspräparaten und Krankenhaushygieniker an. Abschließend konnten 2 Stellungnahmen u.a. in der Fachzeitschrift *Hygiene und Medizin* [27, 28] publiziert werden. Zusätzlich wurde im Rahmen der Tätigkeit des Arbeitskreises ein Hygieneplan und Anforderungen für die Aufbereitung an Reinigungs- und Desinfektionsmittel für die maschinelle Dekontamination von flexiblen Endoskopen erarbeitet. Leider kam dieser Arbeitskreis zu keiner abschließenden Stellungnahme hinsichtlich einer Typprüfung und periodischen Prüfung der Aufbereitung. Im weiteren Verlauf griff die Projektgruppe "flexible Endoskope" der Deutschen Gesellschaft für Krankenhaushygiene (DGKH) die Thematiken und Probleme auf, auf dessen Grundlage eine grosse Arbeitsgruppe 1994 eine Arbeit zur "Prüfung und Bewertung der Reinigungs- und Desinfektionswirkung von Endoskop-Dekontaminationsautomaten sowie -Desinfektionsautomaten" [29] veröffentlichte. Letztendlich wurde zur Prüfung und Bewertung der Reinigungs- und Desinfektionswirkung eine Reduktion von 5 $\log_{10}$-Stufen für Bakterien, 4 $\log_{10}$-Stufen für Viren sowie 3,5 $\log_{10}$-Stufen für Sporen gefordert. Aufgrund der damaligen Daten- und Forschungslage gab es keine Daten zur Bioburden-Belastung in flexiblen Endoskopen. Erst 2001 wurde vom Vorstand der DGKH (Präsident A. Kramer) eine Modifikation zur Prüfung und Bewertung angeregt, bei der eine Reduktion von mindestens 9 $\log_{10}$-Stufen zu erreichen ist [33]. Diese Reduktion ist auch heute noch der Standard.
Zusätzlich ist nach Medizin-Produkte-Gesetz (MPG)[44] und Medizinprodukte-Betreiber-Verordnung (MPBetreibV)[43] der gesamte Prozess der Aufbereitung so mit validierten Verfahren durchzuführen, dass der Erfolg des Verfahrens gewährleistet und dokumentiert nachvollziehbar ist. Validierte und standardisierte Verfahren zur Prüfung der Aufbereitung flexibler Endoskope standen lange Zeit nicht zur Verfügung, waren nur teilweise anwendbar oder überprüften lediglich Teilschritte der Aufbereitung. Erst die Ausarbeitung und Veröffentlichung des Entwurfes der DIN ISO/TS 15883-5[30] 2005 legt Testmethoden für die Validierung der Aufbereitung flexibler Endoskope fest, wobei schon viel früher der Ruf nach validierten Aufbereitungsmethoden und speziell geschultem Personal zu hören war [14].
Bislang existieren bei der Validierung der Aufbereitung flexibler Endoskope für verschiedene Länder Testanschmutzungen verschiedener Zusammensetzungen und Nachweismethoden [30]:

1. Österreich: Nigrosin, Hühnerei, Weizenmehl und *Enterococcus faecium*
2. Deutschland: Blut, *Enterococcus faecium*
3. Deutschland: Tetramethylbenzidin, Wasserstoffperoxidlösung, Rinderhämoglobin

4. Frankreich: Biofilm gebildet durch *Pseudomonas aeruginosa*
5. Niederlande: Rinderserumalbumin, Schweinemucin, Rinderthrombin, Rinderfibrinogen
6. England: Glycerin, dehydriertes Schweinemucin, Pferdeserum, ungebleichtes reines Mehl, wässrige Safraninlösung, Wasser
7. USA: Prüfanschmutzung auf organischer oder Proteinbasis (nach Belieben), *Bacillus atrophaeus*-Sporen

Die oben zitierte Vielzahl der unterschiedlichen Bestandteile von Testanschmutzungen lässt bisher kein einheitliches Vorgehen für die Validierung zu; Ziel ist es jedoch, genau dies zu erreichen.

In der DIN ISO/TS 15883-5 werden, neben vielen anderen Methoden, in Anhang I in der von Deutschland eingebrachten Methode ein standardisiertes Testbakterium (*Enterococcus faecium*), eine standardisierte Testanschmutzung sowie Testkörper beschrieben. Die Methoden, wie die Aufbereitungsverfahren durchzuführen sind, sind ebenfalls standardisiert und beschrieben.

2011 konnte, unter Berücksichtigung von MPG, MPBetreibV sowie der DIN EN ISO 15883 eine abschließende Leitlinie zur Validierung maschineller Reinigungs-Desinfektionsprozesse zur Aufbereitung thermolabiler Endoskope [18] veröffentlicht werden. Wie auch schon in vergangenen Arbeitskreisen waren zur Erstellung dieser Leitlinie Vertreter der Hygiene-Fachgesellschaften, des Anwenderpersonals, der Hersteller von Reinigungs- und Desinfektionsgeräten und Vertreter der Endoskophersteller beteiligt. 2011 hat Wehrl die Methode zur Überprüfung der Reinigungsleistung von Reinigungs-Desinfektionsgeräten für flexible Endoskope um eine quantitative Proteinbestimmung erweitert [62] und abschließend nach Auswertung der Ringversuche in Anlage 9 der Leitlinie die Methode zur Überprüfung der Gesamtprozessleistung von Reinigungs- Desinfektionsgeräten für flexible Endoskope beschrieben [31].

1.1 Aufbereitung

Die Aufbereitung von flexiblen, fiberoptischen Gastroskopen stellt seit ihrer Entwicklung in den 50er Jahren hohe Ansprüche bzw. Probleme für die Anwender und Hersteller dar. Die Einführung sowie Weiterentwicklung in den 60er Jahren zu Kolonoskopen und Bronchoskopen [5] machte den Aspekt der Aufbereitung bis heute nicht einfacher. Beispiels-

weise kann der Aufbereitungsprozess mit Desinfektion und ggf. Sterilisation fehlschlagen, falls die Reinigung, gerade auch die Vorreinigung unmittelbar nach dem Eingriff, nicht ordnungsgemäß erfolgt [49, 14].
2002 hat das Robert Koch-Institut (RKI) eine Empfehlung bezüglich der Anforderungen an die Hygiene bei der Aufbereitung flexibler Endoskope und endoskopischem Zusatzinstrumentarium veröffentlicht [52]. Hierin wird der maschinellen Aufbereitung der Vorzug gegeben, da bei der manuellen Aufbereitung verschiedene Faktoren eine Rolle spielen, die einen entscheidenden Nachteil bieten. Angefangen vom Versagen der Aufbereitung an sich bis hin zur Gefährdung des Personals. Die maschinelle Aufbereitung ist standardisiert, die Dokumentation der einzelnen Aufbereitungsschritte ist automatisiert. Grundsätzlich kann aber die Aufbereitung auch manuell erfolgen. Nun liegen in Anlage 8 der Anforderungen an die Hygiene bei der Aufbereitung von Medizinprodukten in der Empfehlung der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) beim Robert-Koch-Institut und des Bundesinstitutes für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM), die Anforderung an die Hygiene bei der Aufbereitung flexibler Endoskope und endoskopischen Zusatzinstrumentariums vor [53].
Die Aufbereitung flexibler Endoskope gliedert sich mit Reinigung, Desinfektion und ggf. Sterilisation in insgesamt drei Hauptschritte (siehe Abb.1.1).

1.1.1 Reinigung

Die Vorreinigung von flexiblen Endoskopen beginnt unmittelbar nach dem Eingriff am Patienten. Ziel ist es, grobe Verschmutzungen wie Schleim, Blut und Gewebereste sowie Infektionserreger zu entfernen. Das Endoskop bleibt noch an der Lichtquelle und am Absauger sowie am Spülsystem angeschlossen. Dabei wird der Einführschlauch mit einem Einwegtuch abgewischt, anschließend wird das distale Ende in ein Gefäß mit Reinigungsmittellösung eingetaucht und abwechselnd mit Reinigungsmittellösung und Luft gespült; die Durchgängigkeit der Kanäle wird dabei ebenfalls überprüft und sichergestellt. Abschließend werden die Kanäle mit Luft leer geblasen. Erst jetzt wird das Endoskop von der Lichtquelle, dem Absaug- und dem Spülsystem getrennt. Die Belastung mit biologischem Material kann je nach Eingriff und Eingriff-Umfang sehr hoch sein, damit auch die Belastung mit Mikroorganismen. Berichtet wird über eine Bakterienbelastung von 10^{10} KBE/ml [38]. Die Vorreinigung ist der wichtigste Schritt in der Aufbereitung und entfernt neben den möglichen Protein- und Gewebsverunreinigungen einen Großteil der Bakterien. Er sollte gründlich vor jeder Reinigung, Desinfektion und Sterilisation erfol-

gen [35].
Nach der Vorreinigung wird das Endoskop, möglichst in einer dafür vorgesehenen, geschlossenen Wanne, in den Aufbereitungsraum verbracht. Der nun folgende Dichtheitstest findet erneut in einer Reinigungsmittellösung statt und sollte nach Herstellerangaben erfolgen. Fällt der Test positiv aus, d.h., dass eine Undichtheit oder Perforation nachgewiesen ist, so ist der Aufbereitungsschritt abzubrechen, das Endoskop ist mit Instrumentendesinfektionsmittel abzuwischen und in einer Schutzfolie in einem Versandkoffer zum Hersteller zu versenden. Ist die Dichtheit nachgewiesen, so kann mit den weiteren Aufbereitungsschritten fortgefahren werden. Das Endoskop wird vollständig in eine Reinigungsmittellösung blasenfrei eingelegt. Die nun folgenden Reinigungsschritte sollen unterhalb der Flüssigkeitsoberfläche erfolgen, um Kontaminationen und/oder Gesundheitsschäden durch verspritzte Reinigungsmittellösung zu verhindern und umfassen:

- Abwischen den Außenmantels mittels flusenfreiem Einwegtuch
- Reinigung der Kanal- und Ventilöffnungen sowie Steuerungsteile, Adapter und Distalende mittels geeigneter Bürsten
- Reinigung aller zugänglichen Kanalsysteme mit geeigneten, desinfizierten, flexiblen Bürsten
- Reinigung aller Ventile mit geeigneten, desinfizierten Bürsten
- Durchspülen aller Kanalsysteme mit Reinigungsmittellösung
- Reinigung der Bürsten

Keinesfalls sollte eine Vordesinfektion stattfinden, da es dabei zu einer Strukturveränderung der Proteinrückstände kommen, aus der wiederum ein gesteigertes Anhaftungsverhalten an Oberflächen resultieren kann [47].

1.1.2 Desinfektion

Nach erfolgter manueller Reinigung wird das Endoskop samt Zubehör und Bürsten in eine Wanne mit Leitungswasser gelegt und die Kanäle werden durchgespült. Dabei sollen Schmutz- und Reinigungsmittelreste entfernt werden. Anschließend wird das in den Kanälen verbliebene Wasser mit Druckluft entfernt. Grundsätzlich gibt es nun drei verschiedene Arten, ein Endoskop weiter aufzubereiten:

1. weiter manuell

2. teilmaschinell in einem Desinfektionsgerät
3. maschinell im Reinigungs- und Desinfektionsgerät (chemisch oder chemothermisch)

1.1.2.1 Manuelle Desinfektion

Bei der weiteren manuellen Aufbereitung werden das gereinigte Endoskop und die Zubehörteile samt Bürsten in Desinfektionsmittellösung eingelegt und sämtliche Kanäle mit Adaptern und Spülansätzen mit Desinfektionsmittellösung befüllt. Dabei ist darauf zu achten, dass auch dieser Vorgang luftblasenfrei erfolgt. Die Spüladapter und -ansätze werden demontiert. Je nach Herstellerangaben des Desinfektionsmittels variiert die Einwirkdauer sowie die Konzentration. Nach dem Desinfektionsschritt wird das Endoskop nach vorherigem Freiblasen der Kanäle mit Druckluft in eine Wanne mit mikrobiologisch einwandfreiem Wasser gelegt und sämtliche Zubehörteile sowie das Endoskop selbst gespült. Nach der Schlussspülung werden die Kanäle sorgfältig mit Druckluft trocken geblasen. Der Außenmantel wird mit einem keimarmen, sauberen Einwegtuch getrocknet. Elektrische Kontakte und Kanalsysteme müssen ggf. manuell nachgetrocknet werden. Anschließend findet eine Funktionsprüfung statt, nach der es für die nächste Untersuchung eingesetzt oder in geeigneten Schränken gelagert werden kann.

1.1.2.2 Teilmaschinelle Desinfektion

Bei der teilmaschinellen Aufbereitung wird nach der manuellen Reinigung das Endoskop gespült und in das Desinfektionsgerät eingelegt; dabei werden die Kanäle bzw. Ventile an Spül- und Saugpumpen angeschlossen. Nach diesem Desinfektionsschritt wird erneut manuell gearbeitet (Schlussspülung und Trocknung), wobei das Endoskop und die Zubehörteile wie bei der manuellen Aufbereitung weiterverarbeitet werden. Elektrische Kontakte und Kanalsysteme müssen ggf. manuell nachgetrocknet werden. Abschließend findet auch hier eine Funktionsprüfung statt, nach der es für die nächste Untersuchung eingesetzt oder in geeigneten Schränken gelagert werden kann.

1.1.2.3 Maschinelle Desinfektion

Vor der maschinellen Aufbereitung werden die zuvor beschriebenen Schritte der manuellen Vorreinigung, des Dichtheitstestes und der manuellen Reinigung ebenfalls durchgeführt (siehe 1.1.1). Ist dies erfolgt, wird das Endoskop, einschließlich der Zubehörteile, in

das Reinigungs- und Desinfektionsgerät verbracht. Dabei sind die Zubehörteile in spezielle Körbe einzulegen. Nach der Wahl des richtigen Aufbereitungsprogramms wird das Reinigungs- und Desinfektionsgerät gestartet; dabei werden die Teilschritte der eventuellen Vorspülung, Reinigung, Zwischenspülung, der Desinfektion sowie Schlussspülung und Trocknung automatisch protokolliert. Nach Beenden des Programms muss anhand des Protokolls überprüft werden, ob alle Reinigungs- und Desinfektionsschritte ordnungsgemäß durchlaufen worden sind; erst dann sollten das Endoskop und die Zubehörteile mit desinfizierten Händen oder mit Einmalhandschuhen entnommen werden. Elektrische Kontakte und Kanalsysteme müssen ggf. manuell nachgetrocknet werden. Hiernach muss das Endoskop vor dem nächsten Einsatz am Patienten, oder vor der Lagerung in dafür geeigneten Schränken (z.B. spezielle Endoskopschränke) einer Funktionsprüfung unterzogen werden.

1.1.3 Sterilisation

Eine Dampfsterilisation von flexiblen Endoskopen ist aufgrund ihrer Bauart und Materialzusammensetzung in der Regel nicht möglich. Eine Niedertemperatursterilisation mit Ethylendioxid und Formaldehyd sowie die Plasmasterilisation sind durchführbar, soweit dies erforderlich ist.

1.1.4 Reinigungs- und Desinfektionsmittellösungen

Prinzipiell wird bei Reinigungsmittellösungen zur Aufbereitung zwischen enzymhaltigen und enzymfreien sowie alkalischen und neutralen Reinigern unterschieden. Sehr gute Reinigungswirkungen besitzen alkalische Reiniger [21], sie sind jedoch nicht für Medizinprodukte wie flexible Endoskope geeignet.
Die Desinfektion wird überwiegend mittels Glutaraldehyd haltigen Desinfektionsmittellösungen oder Peressigsäure durchgeführt. Beide Wirkstoffe können Anhaftungen von Geweberesten und Schleim sowie Belastungen mit anderem biologischen Material und Bakterien fixieren. So kommt es bei mangelhafter bzw. falscher Reinigung zu einer unzureichenden Aufbereitung insgesamt. Daher ist die adäquate Reinigung unmittelbar nach dem Eingriff unbedingt notwendig. Sind die o.g. Anhaftungen bereits fixiert, sind sie kaum mehr zu lösen [32].

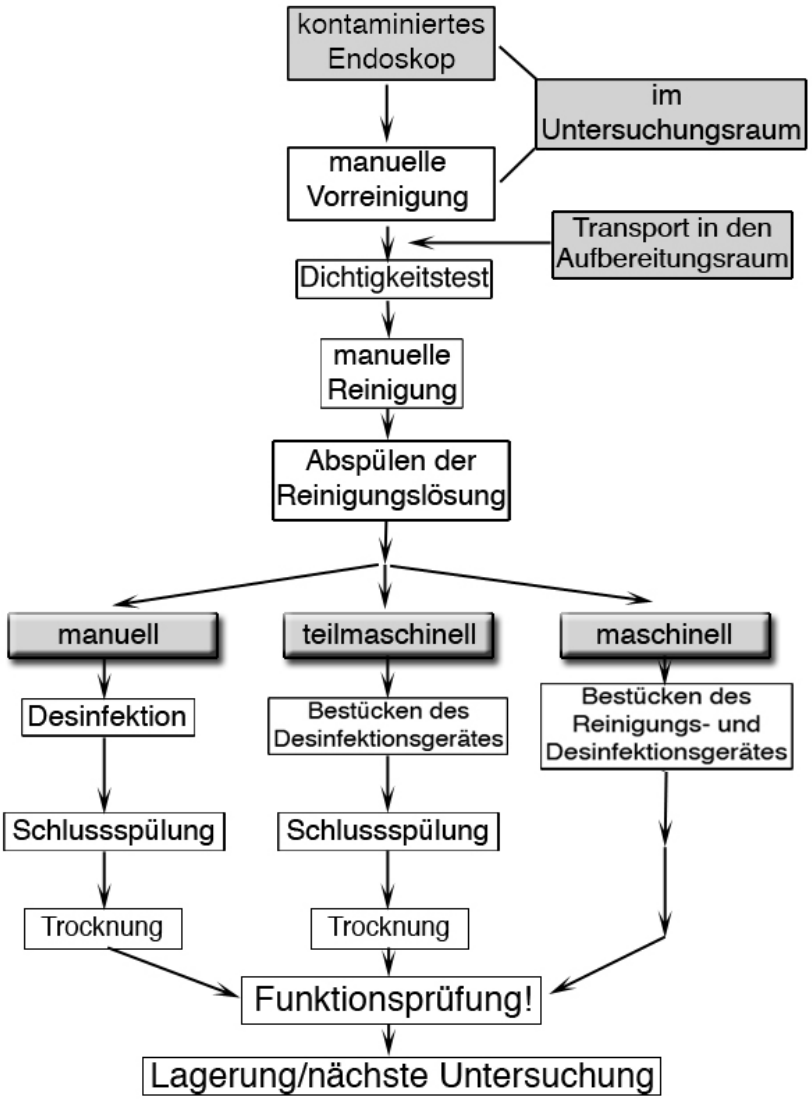

Abbildung 1.1: Schema der Aufbereitung flexibler Endoskope (siehe 1.1) nach der Empfehlung des RKI.

1.1.5 Anforderung an die Aufbereitung

1998 wurden von Wischnewski et al. [63] 1149 Duodenoskope vor dem Einsatz am Patienten untersucht und die Patienten hinsichtlich infektiöser Komplikationen wie Cholangitis, Peritonitis, Pankreatitis, Sepsis und Fieber nachbeobachtet. Dabei waren 49,4% der Duodenoskope kontaminiert. Im Zuge dieser prospektiven Studie wurden Empfehlungen zur manuellen und maschinellen Aufbereitung von Duodenoskopen formuliert. Diese Empfehlungen finden sich in der Empfehlung des Robert Koch-Institutes (RKI)

[52]. Die Empfehlung des Robert Koch-Institutes fordert hinsichtlich der Aufbereitungsqualität nach Spülung mit steriler Flüssigkeit eine Koloniezahl von $\leq$1 koloniebildende Einheit (KBE) pro 20 ml Spülflüssigkeit [52]. Dabei dürfen Bakterien wie *Pseudomonas spp.*, *Escherichia coli*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus spp.* und *Staphylococcus aureus* in 20 ml Spülflüssigkeit grundsätzlich nicht nachweisbar sein [52]. Die 2002 veröffentlichte Empfehlung wurde 2012 durch die neuen Anforderungen an die Hygiene bei der Aufbereitung von Medizinprodukten und Empfehlung der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) beim Robert-Koch-Institut (RKI) und des Bundesinstitutes für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) ersetzt [53].
Die DIN EN ISO 15883-4 behandelt Bauart-Anforderungen an Reinigungs- und Desinfektionsgeräte, wobei gemäß DIN ISO/TS 15883-5 [30] eben diese Anforderungen mit standardisierten Materialien und Methoden überprüft werden können.

1.2 Aufbau von flexiblen Endoskopen

Endoskope sind Instrumente, die sich aufgrund ihrer Bauart dazu eignen, Diagnostik und Therapie in Hohlorganen in einem einzigen Eingriff durchzuführen. Der Aufbau flexibler Endoskope hat sich im Laufe ihrer Entwicklung in seiner Grundform nicht verändert. Sie sind jedoch je nach Einsatzgebiet (Respirationstrakt, oberer Gastrointestinaltrakt, unterer Gastrointestinaltrakt) unterschiedlich in ihrer Komplexität und in ihrem Ausmaß der baulichen Ausführung. Hauptbestandteile des Endoskopes sind (Abb.1.2, Abb.1.3):

- Versorgungsstecker (Abb.1.4)
  - enthält Anschlüsse für Monitor, Lichtquelle, Absaugung sowie Luft- und Wasserzufuhr
- Versorgungsschlauch (Abb.1.2)
  - enthält das Lichtleiterkabel, den Zu- und Ablauf für Wasser und Luft
- Kontrollkörper (Abb.1.5)
  - enthält Ventil-Taster für Spülung, Saugung, Spülöffnung, Öffnung des Arbeitskanals, Abwinkelungshebel, Fernbedienungstaster
- Einführschlauch (Abb.1.2, Abb.1.7))

  - enthält Lichtleiter, Arbeitskanal, Luft- und Wasserkanal, Bildübertragungselektronik, Bowdenzüge, grobes und feines Metallgeflecht

- distales Ende (Abb.1.6, Abb.1.7)
  - enthält Lichtleiterende, Objektiv, Luft- und Wasserdüse sowie die distale Öffnung des Arbeitskanals

In sich ist jeder der oben genannten Bestandteile hoch komplex aufgebaut. Voraussetzung für die Arbeit in Hohlorganen aber ist einerseits, dass das Endoskop flexibel ist, um beispielsweise an einen bestimmten Teil eines Organs zu gelangen, welcher aufgrund der Lage im menschlichen Körper mit einem starren Endoskop nicht zu erreichen ist. Andererseits muss eine ausreichende Länge des Einführschlauches vorhanden sein; die Längen des Einführschlauches variieren je nach Einsatzgebiet und Hersteller zwischen 300 mm und 1,9 m. Die Flexibilität allein würde aber nicht ausreichen, sie muss steuerbar sein, d.h., dass eine Feinmechanik integriert sein muss, die es erlaubt, das distale Ende so abzuwinkeln, dass beim Vorschieben in eine Körperhöhle die Anatomie verfolgt werden kann (Bsp. Mund-Speiseröhre-Magen-Zwölffingerdarm). Weiterhin muss sowohl eine Lichtquelle als auch eine Optik vorhanden sein. Die Lichtquelle der flexiblen Endoskope liegt extern, d.h., dass das extern erzeugte Licht über ein Lichtleiterkabel über den Versorgungsstecker bis zum distalen Ende des Endoskops gelangt. Die Optik hingegen befindet sich direkt am distalen Ende und liefert über ein Objektiv das Farbbild zum Monitor. Da es sich bei Endoskopen um Diagnose- und Therapieinstrumente handelt, verfügen sie über einen Arbeitskanal, über den Arbeitsinstrumente, zum Beispiel Zangen und Schlingen, eingeführt werden können. Ist die Sicht durch Körperflüssigkeiten eingeschränkt oder völlig verlegt oder die Optik verschmutzt, so ist die Wasserspülung und die anschließende Trocknung über entsprechende, separate Düsen am distalen Ende des Endoskops möglich. Die Abbildung 1.6 zeigt den Aufbau und die Anordnung der Komponenten des distalen Endes. Abbildung 1.7 zeigt den detailierten Aufbau des Einführschlauches und des distalen Endes. Je nach Einsatzgebiet und Hersteller liegen die Innendurchmesser der Arbeitskanäle zwischen 0,75 mm und 4,8 mm.

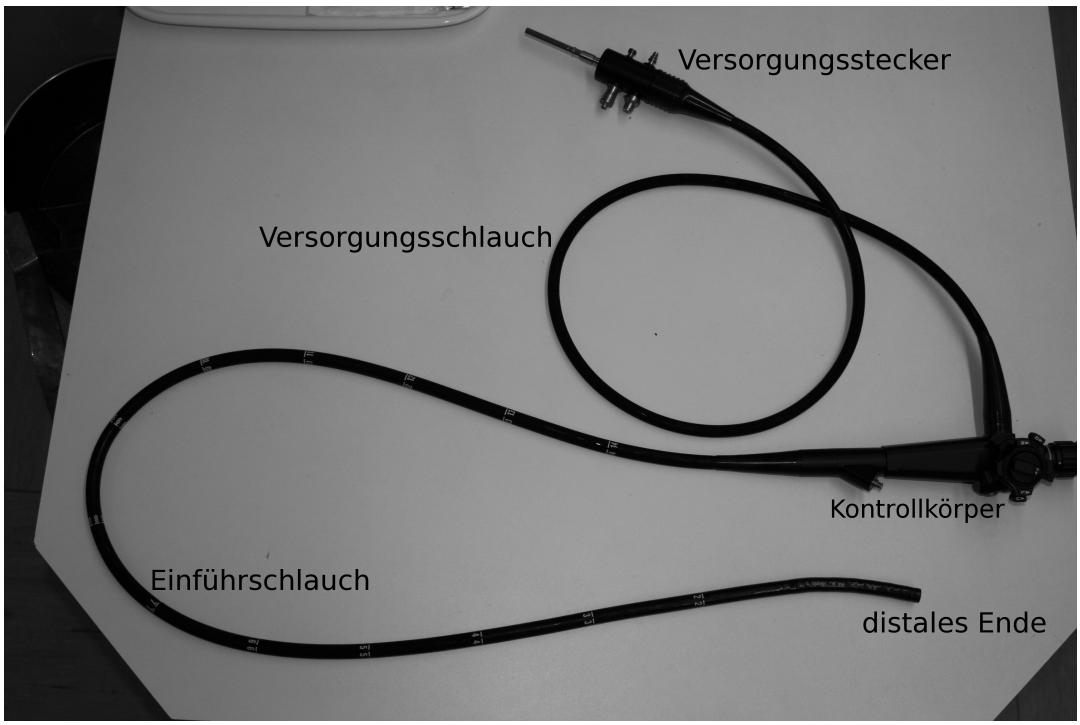

Abbildung 1.2: Aufbau eines flexiblen Endoskopes (Duodenoskop) mit Darstellung von Versorgungsstecker, -schlauch, Kontrollkörper, Einführschlauch und distalem Ende (mit freundlicher Genehmigung der PENTAX Europe GmbH, Hamburg, Deutschland).

1.3 Mit endoskopischen Eingriffen assoziierte Infektionserreger

Infektionserreger, die mit einem endoskopischen Eingriff assoziiert sind, können zwei Übertragungswege haben. Einerseits kann die Infektion endogen erfolgen, d.h., dass körpereigene Krankheitserreger in die Blutbahn geraten, weil die Barriere zwischen Blut und kontaminierten oder besiedelten Bereichen, beispielsweise durch eine Biopsiezange, verletzt worden ist. Andererseits spricht man von exogen ausgelösten Infektionen, wenn Krankheitserreger von außen in den Körper eingebracht werden. Die vorwiegende Anzahl der Endoskopie-assoziierten Infektionen läßt sich auf eine exogene Ursache zurückführen und hat ihren Ursprung in inadäquat aufbereiteten Endoskopen.

Zühlsdorf beschreibt in ihrer Inaugural-Dissertation [65] nach Auswertung der Literatur, dass die Mehrzahl der endoskopie-assoziierten Infektionen auf gramnegative Bakterien

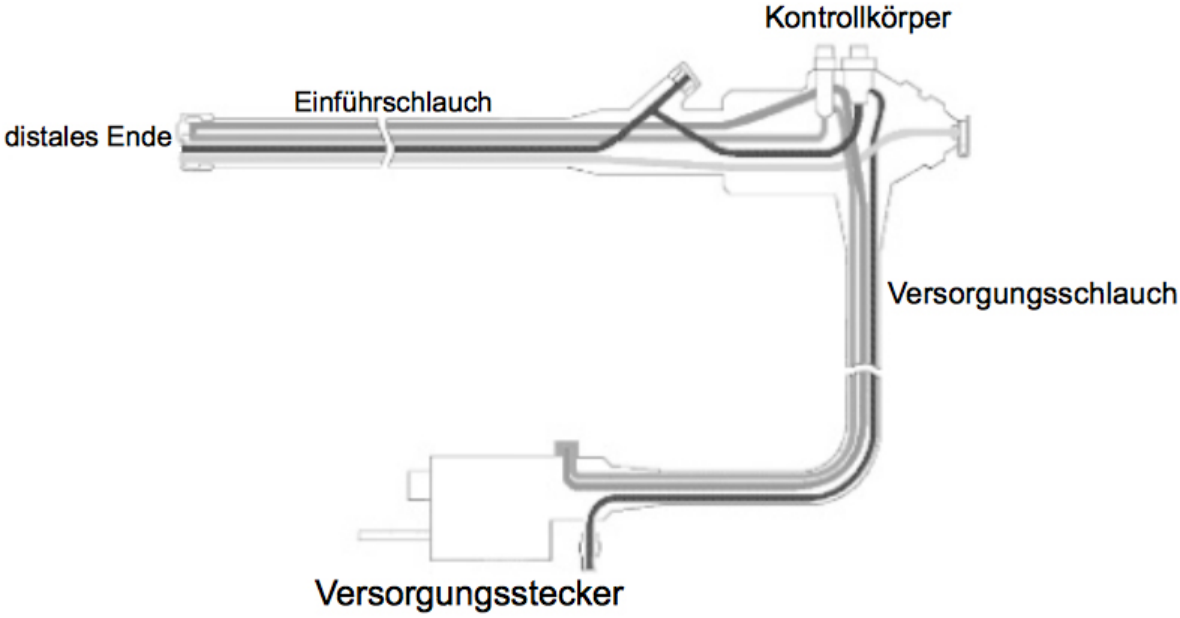

Abbildung 1.3: Schematischer Aufbau eines flexiblen Endoskopes mit Darstellung von Versorgungsstecker, -schlauch, Kontrollkörper, Einführschlauch und distalem Ende sowie innenliegenden Luft- und Wasserkanälen (mit freundlicher Genehmigung der PENTAX Europe GmbH, Hamburg, Deutschland).

und auf Mykobakterien zurückzuführen ist. Im Folgenden werden die Hauptvertreter dieser Erreger dargestellt. Dabei erfolgte die Auswertung von 34 Literaturstellen.

1.3.1 Bakterien

Die im folgenden Abschnitt beschriebenen Bakterien haben verschiedene Charakteristika, wie die Rolle als Krankheitserreger für den Menschen, Virulenzfaktoren sowie Spezielles hinsichtlich der Abwehrmechanismen [39].

1.3.1.1 *Pseudomonas spp.*

Pseudomonaden sind gramnegative Stäbchenbakterien, die für den Menschen opportunistische Krankheitserreger darstellen können. Sie sind typische Vertreter der Nasskeime

Abbildung 1.4: Aufbau des Versorgungssteckers eines flexiblen Endoskopes mit Darstellung von Lichtleiterstecker, Anschlüssen für Absaugung, Luft- und Wasserzufuhr (mit freundlicher Genehmigung der PENTAX Europe GmbH, Hamburg, Deutschland).

Abbildung 1.5: Aufbau des Kontrollkörpers eines flexiblen Endoskopes mit Darstellung der Öffnung des Arbeitskanals, Abwinkelunshebel/Fernbedienungstasten sowie Ventilöffnungen (mit freundlicher Genehmigung der PENTAX Europe GmbH, Hamburg, Deutschland).

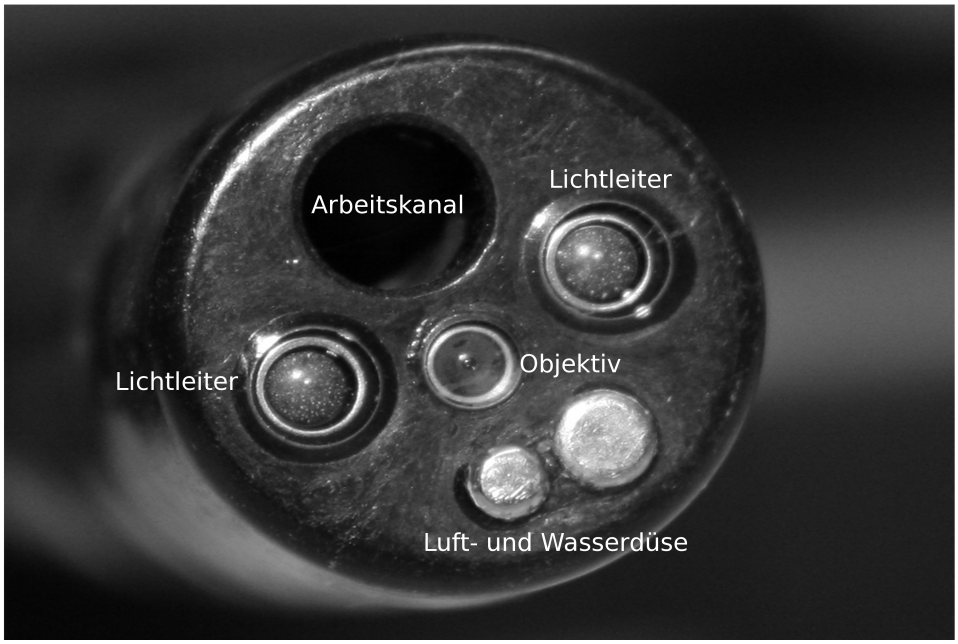

Abbildung 1.6: Aufbau des distalen Endes eines flexiblen Endoskopes mit Darstellung von Lichtleiter, Arbeitskanal (Biopsiekanal), Objektiv sowie Luft- und Wasserdüse; Aufsicht (mit freundlicher Genehmigung der PENTAX Europe GmbH, Hamburg, Deutschland).

mit Reservoir in Wasserleitungen, Klimaanlagen, Pfützen, Flüssigkeitsaufbewahrungsbehältern und Beatmungsgeräten. *Pseudomonas (P.) spp.* sind mit verschiedenen Virulenzfaktoren ausgestattet. Neben den Fimbrien, die die Adhärenz vermitteln, sind diese Bakterien zur Bildung eines Mannuron-Guluronsäure-Polymers, besser bekannt als Alginat, fähig. Dieses Alginat schützt Pseudomonaden als Schleim oder Biofilm sowohl vor der Phagozytose als auch vor dem Angriff durch Desinfektionsmittellösungen.

Die von Zühlsdorf ausgewerteten Literaturstellen [65] beschreiben, dass bei 589 Patienten eine *P. aeruginosa*-Übertragung nachgewiesen werden konnte, wobei es in 221 Fällen zu einer Infektion kam. Einsatzgebiete waren die Bronchoskopie, die endoskopische retrograde Cholangiopankreatikographie (ERCP) sowie die Endoskopie des oberen Gastrointestinaltraktes. Ursachen für die Infektion reichten von fehlender Reinigung über mangelhafte/inadäquate Desinfektion, ungeeigneten Reinigern für das jeweilige Endoskop bis hin zu Gebrauch von unaufbereitetem Leitungswasser. Bei 117 Infektionsfällen konnte die Ursache in der Bildung eines Biofilms gefunden werden. Die Mehrzahl dieser Fälle beschreiben Alvarado et al. [6]. Burkhardt [13] untersuchte 1976 im Rahmen einer bakteriologischen Überprüfung in einem bayerischen Krankenhaus mehrere Endo-

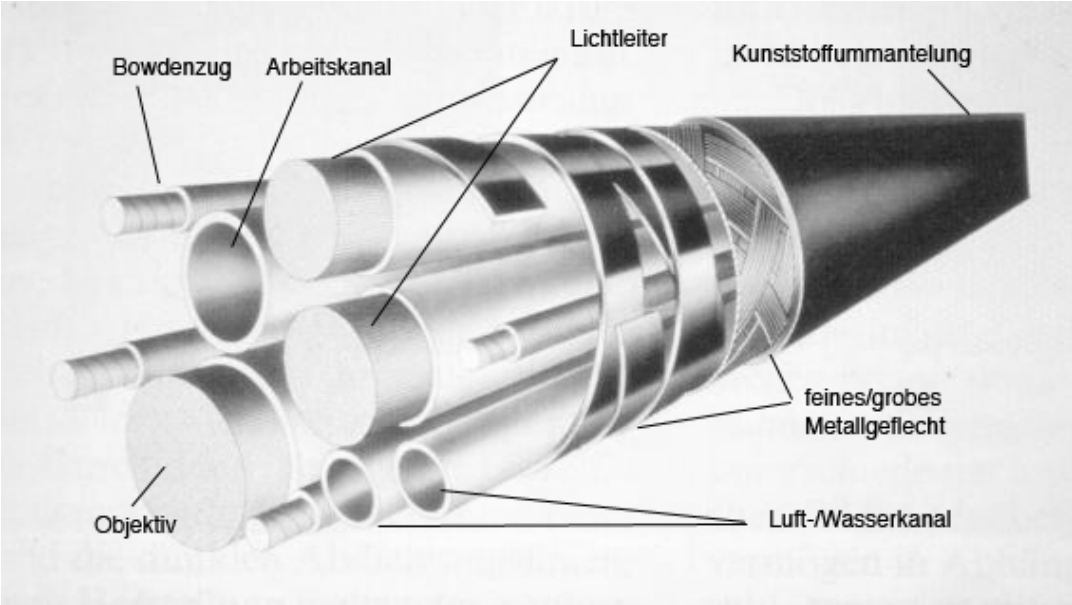

Abbildung 1.7: Aufbau des Einführschlauches mit distalem Ende eines flexiblen Endoskopes. Darstellung des Wandaufbaus und der einzelnen innenliegenden Bestandteile (mit freundlicher Genehmigung der PENTAX Europe GmbH, Hamburg, Deutschland).

skope. In diesem Krankenhaus war es zu einer Gruppeninfektion mit *Salmonella agona* gekommen. Nachgewiesen wurden Infektionen bei insgesamt 21 Patienten, die allesamt mit dem selben Endoskop untersucht worden waren. Die im Anschluss durchgeführte mikrobiologische Untersuchung des Endoskopes wies nicht nur *Salmonella agona* im Instrumentierkanal sondern auch Pseudomonaden im Instrumentierkanal und in der Spülflasche nach. Als Gesamtursache für die Kontamination wurde später die mangelhafte Desinfektion des Instrumentierkanals bzw. der Einsatz einer nicht geeigneten Desinfektionsmittellösung auf Phenolbasis festgestellt. Daraufhin formulierte er eine Empfehlung, die den Einsatz von Lösungen auf Formalinbasis vorsah.
1978 publizierten Hussain et al. [25] eine Kasuistik, bei der es zur Übertragung von *P. aeruginosa* durch Bronchoskope gekommen war. Problem bei der Aufbereitung war, dass die Saugkanäle inklusive ihrer Ventile in zusammengesetzter Form lediglich einer Desinfektionsmittellösung ausgesetzt waren. Von einer vorherigen Reinigung wird nicht gesprochen, auch wird der Begriff der Sterilität synonym mit dem der Desinfektion verwandt. Auch eine ein Jahr zuvor von Suratt et al. [59] publizierte Studie mit *P. aeruginosa*-Infektionen nach Bronchoskopie beschreibt lediglich eine Aufbereitung mittels Desinfektionsmittellösung ohne vorherige Reinigung, im weiteren Vorgehen wurde eine

intitiale Reinigung/Waschung mit Seifenlauge durchgeführt. Es fehlt hier jedoch auch die manuelle Bürstenreinigung. Sammartino et al. [54] berichten über eine Pseudoepidemie mit *P. aeruginosa* in einem Krankenhaus in den USA. Grund hierfür waren mangelhaft aufbereitete Bronchoskope. Helm et al. [24] beschreiben 1984 *Pseudomonas*-Septikämien nach Gallengangssystem-Endoskopien. In der restrospektiv durchgeführten Betrachtung nahm *P. aeruginosa* die Schlüsselrolle in den Septikämien ein und löste *Escherichia coli* ab. Als Infektionsquelle wurden einerseits die Endoskopkanäle, andererseits auch die Ansatzstücke des Endo-Washers, sowie das kalte Spülwasser an sich, identifiziert.

1.3.1.2 *Salmonella spp.*

Salmonellen sind ebenfalls gramnegative Stäbchenbakterien. Sie gehören zur Gruppe der Enterobakterien und sind obligate Krankheitserreger. Die Untergruppe der typhösen Salmonellen (*S. typhy und paratyphy*) verursacht die zyklischen Allgemeininfektionen Typhus und Paratyphus. Es bilden sich Granulome, die eine hohe Tendenz zur Einschmelzung haben, mit der Gefahr der Perforation des Darmlumens mit anschließender Peritonitis. Im Gegensatz dazu verursachen die Enteritissalmonellen lediglich Lokalinfektionen im Darm mit Durchfällen.
Bei 89 Patienten, bei denen *Salmonella spp.* nachgewiesen wurden, kam es in 62 Fällen zu Infektionen. Untersuchungsarten waren die Endoskopie des unteren und oberen Gastrointestinaltraktes. Auch hier lagen die Ursachen in der inadäquaten Desinfektion sowie in der fehlenden oder inadäquaten Bürstenreinigung [65]. Burkhardt [13] berichtet allein von 21 Patienten in einem Krankenhaus, die aufgrund einer mangelhaften Desinfektion eines Gastroskopes mit *Salmonella agona* infiziert wurden.

1.3.1.3 *Serratia spp.*

Serratia spp. sind gramnegative Stäbchenbakterien und verursachen als fakultativ pathogene Infektionserreger nosokomiale Atemweg- und Harnweginfektionen bis hin zur Sepsis.

Es wurde bei 46 Patienten *Serratia spp.* nachgewiesen, zehn entwickelten eine Infektion [65]. Vorausgehende Untersuchungsarten waren die Bronchoskopie und die ERCP. Nachgewiesene bzw. vermutete Ursachen lagen in der inadäquaten Desinfektion, zu langer Standzeit des Spülwassers und dem Einsatz von unaufbereitetem Leitungswasser zur Schlussspülung.

1.3.1.4 *Helicobacter spp.*

Helicobacter pylori, früher *Campylobacter*, ist ein gramnegatives Stäbchen. Die Rolle als Krankheitserreger spielt es in der Entstehung und Begünstigung der chronischen Gastritis und ist Kokarzinogen für die Entstehung von Magen-Malignomen.

Zur akuten Gastritis kam es bei acht Patienten nach Endoskopie des oberen Gastrointestinaltraktes durch inadäquate Desinfektion bzw. durch eine kontaminierte Biopsiezange [65]. Ein Kommentar zur Endoskop-assoziierten Infektion mit *Helicobacter pylori* im Jahre 1995 von Miyaji et al. [41] gibt eine Infektionsübertragung durch mangelhafte Desinfektion an bzw. es lässt sich aus seinen Ausführungen darauf schließen. Bei der Aufbereitung wurde lediglich eine Wischdesinfektion der Oberfläche und Spülung der Arbeitskanäle mittels Desinfektionsmittellösung, anschließend mit Wasser, durchgeführt.

1.3.1.5 *Mycobacterium spp.*

Mykobakterien sind Bakterien, deren Wandaufbau denen der grampositiven Bakterien ähnelt. Sie lassen sich jedoch nicht oder nur sehr schlecht gramfärben. Grund dafür ist die Bildung von wachsartigen Substanzen (Mykolsäuren), die sie vor äußeren Einflüssen, vor allem Säuren, schützt. In der Rolle als Krankheitserreger spielen vor allem *Mycobacterium* (*M.*) *tuberculosis* und *M. leprae* eine Rolle.

Nach Auswertung von zehn Literaturstellen durch Zühlsdorf [65] werden 20 Patienten beschrieben, bei denen *M. tuberculosis* isoliert wurde. Bei sieben kam es zum Ausbruch einer Tuberkulose. Infektionsquellen waren inadäquat aufbereitete Bronchoskope. Bezel et al. [8] berichten über zwei Tuberkulose-Kasuistiken nach Bronchoskopie eines Patienten mit offener Lungentuberkulose am Vortag. *M. tuberculosis* wurde anschließend bei zwei Patienten kulturell nachgewiesen. Retrospektiv wurde die Aufbereitung der Bronchoskope ausgewertet, wobei des keine Auffälligkeiten gab. Es erfolgte zunächst die manuelle Reinigung mit Wasser und Bürste, anschließend die Desinfektion und die Spülung; es fehlen Angaben zum genauen Ablauf der teilmaschinellen Aufbereitung, lediglich über Einsatz der Chemikalien werden Angaben gemacht. Auch eine Schlussspülung mit Wasser war erfolgt, jedoch sind hier keine Angaben zur Sterilität bzw. zur Aufbereitungsmethode des Wassers gemacht worden. Als Reservoir für Infektionserreger konnte das Bronchoskop als wahrscheinlich identifiziert werden, da bei der Typisierung, zumindest bei einem der beiden Patienten, die kulturell nachgewiesenen Mykobakterien einem identischen Stamm entsprachen. Aussagen, inwiefern das Bronchoskop inadäquat aufbereitet

worden war, finden sich nicht. Bryce et al. [12] berichten 1993 von einer Übertragung von Mykobakterien durch Bronchoskope. Dabei wurden kontaminierte Absaugventile des Bronchoskops als Quelle gefunden. Sie wurden im automatischen Reinigungs- und Desinfektionsgerät aufbereitet. Das Problem jedoch war, was spätere Untersuchungen zeigten, dass dieses Gerät nicht geeignet zur Reinigung dieser Ventile war. Die Dampfsterilisation der Ventile brachte schließlich die gewünschte Sterilität. Diese Kasuistik macht deutlich, wie viele Faktoren für eine Erregerübertragung eine Rolle spielen; einerseits die Bauart der Endoskope (Feinmechanik) und andererseits die Anforderung an den Hersteller des Reinigungs- und Desinfektionsgerätes.

1.3.1.6 *Legionella pneumophila*

Legionellen sind ebenfalls gramnegative Stäbchenbakterien. Auch sie haben ihr Reservoir, wie Pseudomonaden, u.a. in Wasserleitungen. Im Gegensatz zu allen anderen erwähnten Bakterien kann eine direkte Mensch-zu-Mensch Übertragung nicht erfolgen; sie erfolgt durch Aerosole und erzeugt eine granulomatöse Entzündungsreaktion. *Legionella pneumophila* verursacht neben dem sog. Pontiac-Fieber, die sog. Legionärskrankheit, eine schwer verlaufende Pneumonie.

Mitchell et al. [40] publizierten 1997 eine Arbeit, in der sie über einen pseudoepidemischen Ausbruch von *Legionella pneumophila* berichteten. Drei Patienten waren betroffen, wobei es bei keinem zu einem Ausbruch einer Pneumonie kam. Quelle der Infektion war Wasser aus einer besiedelten Wasserleitung für die Schlussspülung. 2003 wurde von Levy et al. [36] eine Übertragung von *Legionella pneumophila* durch kontaminierte Transoesophageal-Echokardiografie-Sonden (TEE) im Jahre 2000 publiziert. Dabei kam es bei zwei von drei Patienten zum Ausbruch einer Pneumonie; bei einem Patienten erst zwei Wochen nach erfolgter TEE. Ursache der Infektion mit *Legionella pneumophila* war Leitungswasser, welches, ohne mit einem Bakterienfilter aufbereitet, zur Schlussspülung angewendet worden war.

1.3.2 Viren

Endoskopieassoziierte Infektionen mit Viren werden in wenigen Literaturstellen beschrieben. Hierbei handelt es sich um Infektionen mit Hepatitis B- und C-Viren (HBV, HCV). Berichte über endoskopieassoziierte Übertragungen von HIV finden sich nicht. Eine Ursache hierfür könnte das lange diagnostische Fenster sein, also der Zeitraum zwischen

der Infektion bis zum Nachweis der Infektion. Der Zeitraum kann zwischen Wochen bis zu einem Jahr betragen. Daher ist der kausale Zusammenhang zwischen endoskopischem Eingriff und Infektion schwer herzustellen. Der dringende Verdacht einer nosokomialen Infektion wurde geäußert, als bei einem Hepatitis C-Virus positiven Patienten der Virus im Speichel nachgewiesen werden konnte [51]. Tennenbaum et al. berichten lediglich von einem Fall einer HCV-Infektion aufgrund eines mangelhaft aufbereiteten Duodenoskopes [60]. Bronowicki et al. [10] berichten jedoch ebenfalls über einen Fall einer HCV-Übertragung nach einer Koloskopie im Jahre 1995. Hierbei wurden zwei Patienten infiziert, die nach einer Koloskopie eines bekannt HCV-positiven Patienten mit dem selben Koloskop und der selben Biopsiezange untersucht wurden.
Birnie et al. [9] stellen einen Fall einer Übertragung von HBV von Patient zu Patient durch ein Endoskop vor. Das Endoskop wurde zunächst zur Blutstillung bei einer Oesophagusvarizenblutung eingesetzt und anschließend bei einem anderen Patienten zur Stillung einer Blutung eines Magengeschwürs. Bei beiden Patienten waren es also invasive, therapeutische endoskopische Eingriffe. Das Endoskop wurde nach jedem Eingriff gemäß den Herstellerempfehlungen aufbereitet. Dabei wurde der Arbeitskanal lediglich mit destilliertem Wasser und Luft gereinigt; auf den Einsatz von Glutaraldehyd wurde verzichtet, da der Hersteller dies nicht empfahl. Auch Morris et al. [42] beschreiben eine HBV-Übertragung nach einer Notfall-Gastroskopie. Bei einem nachträglich diagnostizierten HBV-positiven Patienten kam es zur Übertragung auf einen seronegativen Patienten.
Bei allen hier erwähnten Fällen konnte die Infektion durch Hepatitis-Viren lediglich weit retrospektiv eruiert werden, da es bei allen Patienten erst Wochen nach einem Eingriff zu ersten Symptomen gekommen war. Auch waren einige der Betroffenen Blutspender, sodass natürlich auch die Vermutung nahe lag, dass über diesen Weg eine Infektion stattgefunden haben könnte. Ein i.v.-Drogenmissbrauch konnte bei allen Betroffenen ausgeschlossen werden. Bei dem von Tennenbaum et al. beschriebenen Fall konnte eine eindeutige Zuordnung zwischen Endoskopie und Virus-Übertragung getroffen werden. Hierbei wurde das Genom des möglichen Überträgers und bei den zwei Empfängern untersucht und als identisch diagnostiziert. Die weitere Nachuntersuchung von möglicherweise infizierten Personen nach Endoskopie eines HCV- bzw. HBV-Infizierten konnte keine Infektion nachweisen, sodass die Infektion eher selten, aber nicht unmöglich ist, wie die eben beschriebenen Fälle zeigen.

1.3.3 Pilze

Auch eine Infektionserregerübertragung assoziiert mit endoskopischen Eingriffen durch Pilze wird von Zühlsdorf nach Auswertung von zehn Literaturstellen dargestellt [65]. Dabei kam es zwar zur Kolonisation von insgesamt 86 Patienten, jedoch nur in zwei Fällen zur einer Infektion. Hier wird eine schwere *Candida albicans*-Infektion von Pankreaspseudozysten nach ERCP bei einer alkoholkranken Patientin mit chronischer Pankreatitis beschrieben [20]. Hierbei kam es zur einer Verschleppung von *Candida albicans* in eine Pankreaspseudozyste mit Sepsis und Multiorganversagen. Es handelte sich jedoch möglicherweise um eine endogene Infektion, da *Candida albicans* durchaus den Gastrointestinaltrakt kolonisiert. Eine weiterere Literaturquelle berichtet von einer Kontamination des Biopsiekanals eines Gastroskops mit *Trichosporon beigelli* durch Magensaft-Aspirat nach einer Untersuchung, aufgrund derer es zu einer Infektion von weiteren zehn Patienten kam [56].

1.3.4 Prionen

Prionerkrankungen, wie die bovine spongiforme Enzephalopathie bei Rindern (BSE), Scrapie bei Schafen und die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJK) sind Erkrankungen, verursacht durch Prionen (Proteinaceous infectious particle). Diese gleichen in ihrer Struktur körpereigenen Proteinen, sind aber in ihrer dreidimensionalen Struktur verändert. Bis heute ist nicht genau geklärt, ob es sich bei Prionen um den eigentlichen Erreger oder um ein Produkt eines Erregers handelt. Die Übertragung erfolgt meist über die Nahrung, allerdings sind Schmierinfektionen nicht ausgeschlossen; auch spontane Mutationen bzw. die genetische Übertragungen sind beschrieben (familiäre Variante der CJK). Gesichert ist bis heute lediglich, dass sich Prionen den heute gängigen Sterilisations- sowie Aufbereitungsmethoden entziehen, auch das Abkochen von Nahrungsmitteln bringt keine Abhilfe [7]. In der Literatur findet sich lediglich die Arbeit von Gorse et al. aus dem Jahr 1991 [22] mit Angabe eines Creutzfeldt-Jakob-Syndroms im Rahmen einer gastrointestinalen Endoskopie. Die Nationale CJK-Überwachungseinheit der Universität von Edinburgh (The National Creutzfeldt-Jakob Disease Surveillance Unit (NCJDSU)) berichtet in ihrer im Internet veröffentlichten Übersicht über die Variante der CJK (vCJK) [48]. Dabei wurden Fälle bis Dezember 2011 aus verschiedenen Ländern (England, Frankreich, Irland, Italien, USA, Kanada, Saudi Arabien, Japan, Niederlande, Portugal und Spanien) gesammelt. Fälle aus Deutschland finden sich nicht. Bei der auffallend hohen

Zahl (176) von vCJK in England war es durch eine Bluttransfusion in vier Fällen zur vCJK gekommen. Dies macht deutlich, dass eine Übertragungsmöglichkeit von Prionen also auch über den Blutweg existiert und somit auch durch kontaminierte Endoskope geschehen kann.

1.4 Zusammenfassung

Der Nachweis von nosokomialen Infektionen, ausgelöst durch kontaminierte Endoskope mit u.a. *P. aeruginosa* mit Hervorrufen einer Cholangitis bei der ERCP, Leber-Abszessen nach ERCP [15] bis hin zur Sepsis und Tod [4], macht deutlich, dass dringender Handlungsbedarf in der Aufbereitung besteht. Selbst nach automatisierter maschineller Reinigung waren nosokomiale Infektionen zu verzeichnen [4]. Auch spielt die nosokomiale Infektion mit endogenen Bakterien, assoziiert mit einem endoskopischen Eingriff, ebenso eine wichtige Rolle [5].
Eine Arbeit von Schulze über die Aufbereitung von flexiblen Endoskopen subsummierte Infektionsquellen und wesentliche Ursachen für Infektionen in der Endoskopie [55]:

1. Infektionsquellen
    - der vorher untersuchte Patient
    - zur Aufbereitung verwendete, ggf. kontaminierte Reinigungs-, Desinfektionsmittel- und Spüllösungen
    - das Endoskop selbst
    - Zubehör, wie z.B. Biopsie- und Fasszangen
2. Ursachen
    - ungenügende Reinigung
    - ungenügende Desinfektion
    - mikrobielle Beläge
    - ungenügende Trocknung
    - unzweckmäßige Lagerung
    - mangelhaft aufbereitete Zusatzinstrumente (fehlende Sterilisation von z.B. Biopsiezangen)
    - Fehlen geeigneter Aufbereitungsgeräte oder Verfahren

- ungenügend qualifiziertes Personal
- bauliche und organisatorische Unzulänglichkeiten

Die Literaturauswertung von Zühlsdorf [65] zeigte u.a., dass der Großteil der Infektionen auf *P. aeruginosa* zurückzuführen war. Gerade diese Erkenntnisse und die Ergebnisse aus der 2002 veröffentlichten Interventionsstudie [26] machen klar, dass die Aufbereitung flexibler Endoskope eine hohe Anforderung nicht nur an das Personal, sondern auch an die Hersteller der Endoskope selbst sowie an die Hersteller von Reinigungs- und Desinfektionsmitteln und auch an die Hersteller der Reinigungs- und Desinfektionsgeräte stellt. Die Ergebnisse der Studie zeigten weiterhin, dass 49% der untersuchten flexiblen Endoskope zu beanstanden waren. Auch nach einer gründlichen Aufklärung über das Aufbereitungsprocedere konnte die Beanstandungsrate nur um 10% gesenkt werden. Alfa et al. untersuchten insgesamt 119 Endoskope auf bakterielle Belastung nach Einsatz während einer ERCP und stellten bei 8% der untersuchten Geräte mehr als 200 KBE/ml fest [1].

1.5 Zielstellung der Arbeit

Aufgrund der Ergebnisse aus den unterschiedlichen Untersuchungen zur Erregerübertragung bei endoskopischen Eingriffen wurde die Forderung für validierte Überprüfungsmethoden der Endoskop-Aufbereitung laut. Eine Empfehlung der Deutschen Gesellschaft für Krankenhaus Hygiene (DGKH) richtete sich an die thermische Aufbereitung bzw. Desinfektion. In der vorliegenden DIN ISO/TS 15883-5 [30] wurde *E. faecium*, ein hitzebeständiges Bakterium, für die chemothermische Desinfektion eingesetzt. Neuere Verfahren verwenden bei der Desinfektion Temperaturen von deutlich weniger als 60°C; dabei ist *E. faecium* als Prüforganismus bei der Validierung der Aufbereitung nicht mehr sinnvoll. *P. aeruginosa* ist als Indikatorbakterium für eine mangelhafte Reinigung flexibler Endoskope etabliert und findet sich als Testorganismus, welcher zur Biofilmbildung fähig ist, in der Norm bei der Prüfmethode zur Endoskopaufbereitung in Frankreich. Jedoch fehlen bei *P. aeruginosa* Erfahrungen hinsichtlich der Niedrigtemperaturaufbereitung.
Wie alle Prozesse zur Aufbereitung von Medizinprodukten müssen auch die Prozesse zur Aufbereitung von Endoskopen validiert werden. Hierzu braucht man validierte Methoden. Eine Methode ist hierbei die Anwendung eines Prüfkörpers zur Überprüfung der Reinigungs- oder auch Desinfektionsleistung bei der Validierung.
Um die Reinigungs-, oder Desinfektionsleistung bestimmen zu können muss man die

Rückgewinnung mit und ohne Einsatz eines Reinigungs- und Desinfektionsgerätes messen.
In der hier vorliegenden Arbeit wurde dies mit dem Testorganismus *P. aeruginosa* durchgeführt.

Um dies zu messen wurden folgende Versuche durchgeführt:

1. Welchen Einfluss haben unterschiedliche Spüllösungen?
2. Welchen Einfluss haben unterschiedliche Spültechniken?
3. Welchen Einfluss hat der Ultraschall?
4. Ist *P. aeruginosa* als Testorganismus geeignet?
5. Ist die Prüfmethode für eine Validierung geeignet?

2 Materialien und Methoden

Im Folgenden werden die Materialien und Methoden beschrieben, die für die Vorbereitung, die Durchführung sowie die Ergebnisgewinnung und Auswertung benötigt wurden.

2.1 Materialien

Für die Durchführung der Versuche standen folgende Materialien und Geräte zur Verfügung:

1. Blut
2. Testorganismus
3. Caseinpepton-Sojamehlpepton-Bouillon
4. Bakterienbouillon
5. Blut-Bakteriensuspension
6. Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agar
7. Bakteriensuspension
8. Prüfkörper
9. Spüllösungen
10. Geräte

2.1.1 Blut

Es wurden acht Blutchargen von heparinisiertem Schafblut (10 I.E. Heparin/ml) der Fa. ACILA AG verwendet.

2.1.2 Testorganismus

Als Testorganismus wurde *P. aeruginosa* DSM 939 (ATCC 15442) verwendet.

2.1.3 Caseinpepton-Sojamehlpepton-Bouillon

Zur Anreicherung von *P. aeruginosa* wurde eine Caseinpepton-Sojamehlpepton-Bouillon (CSB) der Fa. OXOID, Best. Nr. CM 129 verwendet. Tabelle 2.1 zeigt die Zusammensetzung der CSB.

Tabelle 2.1: Zusammensetzung der Caseinpepton-Sojamehlpepton-Bouillon in g/l

Bestandteil	Konzentration
Caseinpepton	17,0
Sojamehlpepton	3,0
NaCl	5,0
Dikaliumhydrogencarbonat	2,5
Glucose	2,5

2.1.4 Bakterienbouillon

Die Bakterienbouillon bestand aus Caseinpepton-Sojamehlpepton-Bouillon und *P. aeruginosa*.

2.1.5 Blut-Bakteriensuspension

Die Blut-Bakteriensuspension bestand aus heparinisiertem Schafblut und Bakteriensuspension.

2.1.6 Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agar

Als Nährboden für die Kultivierung wurde Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agar (CSA) der Fa. OXOID Best. Nr. CM 131 verwendet. Tabelle 2.2 zeigt die Zusammensetzung des CSA.

Tabelle 2.2: Zusammensetzung des Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agars in g/l

Bestandteil	Konzentration
Caseinpepton	15,0
Sojamehlpepton	5,0
NaCl	5,0
Agar-Agar	15,0

2.1.7 Bakteriensuspension

Die Bakteriensuspension wurde aus *P. aeruginosa* und 0,9%-iger NaCl Lösung hergestellt (siehe 2.2.2).

2.1.8 Prüfkörper

Als Prüfkörper wurden 2 m lange und 0,2 cm im Innendurchmesser messende Polytetrafluorethylen (PTFE) -Schläuche (Spec. C929.3 Lot. No. TS 0301249 C1, Order No. 1265, Fa. Deutsch und Neumann) mit einem Volumen von 6,3 ml verwendet.

2.1.9 Spüllösungen

Es wurden fünf verschiedene Spüllösungen verwendet:

1. 0,9%-ige NaCl-Lösung, Fa. MERCK, 1.06404.1000
2. 0,9%-ige NaCl-Lösung mit Tween 80 0,1%-ig, Fa. MERCK-Schuchardt, 822187 S20885 702
3. Caseinpepton-Sojamehlpepton-Bouillon
4. CSB mit Enthemmersubstanzen. Tabelle 2.3 zeigt die Zusammensetzung des verwendeten Enthemmers.
5. 1%-ige Sodium-Dodecyl-Sulfat-Lösung (SDS-Lösung), Fa. SERVA, Best.Nr.: 20760

Abbildung 2.1: Vorbereitete Spüllösungen vor Versuchsbeginn, siehe 2.1.9

Tabelle 2.3: Zusammensetzung des Enthemmers

Enthemmer	Bestandteil	Konzentration in %
	Tween 80	3
	Lecithin	0,3
	Histidin	0,1
	Natriumthiosulfat	0,5

2.1.10 Geräte

- sterile 50 ml-Blasenspritze
- sterile 10 ml-Spritze
- sterilisierte Spritzenaufsätze (passend auf PTFE-Schlauch)

- Spiral-System, Spiral-Plater, Meintrup-Labortechnik, Serial 789 Model CU
- Infusomat® II, Fa. B.Braun Melsungen, Type 870602, Nr.7320
- Sog-Pumpe, Typ N022AN.18, Nr. 01646557, Fisher-Bioblock-Scientific
- Ultraschallgerät Bandelin electronic, Typ: Sonorex RK 106, Pro.Nr. 306.00019749.015, Hf-Freq.: 35 kHz.
- Koloniezählgerät, Colony Counter 50971, Bioblock Scientific, SN: 990800207
- Varifuge 3.2S, Heraeus Sepatech, Fabr.Nr. 163063
- sterile Einweg-Zentrifugen-Behälter, Fa. Becton/Dickinson, No. 352070, 50 ml Polypropylene Conical Tube 30 x 115 mm style
- Reagenzglasrüttler, VF2, KA-Labortechnik
- Eppendorf®-Pipetten (1000 μl und 200 μl)
- Combi-Stopper-Verschlusskonen - Luer-Lock®, Fa. B.Braun Melsungen, Artikel-Nr. 4495101, PZN 3200685

2.2 Methoden

Die folgenden Methoden wurden zur Versuchsdurchführung und -auswertung benötigt. In allen Versuchsreihen (siehe Abschnitt 2.2.7) wurde die Höhe der Rückgewinnung von *P. aeruginosa* untersucht.

2.2.1 Herstellung der Bakterienbouillon

Die Herstellung der Bakterienbouillon erfolgte in 2 Phasen:

1. Beimpfen von 9 ml CSB mit *P. aeruginosa* und Bebrüten bei 36 ± 1°C im Wärmeschrank für 24 Std.
2. Überimpfen von 100 μl der ersten CS-Bouillon in 9 ml CSB und Bebrüten bei 36 ± 1°C für 48 Std.

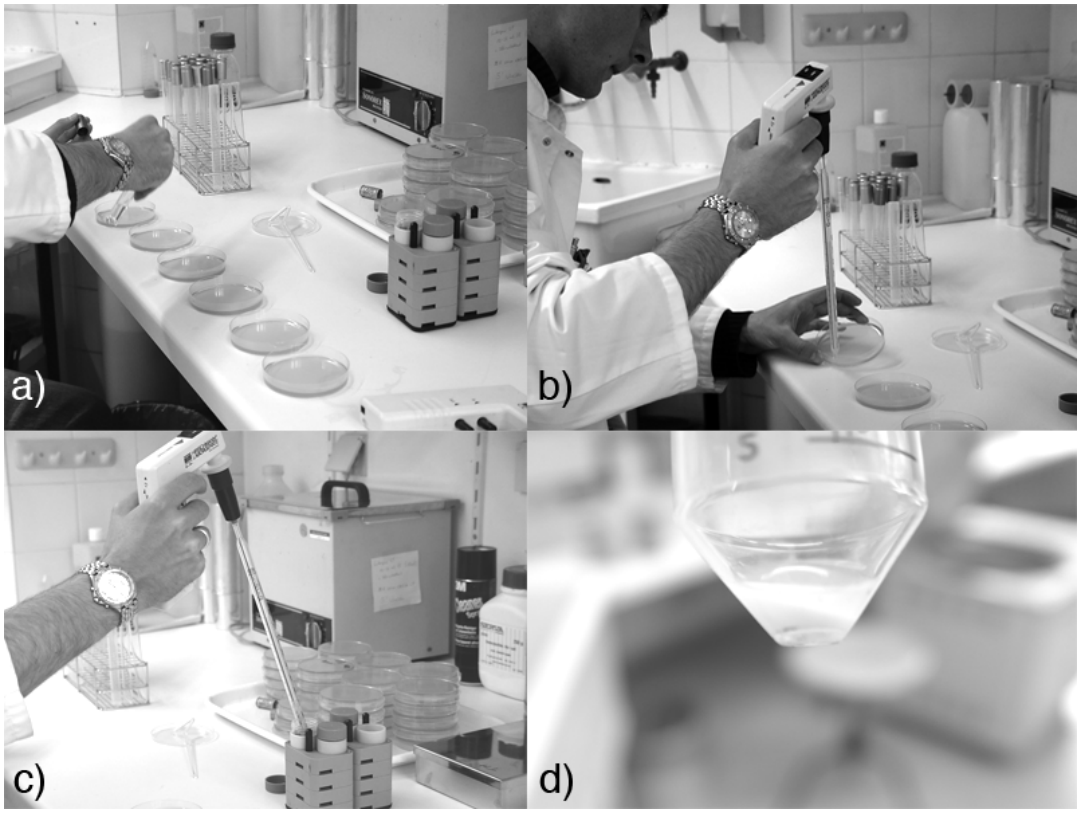

Abbildung 2.2: Phasen der Herstellung der Bakteriensuspension: a) Abschwemmen des Bakterienrasens, b) Abpipettieren, c) Vorbereiten der Lösungen zur Zentrifugation, d) Bodensatz nach Zentrifugation, siehe 2.2.2.

2.2.2 Herstellung der Bakteriensuspension

Für jeden Versuchstag wurde eine neue Bakteriensuspension hergestellt. Zur Herstellung der Bakteriensuspension wurden 50 Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agarplatten mit je 100 μl Bakterienbouillon(siehe 2.2.1) beimpft und 48 Std. bei 36°C ± 1°C im Wärmeschrank bebrütet. Anschließend wurde der Bakterienrasen von den CSA-Platten jeweils mit 4,5 ml 0,9%-iger NaCl-Lösung abgeschwemmt und in insgesamt vier Zentrifugen-Behältern aufgefangen. Anschließend erfolgte der erste von drei Zentrifugationsschritten, die zur Herstellung der Bakteriensuspension nötig waren. Die Zentrifugation erfolgte über eine Zeitdauer von 10 Minuten bei einer Umdrehungszahl von 2500 U/min. Nach jedem Zentrifugationsschritt wurde der flüssige Überstand verworfen, der Bodensatz aus jedem Zentrifugen-Behälter mit insgesamt 36 ml 0,9%-iger NaCl-Lösung versetzt und aufgeschüttelt. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurden die Bodensätze mit 8,5 ml 0,9%-iger NaCl-Lösung aufgeschüttelt, in einem, mit Glasperlen gefüllten, 500 ml-

Becherglas aufgefangen und 15 Minuten auf dem Schüttler geschüttelt. Anschließend erfolgte die Aufbewahrung im Kühlschrank für maximal vier Stunden.

2.2.3 Herstellung der Blut-Bakteriensuspension

Zur Herstellung der Blut-Bakteriensuspension wurden 52 ml heparinisiertes Schafblut mit 2 ml Bakteriensuspension(siehe 2.2.2) versetzt.

2.2.4 Herstellung der Testanschmutzung

Die Testanschmutzung richtet sich nach der Methode von Spicher und Peters [58]. Zu deren Herstellung wurden 54 ml der Blut-Bakteriensuspension (siehe 2.2.3) mit 900 μl Protamin versetzt und somit das Blut wieder gerinnbar gemacht. Zeitgleich wurde eine Messuhr gestartet, um die Zeit bis zur Gerinnung zu dokumentieren.

2.2.5 Anschmutzung der Prüfkörper

Die Anschmutzung der Prüfkörper erfolgte jeweils mit 10 ml Testanschmutzung (siehe 2.2.4). Hierzu wurden 10 ml Testanschmutzung in eine 10 ml Spritze aufgezogen und über einen Spritzenaufsatz in den 2 m langen PTFE-Schlauch injiziert (siehe Abb. 2.3). Anschließend wurden 2 x 10 ml Luft zügig durch den Schlauch geblasen. Der Schlauch wurde dann für eine Stunde bei Zimmertemperatur waagerecht gelagert (siehe Abblidung 2.3).

2.2.6 Probengewinnung

Nach einstündiger Lagerung bei Zimmertemperatur wurden die mit der Testanschmutzung versetzten Prüfkörper (siehe 2.2.5) unterschiedlich gespült. Die gewonnenen Proben wurden in 500 ml-Bechergläsern aufgefangen. Der Boden der Bechergläser war mit Glasperlen bedeckt, wodurch beim anschließenden Verarbeiten auf dem Rüttler ein Auflösen der Blutkoagel bewirkt werden konnte.

Abbildung 2.3: Anschmutzung der Prüfkörper mit Testanschmutzung, siehe 2.2.5

2.2.7 Versuchsreihen

Um Unterschiede in der Höhe der Rückgewinnung bei Einsatz verschiedener Parameter herauszufinden, wurden insgesamt drei Versuchsreihen, mit Doppelbestimmung der KBE, durchgeführt. Die verschiedenen Parameter waren:

1. verschiedene Spüllösungen
2. verschiedene Spültechniken
3. Einsatz von Ultraschall.

   Um überhaupt mit Ultraschall als Parameter arbeiten zu können, musste noch nachgewiesen werden, ob einerseits Ultraschall von außen appliziert im Reagenzglas Wirkung zeigt und andererseits, wie das Überlebensverhalten von *P. aeruginosa* im Ultraschallbad ist.

a) **2.2.7.1 Wirksamkeit von Ultraschall im Reagenzglas**

Um den Nachweis der Wirksamkeit von Ultraschall im Reagenzglas zu erbringen, wurde, analog zur Testung der Ultraschall-Cavitation außerhalb und innerhalb eines Reagenzglases von Muqbil et al. [45], Aluminiumfolie der Größe 1 x 1 cm in ein mit 9 ml einer 0,9%-igen NaCl-Lösung gefülltes Reagenzglas gelegt und anschließend für mindestens 5 Minuten mit Ultraschall behandelt. Das Ultraschallgerät war mit Aqua destilata. befüllt worden; dabei wurde darauf geachtet, dass kein Kontakt zwischen dem das Reagenzglas umgebenden Aqua destilata und der 0,9%-igen NaCl-Lösung bestand. Der Ultraschall wurde als wirksam erachtet, wenn sich Perforationen in der Aluminiumfolie zeigten.

b) **2.2.7.2 Überlebensverhalten von *P. aeruginosa* im Ultraschallbad**

Es wurde das Überlebensverhalten von *P. aeruginosa* im Ultraschallbad untersucht. Hierzu wurde *P. aeruginosa* in einer CSB zunächst kultiviert und anschließend in einer Verdünnungsreihe für die Auswertung verdünnt. Die in Reagenzgläsern verdünnten Proben wurden für 1, 2, 3, 5, 10 und 15 Minuten dem Ultraschall ausgesetzt. Dabei wurde darauf geachtet, dass der Flüssigkeitsspiegel der Probe unterhalb des Aqua dest.-Spiegels lag. Anschließend wurden die Proben membranfiltriert und die Membranfilter auf jeweils eine CSA-Platte verbracht. Nach 24 Std. bei 36°C ± 1°C im Wärmeschrank wurden die KBE auf dem Membranfilter mittels Koloniezählgerät ausgezählt und im Protokoll dokumentiert. Eine Kontrollprobe ohne Behandlung wurde nicht angesetzt.

2.2.8 Durchführung der Versuchsreihen

Für die Ergebnisgewinnung wurden drei Versuchsreihen durchgeführt:

1. Spülung der Prüfkörper mit fünf verschiedenen Spüllösungen (siehe 2.1.9), aber gleicher Spültechnik. Es wurden jeweils 50 ml Spüllösung mit anschließendem Durchblasen mit 2 x 50 ml Raumluft verwendet. Das Spülen erfolgte mittels Blasenspritze.
2. Spülung der Testkörper mit fünf verschiedenen Spültechniken:

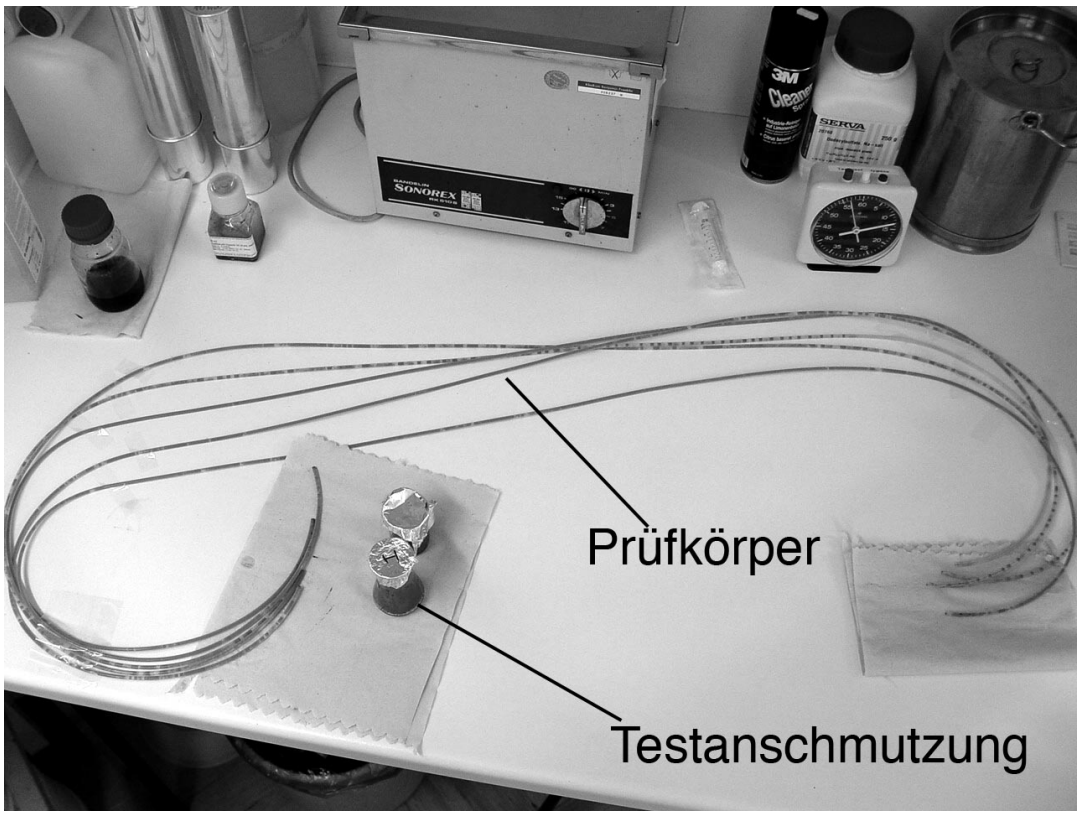

Abbildung 2.4: Lagerung der Prüfkörper nach Anschmutzung, siehe 2.2.5.

a) Manuelles Spülen der Prüfkörper mit 50 ml 0,9%-iger NaCl-Lösung mit anschließendem Durchblasen mit 2 x 50 ml Raumluft mittels Blasenspritze.

b) Manuelles Spülen der Prüfkörper mit 20 ml 0,9%-iger NaCl-Lösung: 5-maliges Wiederaufsaugen der Probe und 5 x erneutes Spülen mittels Blasenspritze, anschließend Durchblasen mit 2 x 50 ml Raumluft mittels Blasenspritze.

c) 5-maliges Spülen der Prüfkörper mit jeweils 10 ml 0,9%-iger NaCl-Lösung und jeweils Durchblasen mit 10 ml Raumluft mittels Blasenspritze.

d) Maschinelles Spülen der Prüfkörper mit einem Infusomaten® mit einer Flussrate von 50 ml/3,33 Minuten mit 0,9%-iger NaCl-Lösung, abschließendes Durchblasen mit 2 x 50 ml Raumluft mittels Blasenspritze.

e) Aufsaugen von 50 ml 0,9%-iger NaCl-Lösung durch die Prüfkörper mit einer Sog-Pumpe. Auf ein abschließendes Durchblasen mit 2 x 50 ml Raumluft mittels Blasenspritze konnte verzichtet werden, da der Sog der Pumpe ausreichend war, um den Schlauch leer zu saugen.

3. Behandlung im Ultraschallbad für die Dauer von 10 Minuten, Spülung der Prüfkörper mit 50 ml 0,9%-iger NaCl-Lösung und Durchblasen mit 2 x 50 ml Raumluft. Zur Ultraschallbehandlung wurden die angeschmutzten Prüfkörper kreisförmig, passend in die runde Behandlungskammer des Ultraschallgeräts, eingetaucht. Damit kein Wasser in die Prüfkörper eintreten kann, wurden die Enden mittels Combi-Stopper-Verschlußkonus-Luer-Lock® verschlossen. Die Dichtigkeit wurde zuvor mittels gefärbtem Wasser (Methylenblau) und bei eingeschaltetem Ultraschall überprüft und nachgewiesen.

   Zusätzlich wurde ein Kontroll-Prüfkörper angeschmutzt und ohne Ultraschallbehandlung anschließend mit 50 ml 0,9%-iger NaCl-Lösung und 2 x 50 ml Raumluft gespült.

2.2.9 Verdünnungsreihen

Abbildung 2.5: Aufbringen der verdünnten Proben auf CSA mittels Spiral-Plater

Die gewonnenen Proben aus den jeweiligen Versuchsreihen wurden in Verdünnungsreihen von 10^{-2} bis 10^{-5} verdünnt, mittels Spiral-Plater auf CS-Agar-Platten im Doppelansatz aufgebracht (siehe Abbildung 2.5) und bei 36°C ± 1°C im Wärmeschrank für 24 Stunden bebrütet.

2.2.10 Ergebnisgewinnung

Nach 24-stündiger Bebrütung im Wärmeschrank wurden die koloniebildenden Einheiten über dem Koloniezählgerät ausgezählt und in einem Protokollbogen dokumentiert.

3 Versuchszusammenfassung und -auswertung

3.1 Unterschiedliche Spüllösungen

In der ersten Versuchsreihe mit fünf unterschiedlichen Spüllösungen wurden an vier Versuchstagen insgesamt 54 Prüfkörper im Doppelansatz mit der Testanschmutzung versehen. Pro Versuchstag wurden jeweils drei Versuchsdurchläufe mit jeweils einem Ansatz der Testanschmutzung für fünf Prüfkörper durchgeführt.

3.2 Unterschiedliche Spültechniken

In der zweiten Versuchsreihe mit fünf unterschiedlichen Spültechniken wurden an drei Versuchstagen insgesamt 27 Prüfkörper im Doppelansatz mit der Testanschmutzung versehen. Pro Versuchstag wurden drei Versuchsdurchläufe mit jeweils einer Testanschmutzung für neun Prüfkörper durchgeführt.

3.3 Überlebensverhalten von *P. aeruginosa* im Ultraschallbad

In der dritten Versuchsreihe zum Überlebensverhalten von *P. aeruginosa* wurden an drei Versuchstagen im Doppelansatz Untersuchungen durchgeführt. In die Berechnung flossen nur CSA-Platten mit > 6 KBE/Platte. Dem ersten und zweiten Versuch liegt eine Verdünnungsstufe von 10^{-8} zugrunde. Beim dritten Versuch wurde zur besseren Zählbarkeit der KBE auf dem Membranfilter eine höhere Verdünnungsstufe (10^{-9}) gewählt.

3.4 Spülung nach Ultraschallbehandlung

Bei den Versuchen mit vorherigem Einsatz von Ultraschall wurden an insgesamt zwei Versuchstagen 24 Prüfkörper, einschließlich acht Kontrollprüfkörpern, im Doppelansatz mit der Testanschmutzung versehen. Innerhalb eines Versuchstages wurden vier Versuchsdurchläufe mit jeweils einer Testanschmutzung für drei Prüfkörper durchgeführt. Die gewonnenen Proben wurden in Verdünnungsreihen von 10^{-2} bis 10^{-5} verdünnt und dann mittels Spiral-Plater auf CS-Agar-Platten im Doppelansatz aufgebracht und bei 36°C ± 1°C im Wärmeschrank für 24 Std. bebrütet.

3.5 Weitere Auswertung

Während der Versuchsdurchführung bei den Versuchen zur Spüllösung, zur Spültechnik und zum Einsatz der Ultraschallbehandlung wurden ebenfalls Proben im Doppelansatz aus jeder Testanschmutzung genommen, verdünnt, auf CSA-Platten mittels Spiral-Plater übertragen und für 24 Std. bei 36°C ± 1°C bebrütet.

Nach 24 Std. wurden die KBE der Bakteriensuspension der drei bzw. vier Testanschmutzungen sowie aller Proben der Prüfkörper mit dem Koloniezählgerät erfasst und im Versuchsprotokoll dokumentiert.

In die Berechnungen kamen nur Ergebnisse mit > 6 KBE/Platte. Anschließend wurde der Mittelwert der KBE für jede verwertbare Verdünnungsstufe pro Prüfkörper ermittelt und in einer SPSS®-Tabelle aufgetragen. Aus diesen Daten wurden zunächst KBE/ml, dann KBE im Prüfkörper errechnet und zur besserern Darstellbarkeit im logarithmischen Maßstab als Boxplot aufgetragen.

4 Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse aus den drei Versuchsreihen dargestellt, in denen die Rückgewinnung von KBE in Abhängigkeit von verschiedenen Parametern (siehe 2.2.7) untersucht wurde.

4.1 Spülung mit unterschiedlichen Lösungen

In der ersten Versuchsreihe wurden die angeschmutzten Prüfkörper nach einstündiger waagerechter Lagerung bei Raumtemperatur mit unterschiedlichen Spüllösungen (siehe 2.1.9) gespült, die Proben gewonnen und weiterverarbeitet.

Durch Spülung mit 1%-iger SDS-Lösung war festzustellen, dass die Prüfkörper optisch wesentlich sauberer erschienen als die Prüfkörper, die mit den anderen vier beschriebenen Spüllösungen verarbeitet wurden. Die Auswertung der rückgewonnenen Proben ergab, dass bei allen Versuchsdurchläufen, an verschiedenen Tagen und mit unterschiedlichen Blutchargen, kein Bakterienwachstum zu verzeichnen war. Somit kann davon ausgegangen werden, dass 1%-ige SDS-Lösung *P. aeruginosa* vollständig abtötet. Aus diesem Grund wurde bei den weiteren Versuchen ohne 1%-ige SDS-Lösung gearbeitet.

Abbildung 4.1 zeigt die eingebrachten koloniebildenden Einheiten (KBE) in den Prüfkörpern der ersten Versuchsreihe. Der Median liegt bei ca. 9,4 $\log_{10}$ und ist leicht nach oben verschoben, 50 % der gewonnenen Werte liegen ca. zwischen 9,3 $\log_{10}$ und 9,6 $\log_{10}$, die Streuung ist somit sehr gering. Ausreisser und Extremwerte liegen nicht vor, das Maximum liegt bei 9,7 $\log_{10}$, das Minimum bei 9,1 $\log_{10}$.

Abbildung 4.2 zeigt die Höhe der Rückgewinnung von *P. aeruginosa* in Abhängigkeit vom Einsatz verschiedener Spüllösungen. Die Mediane aus den gewonnenen Werten liegen durch Spülung sowohl mittels 0,9%-iger NaCl-Lösung als auch mittels 0,9%-iger NaCl mit Tween 80 0,1%-ig sowie mittels CSB bei ca. 8,5 $\log_{10}$ und durch Spülung mittels CSB+Enthemmersubstanzen bei 8,6 $\log_{10}$. Bei Einsatz der vier Spüllösungen

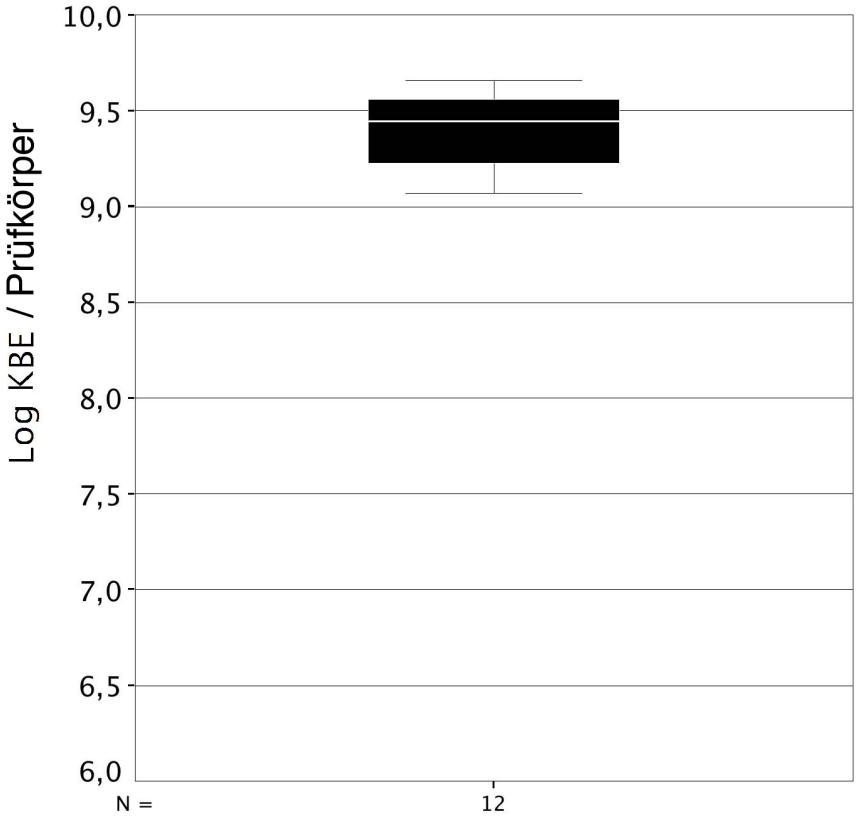

Abbildung 4.1: Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KBE) von *P. aeruginosa* in den Prüfkörpern der ersten Versuchsreihe, log-Darstellung als Boxplot, N=12.

schwanken die Mediane somit lediglich um ca. 0,1 $\log_{10}$-Stufen.

Der Einsatz unterschiedlicher Spüllösungen zeigt einen nur sehr geringen Unterschied in der Rückgewinnung von KBE. Im Vergleich zu der KBE-Anzahl in der Testanschmutzung liegt die Rückgewinnung bei Spülung mit 0,9%-iger NaCl-Lösung, mit 0,9%-iger NaCl + Tween 80 0,1%-ig und mit CSB bei rund 90%. Bei CSB+Enthemmersubstanzen liegt sie bei rund 90,5%.

Tabelle 4.1 zeigt die Interquartilsbereiche, Maxima und Minima der Boxplots bei Einsatz von verschiedenen Spüllösungen. Zu erkennen ist, dass sich alle Werte der Interquartilsbereiche und der Maxima und Minima nicht wesentlich unterscheiden. Die größte Streuung liegt bei Spülung mittels 0,9%-iger NaCl-Lösung + Tween 80 0,1%-ig vor, die

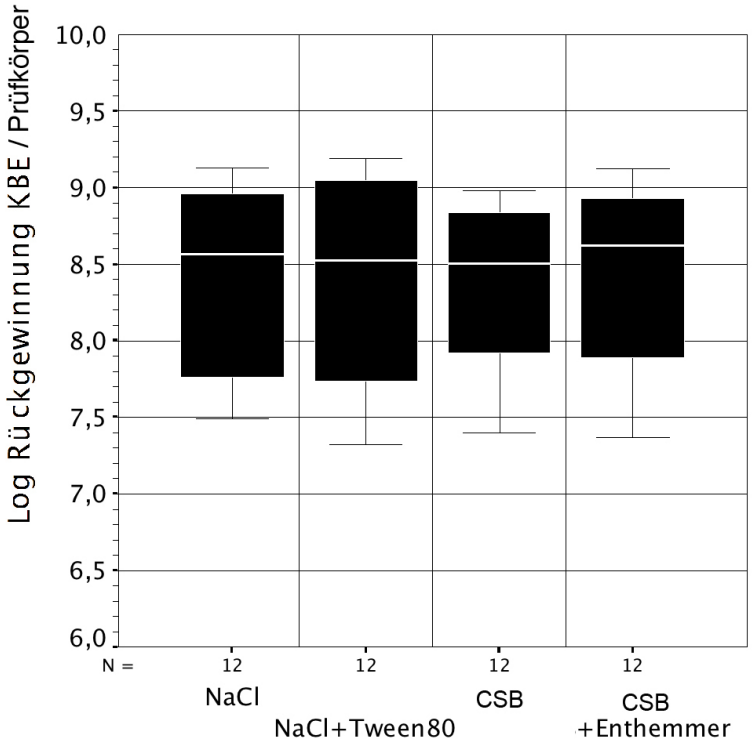

Abbildung 4.2: Rückgewinnung koloniebildender Einheiten (KBE) von *P. aeruginosa* in Abhängigkeit von verschiedenen Spüllösungen: 0,9%-ige NaCl-Lösung, 0,9%-ige NaCl-Lösung + Tween 80 0,1%-ig, Caseinpepton-Sojamehlpepton-Bouillon (CSB) und CSB+Enthemmersubstanzen, log-Darstellung als Boxplot, N=48.

geringste bei Spülung mittels Caseinpepton-Sojamehlpepton-Bouillon. Ebenso verhält es sich mit den Maxima und Minima.

Da keine Unterschiede bestimmbar waren, aufgrund der guten Praktikabilität, der Einfachheit und der geringen Kosten, wurden die folgenden Versuche nur noch mit 0,9%-iger NaCl-Lösung durchgeführt.

4.2 Spülung mit unterschiedlichen Techniken

In der zweiten Versuchsreihe wurden die angeschmutzten Prüfkörper nach einstündiger, waagerechter Lagerung bei Raumtemperatur mit unterschiedlichen Spültechniken

Tabelle 4.1: Interquartilsbereiche, Maxima und Minima der Boxplots in Abb. 4.2 bei Einsatz von 0,9%-iger NaCl-Lösung (NaCl), 0,9%-ige NaCl-Lösung + Tween 80 0,1%-ig (NaCl+Tween 80), Caseinpepton-Sojamehlpepton-Bouillon (CSB) und CSB+Enthemmersubstanzen, Werte in $\log_{10}$.

Spüllösung	Interquartil	Max.	Min.
0,9% NaCl	7,8-8,9	9,1	7,5
0,9% NaCl mit Tween 80 0,1%-ig	7,7-9,1	9,2	7,3
CSB	7,9-8,8	9,0	7,4
CSB+Enthemmersubstanzen	7,9-8,9	9,1	7,3

gespült (siehe 2.2.7, Punkt 2.), die Proben gewonnen und weiterverarbeitet.

Abbildung 4.3 zeigt die in die Prüfkörper eingebrachten koloniebildenden Einheiten (KBE) in den Testanschmutzungen der zweiten Versuchsreihe. Der Median liegt bei ca. 9,5 $\log_{10}$ und ist leicht nach unten verschoben. 50 % der gewonnenen Werte liegen ca. zwischen 9,4 $\log_{10}$ und 9,7 $\log_{10}$. Ausreisser und Extremwerte liegen nicht vor, das Maximum liegt bei ca. 9,9 $\log_{10}$, das Minimum ca. bei 9,3 $\log_{10}$.

Die KBE der Spüllösungen, die mit 50 ml 0,9%-iger NaCl-Lösung, 20 ml 0,9%-iger NaCl-Lösung mit 5-maligem Aspirieren sowie mit 50 ml 0,9%-iger NaCl-Lösung mittels Infusomat® mit konstantem Druck und 50 ml 0,9%-iger NaCl-Lösung durch Sog gewonnen wurden, sind in Abb. 4.4 dargestellt. Die Mediane liegen bei ca. 8,6 $\log_{10}$ (50 ml NaCl), 8,7 $\log_{10}$ (20 ml NaCl), 8,3 $\log_{10}$ (Infusomat®) und 8,7 $\log_{10}$ (Sog). Bei Einsatz der vier Spültechniken schwanken die Mediane lediglich um ca. 0,4 $\log_{10}$-Stufen. Ausreisser und Extremwerte liegen nicht vor.

Zu erkennen ist, dass die Rückgewinnung mit jeder Spültechnik nur geringe Unterschiede aufweist:

1. 50 ml NaCl: 90,5%
2. 20 ml NaCl: 91,5%
3. Infusomat: 87,4%
4. Sog: 91,5%

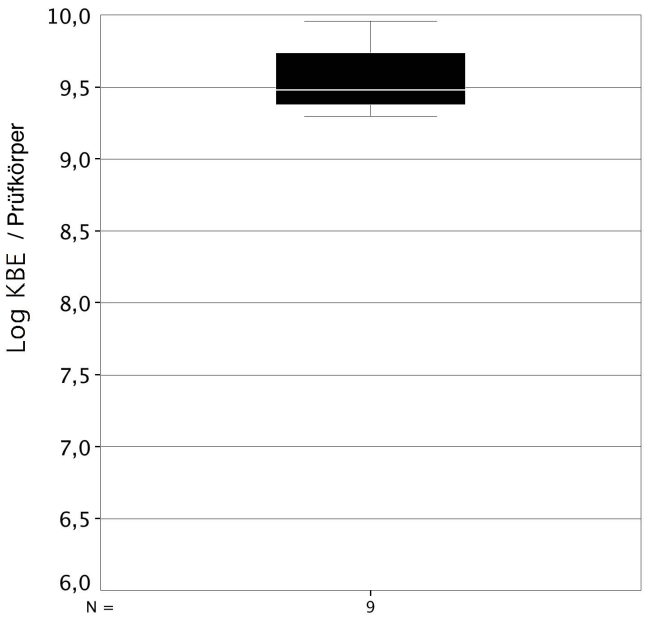

Abbildung 4.3: Anzahl der koloniebildende Einheiten (KBE) von *P. aeruginosa* in den Prüfkörpern der zweiten Versuchsreihe, log-Darstellung als Boxplot, N=9.

Abb. 4.5 zeigt die Höhe der Rückgewinnung von KBE bei Spülung mit insgesamt 50 ml einer 0,9%-igen NaCl-Lösung, jedoch in fünf Einzelspülungen mit je 10 ml. Die Mediane aus den rückgewonnenen KBE liegen bei der ersten und zweiten Spülung bei ca. 8,4 $\log_{10}$ und 7,1 $\log_{10}$, bei dritter und vierter Spülung jeweils bei ca. 7,0 $\log_{10}$ sowie bei fünfter Spülung bei 6,9 $\log_{10}$. Zu erkennen ist, dass die Rückgewinnung mit der ersten 10 ml-Spülung am höchsten ist.
Tabelle 4.2 zeigt die Interquartilsbereiche, Maxima und Minima der Boxplots bei Einsatz von verschiedenen Spültechniken. Zu erkennen ist, dass die Werte bei allen Spültechniken sehr wenig streuen, die Reproduzierbarkeit ist sehr hoch.

Im Vergleich zu der eingebrachten KBE-Anzahl beträgt die Rückgewinnung bei 50 ml 0,9%-iger NaCl-Lösung 90,5%, unter der mit 20 ml 0,9%-iger NaCl-Lösung mit Aspiration 91,6%, unter Spülung mit 50 ml 0,9%-iger NaCl-Lösung mittels Infusomat® 87,4% und unter Spülung mit 50 ml 0,9%-iger NaCl-Lösung unter Sog 91,6%. Die Rückgewinnung liegt bei den 10 ml-Einzelspülungen bei:

- 1. 10 ml: 88%

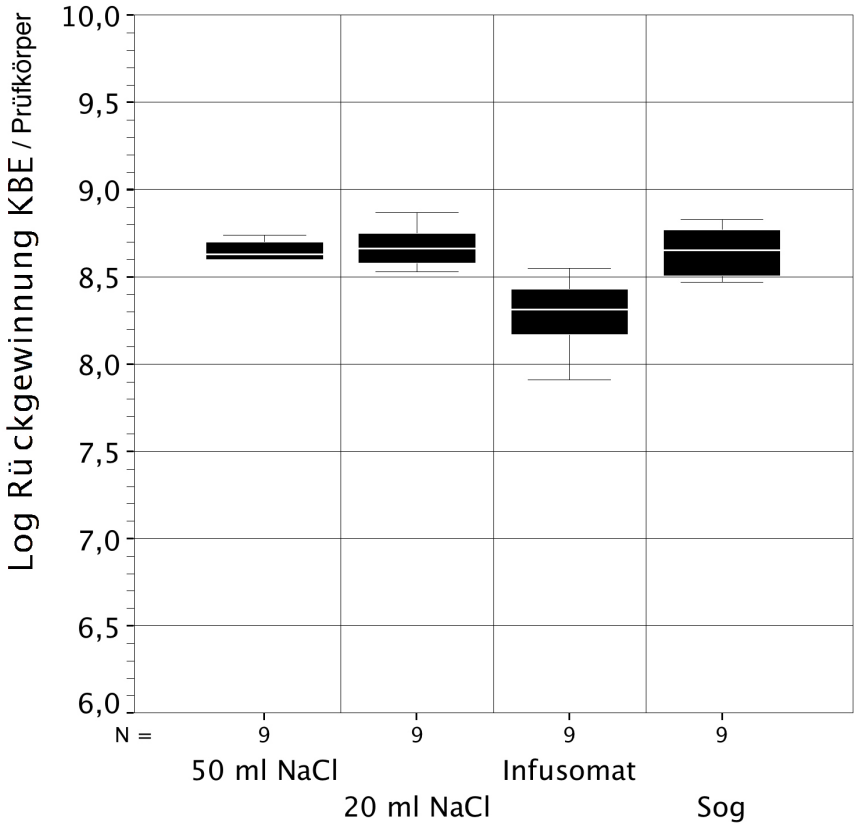

Abbildung 4.4: Rückgewinnung koloniebildender Einheiten (KBE) von *P. aeruginosa* in Abhängigkeit von verschiedenen Spültechniken: Spülung mit 50 ml 0,9%-iger NaCl-Lösung, 20 ml 0,9%-iger NaCl-Lösung mit 5 x Aspiration, 50 ml 0,9%-iger NaCl-Lösung mittels Infusomat®, 50 ml 0,9%-ige NaCl-Lösung mit Sog, log-Darstellung als Boxplot, N=36.

- 2. 10 ml: 75%
- 3. 10 ml: 74%
- 4. 10 ml: 73%
- 5. 10 ml: 72%

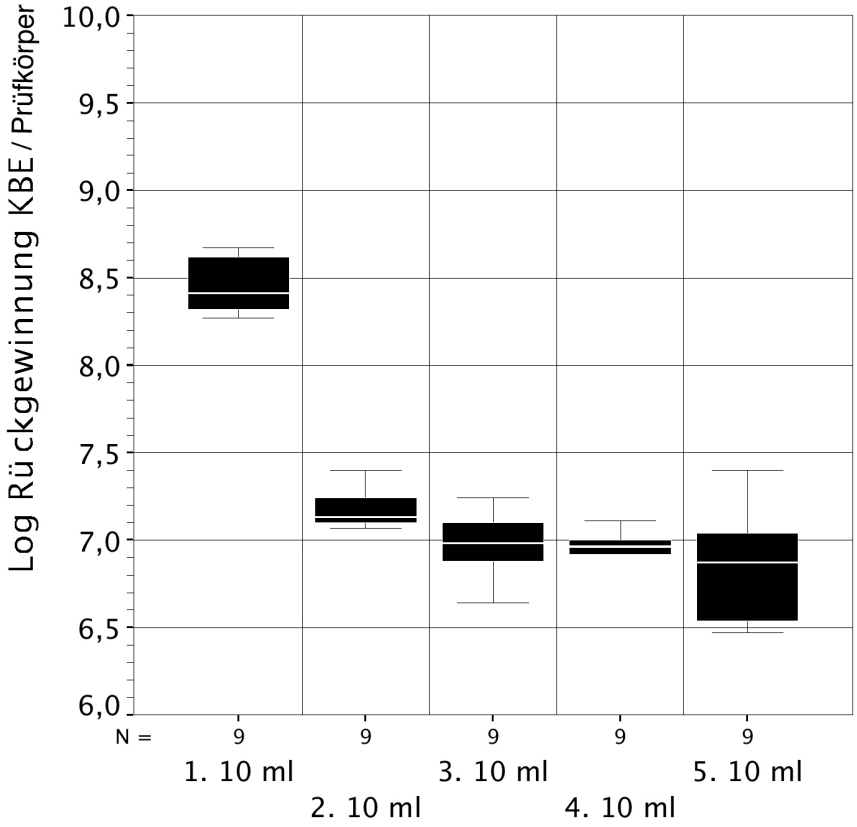

Abbildung 4.5: Rückgewinnung koloniebildender Einheiten (KBE) von *P. aeruginosa* in Abhängigkeit von verschiedenen Spültechniken: 5x10 ml 0,9%-iger NaCl-Lösung, log-Darstellung als Boxplot, N=45.

4.3 Überlebensverhalten von *P. aeruginosa* im Ultraschallbad

Zunächst wurde das Überlebensverhalten von *P. aeruginosa* im Ultraschallbad untersucht (siehe 2.2.7.2).

Tabelle 4.3 zeigt das Überlebensverhalten von *P. aeruginosa* im Ultraschallbad nach unterschiedlichen Beschallungszeiten, mit Doppelbestimmung der KBE. Die KBE/Platte zum Zeitpunkt Null liegen im ersten Versuch im Mittel bei 256, im zweiten bei 325 und im dritten bei 33. Die während des ersten Versuches gewonnenen KBE/Platte liegen

Tabelle 4.2: Interquartilsbereiche, Maxima und Minima der Boxplots in Abb. 4.4 und Abb. 4.5 bei Einsatz verschiedener Spültechniken: 50 ml NaCl, 20 ml NaCl, Infusomat, Sog, fünf Einzelspülungen mit je 10 ml NaCl, Werte in $\log_{10}$.

Spültechnik	Interquartil	Max.	Min.
50 ml NaCl	8,6-8,7	8,8	8,6
20 ml NaCl	8,6-8,8	8,9	8,5
Infusomat	8,2-8,4	8,8	7,9
Sog	8,5-8,8	8,9	8,4
1. 10 ml	8,3-8,6	8,7	8,3
2. 10 ml	7,1-7,3	7,4	7,1
3. 10 ml	6,9-7,1	7,3	6,6
4. 10 ml	6,9-7,0	7,1	6,9
5. 10 ml	6,5-7,0	7,4	6,5

Tabelle 4.3: Überlebensverhalten von *P. aeruginosa* im Ultraschallbad nach Beschallung von 0, 1, 2, 3, 5, 10, 15 Minuten, in koloniebildenden Einheiten/Platte (KBE/Platte), N=42.

Zeit im Ultraschallbad	KBE/Platte					
min.	1.Versuch		2.Versuch		3.Versuch	
0	243	269	322	327	31	35
1	252	254	315	309	39	30
2	237	229	350	342	26	37
3	265	254	325	312	24	33
5	265	279	335	350	24	33
10	279	261	379	327	28	38
15	255	260	340	357	30	32

zwischen 229 und 279 und schwanken um einen Mittelwert von 257, während des zweiten Versuchs liegen sie zwischen 309 und 379 und schwanken um einen Wert von 337 KBE/Platte. Im dritten Versuch schwanken sie zwischen 24 und 39 um einen Wert von 33 KBE/Platte.

Anhand der oben aufgezeigten Ergebnisse kann hieraus geschlossen werden, dass *P. aeruginosa* zu jedem gemessenen Zeitpunkt ein gutes Überlebensverhalten im Ultraschallbad zeigt und durch Ultraschall nicht abgetötet wird.

4.4 Spülung nach Einsatz der Ultraschallbehandlung

Nach erfolgtem Nachweis des Überlebens im Ultraschallbad erfolgte die Spülung nach Einsatz von Ultraschall für zehn Minuten. Die Kontrollprüfkörper wurden keiner Ultraschallbehandlung unterzogen. Die Prüfkörper wurden nach einstündiger, waagerechter Lagerung bei Raumtemperatur mit 50 ml einer 0,9%-igen NaCl-Lösung gespült.

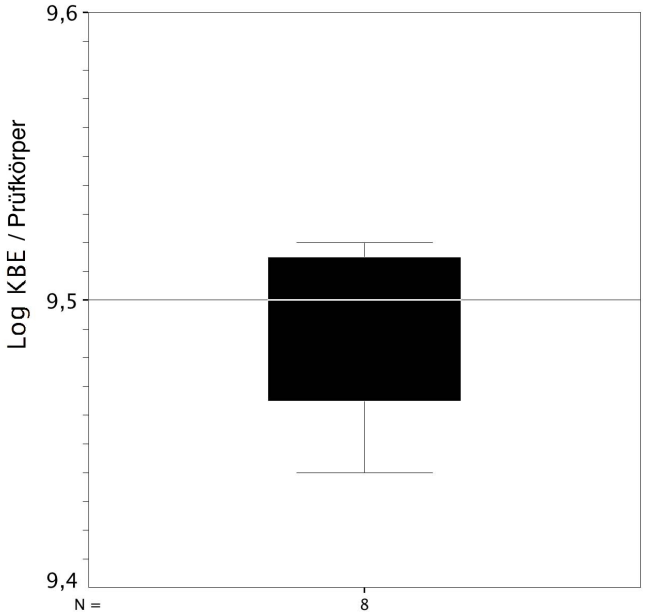

Abbildung 4.6: Anzahl der koloniebildende Einheiten (KBE) von *P. aeruginosa* in den Prüfkörpern der dritten Versuchsreihe, log-Darstellung als Boxplot, N=8.

Abblidung 4.6 zeigt *P. aeruginosa* in den Prüfkörpern der dritten Versuchsreihe. Der

Median der gewonnen Werte liegt bei ca. 9,5 $\log_{10}$ und ist leicht nach oben verschoben. Alle Werte liegen sehr dicht beieinander, Ausreisser und Extremwerte liegen nicht vor.

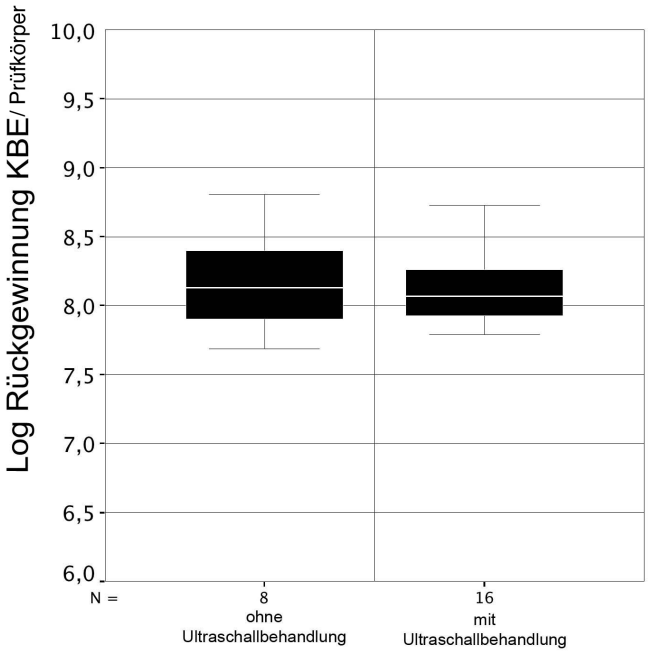

Abbildung 4.7: Rückgewinnung koloniebildender Einheiten (KBE) von *P. aeruginosa* bei acht Prüfkörpern ohne und 16 Prüfkörpern mit Ultraschallbehandlung, log-Darstallung als Boxplot, N=24

Abbildung 4.7 zeigt die Höhe der Rückgewinnung von *P. aeruginosa* bei acht Prüfkörpern ohne Ultraschallbehandlung (Kontrollprüfkörper) und 16 Prüfkörpern, die vor Spülung mit 50 ml 0,9%-iger NaCl-Lösung für zehn Minuten einer Ultraschallbehandlung unterzogen wurden. Der Median aus den rückgewonnenen KBE liegt bei den Kontrollprüfkörpern und den Prüfkörpern mit Ultraschallbehandlung bei ca. 8,1 $\log_{10}$. Die Rückgewinnung beträgt bei der Kontrolle und den Ultraschallprüfkörpern 85,3%. Erkennbar ist, dass eine Behandlung im Ultraschallbad für 10 Minuten keine höhere Rückgewinnung von KBE erbringt als die alleinige Spülung mit 50 ml 0,9%-iger NaCl-Lösung ohne Ultraschallbehandlung.

Tabelle 4.4 zeigt die Interquartilsbereiche, Maxima und Minima bei Einsatz der Ultraschallbehandlung für die Dauer von 10 Minuten. Die Werte ohne und mit Ultraschallbehandlung sind nahezu identisch.

Tabelle 4.4: Interquartilsbereiche, Maxima und Minima aus Abb. 4.7, Werte in $\log_{10}$.

Prüfkörper	Interquartil	Max.	Min.
ohne Ultraschall	7,9-8,4	8,8	7,9
mit Ultraschall	7,9-8,2	8,7	7,8

5 Diskussion

Die Aufbereitung von flexiblen Endoskopen ist seit der Zeit ihrer Entwicklung, spätestens jedoch nach Nachweis von endoskopassoziierten Infektionen Thema von vielen Arbeiten. Viele Literaturstellen zeigen auf, dass häufig die mangelnde initiale Reinigung, also die unmittelbare Aufbereitung nach dem endoskopischen Eingriff, Ursache für Infektionen war. Mit der Zeit wurde eine reproduzierbare, standardisierte Methode zur Qualitätssicherung der Aufbereitung von flexiblen Endoskopen gefordert. Diese liegt nun in Form der DIN ISO/TS 15883-5 [30] vor: sie behandelt Testanschmutzungen und Prüfverfahren zum Nachweis der Reinigungswirkung von Reinigungs-/Desinfektionsgeräten. In Anhang I wird als Testorganismus *Enterococcus (E.) faecium*, als Spüllösung sterile, physiologische Kochsalzlösung (0,9 %-iges NaCl) verwendet. *E. faecium* wird aufgrund seiner Hitzestabilität für die Untersuchungen verwendet. In dieser Arbeit wurden die Methoden und Materialen aus der DIN ISO/TS 15883-5 übernommen, statt *E. faecium* wurde *P. aeruginosa* verwandt und es wurden die Rückgewinnung mittels verschiedener Spüllösungen, Spültechniken und der Einsatz von Ultraschall zusätzlich untersucht. Eine Untersuchung hinsichtlich der Rückgewinnung von *E. faecium* ist Thema einer anderen Promotionsarbeit.
Da *P. aeruginosa* zur Biofilmbildung fähig ist, war dieses Bakterium von besonderem Interesse bei dieser Untersuchung. Wie die Literaturstellen aufzeigen, ist dieses Bakterium für eine Vielzahl von endoskopassoziierten Infektion mit einigen Todesfällen verantwortlich. Die Ursache für die Infektionen lagen in mangelhaft aufbereiteten Endoskopen jeder Art (Gastro-, Broncho- und Kolonoskopen), vornehmlich im initialen Reinigungsschritt, also bei der Entfernung der Biobelastung (Blut, Gewebereste, Schleim), und bei der Schlussspülung durch kontaminiertes Spülwasser.

5.1 Bewertung der Methode

Eine Testmethode zur Überprüfung der Reinigungs- und Desinfektionsleistung bei der Aufbereitung von flexiblen Endoskopen sollte verschiedene Aspekte berücksichtigen, unter anderem:

1. reproduzierbar
2. praxisnah
3. nicht aufwendig
4. zeitsparend
5. kostensparend
6. einfach auszuwerten

Mitte der 90er Jahre wurde in Deutschland ein Testmodell entwickelt bzw. angewendet, welches den Gesamtprozess der Aufbereitung validiert [16], dieses Testmodell wurde 2001 aktualisiert [17], mit der Forderung, dass der Gesamtprozess eine Reduktion von 9 log-Stufen (vorher 5 log-Stufen) aufweisen muss. Grund dafür war, dass bei Untersuchungen der Erregerbelastung KBE von 10^9 bis 10^{10} im Arbeits-, bzw. Biopsiekanal nachgewiesen wurde und somit der Reinigungsprozess bei der Gesamtaufbereitung eine Schlüsselstelle besitzt [3].

5.1.1 Reproduzierbarkeit

Die Methode wurde analog zu der DIN ISO/TS 15883-5 [30] und zur Methode von Zühlsdorf [65] durchgeführt. In den Versuchen mit unterschiedlichen Spüllösungen sind die Ergebnisse hinsichtlich der Mediane sehr gut, zeigen aber in sich eine sehr hohe Streuung der Werte von vereinzelt mehr als einer log-Stufe. Bereits bei den Versuchen zur Spültechnik erkennt man eine sehr geringe Streuung der Werte bei der Spülung mit 50 ml 0,9%-iger NaCl-Lösung. Diese erste Spülung bei den Versuchen mit unterschiedlichen Spültechniken repräsentiert eine Reproduzierbarkeitskontrolle. Sie wurde nicht an dem gleichen Versuchstag durchgeführt, aber auf die gleiche Art und Weise. Die geringe Streuung der Werte bei den anderen Versuchen zeigen ebenso die gute Reproduzierbarkeit der Methode nach einer gewissen Lernphase.

5.1.2 Testanschmutzung

Grundlage für die Entwicklung von Reinigung- und Desinfektion sowie deren Arbeitsabläufen ist eine Testmethode mit einer geeigneten Testanschmutzung [50]. Bei endoskopischen Eingriffen kommen die Instrumente je nach Art und Umfang mit mehr oder weniger viel Blut, Stuhl, Gewebe und Schleim, also mit potentiell infektiösem Material, in Verbindung. Dieses Material verbleibt zum großen Teil in den Arbeits-/Biopsiekanälen von flexiblen Endoskopen. Gerade Blut stellt, nach Gerinnung, ein besonderes infektionsübertragendes Medium dar; nach Einleitung der Gerinnung bildet sich u.a. ein wasser-unlösliches Fibrinnetz. Die darin enthaltenen Infektionserreger sind somit eingeschlossen und entziehen sich möglicherweise einer Reduktion durch Reinigung und Desinfektion, wenn nicht sogar einer Sterilisation. Gerade wegen der Praxisnähe sollte die Testanschmutzung Vollblut sein. Serum alleine reicht für eine optimale Anschmutzung alleine nicht aus, da es kein Fibrinogen enthält. Die von Pfeifer et al. [50] publizierte Testanschmutzung führte in den Prüfkörpern zu keiner ausreichenden Koagulation, im Vergleich zu Schafblut [65]. Der Schwierigkeitsgrad einer Reinigung sollte so hoch sein, dass er möglichst praxisnah ist. Im Grunde heisst dies, dass eine 100%-ige Rückgewinnung der Testanschmutzung bzw. der darin enthaltenden Bakterien mit dem ersten Reinigungsschritt nicht möglich sein darf.

Bemängelt muss allerdings werden, dass es nach Inokulation von Schafblut mit Protamin zwar zu einer Blutgerinnung, also zu einem der Praxisnähe hilfreichen und notwendigen Effekt kam, jedoch nach unterschiedlichen Zeiten (zwischen 9 und 10 Minuten). Dies macht deutlich, dass Blut als einziger Faktor schwer standardisierbar ist, da es durch unterschiedliche Faktoren (Krankheit des Tieres, Exsikkose, u.a) zu einer unterschiedlichen Zusammensetzung und somit möglicherweise unterschiedlicher Dauer der Gerinnung kommen kann. Zühlsdorf bemerkte in ihrer Arbeit diesbezüglich einen erhöhten Kraftaufwand beim Durchspülen der Prüfkörper, wenn die Blutgerinnung länger als 15 Minuten andauerte [65]. In dieser Arbeit wurde diese Korrelation nicht untersucht, entspricht jedoch dem subjektiven Eindruck beim Spülen der Prüfkörper in dieser Arbeit.

5.1.2.1 Bemerkung zur Entwicklung einer Testanschmutzung

Die in der DIN ISO/TS 15883-5 [30] dargestellten verschiedenen Testanschmutzung machen deutlich, wie kontrovers das Thema einer standardisierten Testanschmutzung ist. De Bruijn et al. [11] zeigen anschaulich die für verschiedene Länder geltenden Test-

anschmutzungen auf und demonstrieren zusätzlich tabellarisch die Vor- und Nachteile. Dabei nennen sie u.a. Voraussetzungen für eine ideale, standardisierte Testanschmutzung:

- Äquivalenz zu den Anschmutzungen, mit denen das Medizinprodukt im normalen Gebrauch wahrscheinlich kontaminiert ist.
- Resistenz gegenüber dem Reinigungsprozess, jedoch nicht zu ausgeprägt - also nicht einfach, aber auch nicht zu schwer zu entfernen und damit eine realistische Herausforderung für den Reinigungsprozess.
- Verzicht auf Materialien biologischen Ursprungs (Tier- oder Menschenblut), damit die Übertragung von Zoonosen oder menschlichen Krankheiten (wie Viren, BSE, CJK) vermieden wird.
- Benutzer-, Waschmaschinen- und Umweltfreundlichkeit.
- Nachweisbarkeit auch in sehr kleinen Mengen, also als Rückstände der Testanschmutzung nach der Reinigungsstufe des Prozesses.

De Bruijn et al. favorisieren nach eigenen Untersuchungen eine Testanschmutzung aus Eigelb; dabei waren die Prüfkörper einfache Edelstahlplättchen, die mit Eigelb kontaminiert wurden. In seinen Ausführungen wird dabei allerdings nicht darauf eingegangen, inwiefern sich das Eigelb beim Einsatz in reellen Instrumenten und bei bakterieller Belastung verhält [2]. Eine optische Reinheit könnte zwar dokumentiert werden, jedoch fehlt die Reduktion der biologischen Materialien und der Belastung. Auch ein Vergleich zur Interaktion von Bakterien mit biologischem Material wird nicht erwähnt. Die in dieser Arbeit verwendete Testanschmutzung erfüllt hingegen überwiegend alle o.g. Kriterien einer standardisierten Testanschmutzung. Eine Übertragung von Zoonosen und/oder menschlichen Krankheiten wurde bisher nicht untersucht und ist auch unbekannt. Sie sollte aber in heutiger Zeit relativ unwahrscheinlich sein, da bei der Arbeit mit Tieren einerseits, aber auch beim Arbeiten mit Blut oder Blutbestandteilen gewisse Sicherheitsrichtlinien gelten. Eine Arbeit über die Validierung einer künstlichen Testanschmutzung ATS von Alfa et al. [3] beschreibt eine standardisierte Herstellung einer Testanschmutzung bestehend aus Proteinen, Hämoglobin, Kohlenhydraten, anorganischen Salzen, sowie Endotoxinen und unterschiedlichen Bakterien.

5.1.3 Testorganismus

Im Vergleich zum hitzestabilen *E. faecium* ist *P. aeruginosa* zur Biofilmbildung fähig (siehe 5.1.3.1 und Abbildung 5.1) und ist somit gerade bei der Reinigung von flexiblen Endoskopen interessant. Die HYGEA-Studie von Bader et al. [26] identifizierte *P. aeruginosa* als Indikatororganismus für eine mögliche Testmethode, da u.a. viele die in der Literatur beschriebenen Infektion auf *P. aeruginosa* zurückzuführen waren. Problem einer Testanschmutzung mit nur einem Erreger spiegelt jedoch einerseits nicht die wahre Kontamination wider, auch gibt es keine Information hinsichtlich der Interaktionen (Hemmungen) der Erreger untereinander.

5.1.3.1 Biofilmbildung

Die Biofilmbildung von *P. aeruginosa* wird in verschiedenen Literaturstellen erwähnt [6, 19, 37]. Der Biofilm kann als Ansammlung von Mikroorganismen, die irreversibel an Oberflächen anhaften und extrazelluläre Polymere bilden können, definiert werden [37]. Die eingebetteten Mikroorganismen kommunizieren (Zell-Zell-Komunikation) hierbei über Gentransfer oder über Signalmoleküle. Voraussetzung ist jedoch eine hohe Dichte an Mikroorganismen. Bereits nach Ansiedelung der Bakterien an eine Oberfläche werden Gene aktiviert, die die Biofilmbildung steuern bzw. einleiten. Nach Ansiedelung kommt es zur Teilung und durch Gentransfer zur Kommunikation der Bakterien untereinander mit der Ausbildung eines ersten Biofilmes innerhalb von Minuten, der in seinem Anfangsstadium teilweise noch fortgeschwemmt werden kann und so zu sekundären Biofilmkolonien führt. Der Biofilm wird von Mikroporen durchsetzt, die Bakterien einerseits mit Nährstoffen versorgen und andererseits die Abfallstoffe abtransportieren [64]. Dabei sind Biofilme in Medien mit hohen Flussgeschwindigkeiten in ihrer Dehnungsfestigkeit stabiler und umgekehrt und dadurch in ihrer Anhaftungsfestigkeit beeinflusst. [19]. Abbildung 5.1 zeigt einerseits den schematischen Aufbau eines Biofilms mit Wasserporen und Flüssigkeitsdurchfluss und andererseits eine Rastelektronische Aufnahme einer Metalloberfläche eines Wassersystems mit anhaftendem Biofilm.

5.1.4 Prüfkörper

In dieser Arbeit wird als Prüfkörper 2 m lange und 0,2 cm im Innendurchmesser messende Polytetrafluorethylen (PTFE) -Schläuche (Spec. C929.3 Lot. No. TS 0301249 C1, Order

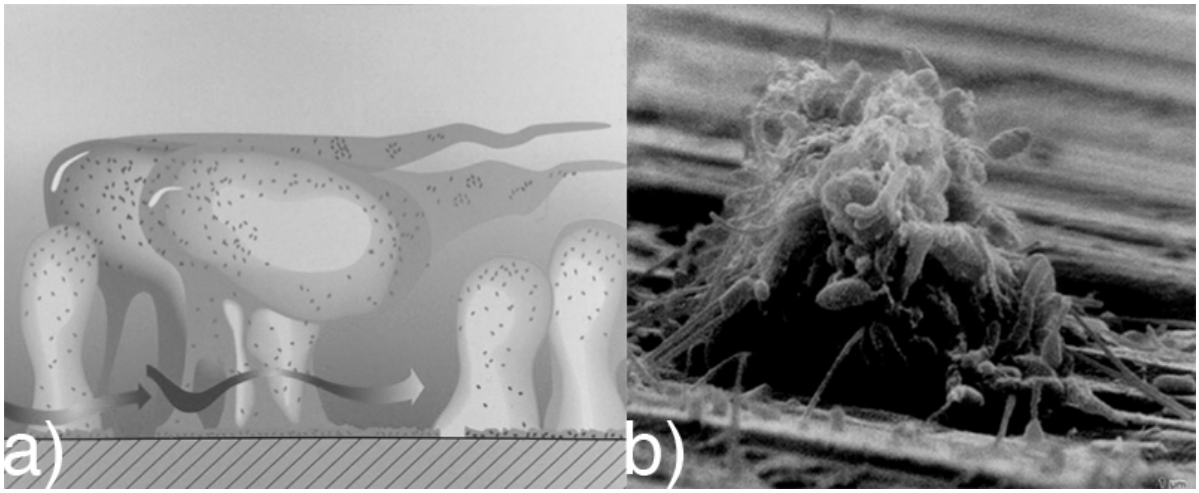

Abbildung 5.1: a) schematische Darstellung eines Biofilms auf einer glatten Oberfläche. Copyright Center for Biofilm Engineering, Montana State University, Bozeman, Mont., b) Rasterelektronische Aufnahme eines Biofilms auf einer Metalloberfläche eines Wassersystems. Copyright American Society for Mikrobiology. CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS, Apr. 2002, p. 167–193.

No. 1265, Fa. Deutsch und Neumann) mit einem Volumen von 6,3 ml verwendet. Nach dem Medizin-Produkte-Gesetz (MPG) und der Medizinprodukte-Betreiber-Verordnung (MPBetreibV) ist der gesamte Prozess der Aufbereitung mit validierten Testverfahren so durchzuführen, dass der Erfolg des Verfahrens gewährleistet ist. Zu diesen geeigneten Verfahren gehört die Verwendung eines standardisierten Prüfkörpers [30], wie ihn die eingesetzten PTFE-Schläuche darstellen können. Sie simulieren die Arbeits-/Biopsiekanäle flexibler Endoskope einerseits, andererseits bestehen die inneren Kanäle flexibler Endoskope aus PTFE. Vorteil der Prüfkörper ist der Einmal-Gebrauch; es herrschen immer gleiche Ausgangsbedingungen, wobei genau dies zu erhöhten Kosten führt. Vorteilhaft ist, dass zusätzlich zur mikrobiellen Rückgewinnung auch noch die optische Sauberkeit beurteilt werden kann. In dieser Arbeit wurde dies jedoch nicht weiter validiert. Korrelationen zwischen optischer Sauberkeit der Prüfkörper und Reduktion von *P. aeruginosa* wurden nicht untersucht. Der Einsatz von unterschiedlichen Endoskopen als Prüfkörper ist aus Praktikabilitäts- und Kostengründen sicherlich nicht sinnvoll. Weiterhin gibt es mehrere Hersteller, die untereinander, aber auch innerhalb, verschiedene Baureihen bzw. einen unterschiedlichen Aufbau der Endoskope aufweisen. Hierbei wäre eine Standardisierung einer Prüfmethode denkbar schwierig, oder würde den Rahmen in jeglicher

Hinsicht sprengen. Jedoch wäre eine separate Prüfmethode, bzw. ein separater Prüfkörper für Feinmechanik, Bowdenzugkanal, o.ä. zukünftig sinnvoll, da hier auch Quellen einer Infektionsübertragung liegen können. Die Hersteller sind jedoch jetzt schon bemüht und bieten Geräte an, die zum Beispiel gänzlich geschlossene Systeme anbieten; lediglich der Arbeitskanal des Endoskopes, sowie die Anschlüsse und Düsen der Luft- und Wasserkanäle sind noch offen.

5.1.4.1 Anforderung an die Aufbereitung

Da flexible Endoskope über ein weitreichendes Kanalsystem verfügen (siehe Abb.1.3), kann dieses durch z.B. Gewebereste oder Blut weiter eingeengt oder sogar verlegt werden. Die anschließende Verbringung in ein Reinigungs- und Desinfektionsgerät ohne Einzelkanalanschluß und Durchgängigkeitsprüfung kann dazu führen, dass die Blockade vom Gerät nicht erkannt wird und somit die Reste im Kanal verbleiben. Resultat ist ein nicht adäquat aufbereitetes und ggf. nicht richtig funktionierendes Endoskop. Die Blockade würde vom Gerät auch nicht erkannt, da die Reinigungs- und Desinfektionsmittellösungen den Weg des geringsten Widerstandes folgen und somit die Lösung entweder zurückfließt, über einen anderen Kanal abläuft, oder sogar, bei bereits bestehenden Undichtigkeiten, zu weiteren Defekten bis hin zum Ausfall der elektronischen Bauteile führt. Gefordert wird also demnach ein Einzelkanalanschluß, mit dadurch resultierender separater Dichtigkeits- und Druckkontrolle.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

In dieser Arbeit waren für die Untersuchung der Rückgewinnung und Reduktion von KBE fünf verschiedene Spüllösungen vorgesehen. Bei der Versuchsauswertung nach den ersten Versuchen stellte sich jedoch bei der Auswertung heraus, dass bei der Verwendung von 1%-iger SDS-Lösung kein Bakterienwachstum vorhanden war. Der Ausschluß von Methodikfehlern führte zu dem Schluss, dass 1%-ige SDS-Lösung zu einem vollständigen Absterben von *P. aeruginosa* führte. Auch der Neuansatz von 1%-iger SDS-Lösung sowie die Wiederholung der Versuchsreihe und unterschiedliche Blutchargen brachten keine Änderung des Ergebnisses. Aufgrund dessen wurde bei den weiteren Versuchen auf den Einsatz von 1%-iger SDS-Lösung verzichtet. Einzig die optische Sauberkeit konnte beim Einsatz von 1%-iger SDS-Lösung beurteilt werden. Hinsichtlich dieser kann die Aussage getroffen werden, dass 1%-ige SDS-Lösung zu einer fast vollständigen Ausspülung

der im Prüfkörper verbliebenen Testanschmutzung führt. Die durch die Spülung gewonnene Probe unterschied sich hinsichtlich der Farbe ebenfalls deutlich von den übrigen Proben dahingehend, dass sich die gewonnene Probe bräunlich färbte. Hagelueken et al. [23] berichten jedoch über die Fähigkeit von *P. aeruginosa* SDS-Lösungen mithilfe einer Sulfatase zu verstoffwechseln. In der Arbeit von Hagelueken et al. wird jedoch nicht auf die Konzentration der SDS-Lösung eingegangen. Offensichtlich spielt hier der Bakterienstamm eine Rolle, ob das Bakterium in der SDS-Lösung überlebt.

5.2.1 Der Einsatz verschiedener Spüllösungen

Der Einsatz verschiedener Spüllösungen zeigte, dass es keine nennenswerten Unterschiede hinsichtlich der KBE-Rückgewinnung gibt. Aus Praktikabilitäts-, Verarbeitungs- und Kostengründen ist der 0,9%-igen NaCl-Lösung, der Vorzug gegeben. Die Ergebnisse der ersten Versuchsreihe zeigen eine relativ große Streuung, vor allem bei Einsatz von 50 ml 0,9%-iger NaCl-Lösung und CSB + Enthemmersubstanzen. Dies würde eine schlechte Reproduzierbarkeit zeigen. Beim retrospektiven Betrachten der einzelnen Versuchstage anhand der Protokolle zeigt sich, dass zu Beginn der Versuchsreihe durch noch nicht etabliertes Arbeiten, also Schwierigkeiten mit dem reibungslosen Ablauf des Versuchsablaufes, also der Methode an sich, die Rückgewinnung eher im unteren Bereich lag, jedoch die Ergebnisse im Vergleich zu den anderen Spüllösungen am selben Tag in sich schlüssig waren und an den Schlussfolgerungen zum Einsatz der Spüllösung nichts ändern. Die KBE aller Versuche wurden zur Auswertung herangezogen. Zu sehen ist, dass man bei einer solchen Methode zunächst, bevor man validiert, die Methode sicher beherrschen muss. Weiterhin zeigen die Ergebnisse, dass die eingebrachten KBE in den Prüfkörpern den Anforderungen der DIN ISO/TS 15883-5 [30] entsprechen und es nach Spülung mit unterschiedlichen Lösungen zur einer Rückgewinnung, also Reduktion von ca. 8,5 log-Stufen. Interessant ist hierbei sicherlich die Höhe der Rückgewinnung in Anbetracht der Tatsache mit wie einfachen Mitteln und Methoden dies erreicht werden konnte, unabhängig vom Einsatz unterschiedlicher Spüllösungen.

5.2.2 Der Einsatz verschiedener Spültechniken

Die Anzahl der KBE in den Prüfkörpern ist nahezu identisch mit der Anzahl der KBE in den Prüfkörpern der ersten Versuchsreihe. Hier zeigt sich eine gute Praktikabilität und Reproduzierbarkeit der Methode. Die Ergebnisse beim Einsatz verschiedener Spültechni-

ken zeigen zunächst einmal eine insgesamt sehr geringe Streuung der Werte (siehe Abb. 4.4, Abb.4.5). Weiterhin auffällig ist eine widerum gute Rückgewinnung der KBE, die sich innerhalb einer log-Stufe, zwischen 8 $\log_{10}$ und 9 $\log_{10}$ befindet. Auffällig ist lediglich die geringere Rückgewinnung der KBE beim Einsatz des Infusomaten®, welcher im Vergleich zu den anderen Techniken sicherlich den geringsten Druck zur Überwindung der Blutkoagel und somit zur eigentlichen Rückgewinnung aufbauen konnte. Auch der Einsatz einer Sog-Pumpe zeigte am Manometer der Pumpe, dass unterschiedliche Unterdrücke zur Überwindung des Widerstandes erforderlich waren; die Ergebnisse zeigten jedoch nahezu identische Werte beim Einsatz von 50 ml 0,9%-iger NaCl-Lösung, sowie 20 ml 0,9%-iger NaCl-Lösung mit fünf-mailger Aspiration. Lediglich die Streuung ist etwas höher, was widerum für die unterschiedlich notwendigen Drücke, bzw. Sog spricht. Der Einsatz des Infusomaten® sowie der Sog-Pumpe ist nach Auswertung und bei der retrospektiven Betrachtung hinsichtlich Praktikabilität sicherlich nicht der Vorzug zu geben und kann als nicht sinnvoll betrachtet werden. Bei den Ergebnissen aus den Einzelspülungen mit je 10 ml 0,9%-iger NaCl-Lösung, dass bereits mit der ersten Spülung die Reduktion, bzw. die Rückgewinnung nahezu gleich der Reduktion und Rückgewinnung wie bei Einsatz von 50 ml 0,9%-iger NaCl-Lösung durch den Infusomaten® ist. Es reichen also bereits 10 ml 0,9%-ige NaCl-Lösung um die KBE im Prüfkörper um 88% zu reduzieren. Das entspricht einer Reduktion von 8,4 log-Stufen. Da die Hauptarbeit bei der Probengewinnung darin lag, die koagulierte Blut-Bakteriensuspension aus dem 2 m langen PTFE-Schlauch herauszuspülen, lag die Vermutung nahe, dass der überwiegende Anteil an KBE im Blut-Bakterienkoagel zu finden ist. Bei einer Länge von 2 m und einem Durchmesser von 0,2 cm liegt das Volumen des eingesetzten Prüfkörpers bei 6,28 ml. Da mit 10 ml gespült wurde und mit diesen auch nahezu der gesamte lösbare Koagel aus dem Schlauch entfernt wurde, ist das Ergebnis mit der ersten 10 ml Spülung hervorragend. Bei Einsatz von 10 ml 0,9%-iger NaCl-Lösung verbleiben immernoch 3,72 ml, die den Schlauch frei von Koagel passieren. Da mit der ersten Spülung nahezu der gesamte lösbare Koagel entfernt wurde, brachten weitere vier Spülungen mit 10 ml 0,9%-iger NaCl-Lösung keinen nennenswerten Zuwachs der KBE-Reduktion, bzw. -Rückgewinnung. Die dennoch rückgewonnenen Mengen an KBE rühren wahrscheinlich von, an der lumenseitigen Blut-Koagel-Oberfläche, haftenden Bakterien. Selbst mit wiederholten Spülungen konnten Koagel die mit der ersten Spülung nicht entfernt worden waren, nicht beseitigt werden. Da die Lagerungsdauer vor Spülung eine Stunde betrug, kann zusätzlich davon ausgegangen werden, dass durch Interaktion von *P. aeruginosa* mit der PTFE-Oberfläche und dem Blut ein, mit der Spüllösung nicht zu entfernender,

Biofilm enstanden war [5].

5.2.3 Überlebensverhalten von *P. aeruginosa*

Die Untersuchungen zum Überlebensverhalten von *P. aeruginosa*, nach Nachweis der Wirksamkeit des Ultraschalls im Reagenzglas (siehe 2.2.7.1), zeigen, dass zu den angegebenen Zeitpunkten kein Absterben stattfand. Somit konnte ein weiterer Parameter, der Einsatz des Ultraschalls vor Rückgewinnung, bzw. Spülung, etabliert und untersucht werden.

5.2.4 Der Einsatz von Ultraschall

Die Versuche beim Einsatz von Ultraschall mit Untersuchung von acht Kontrollprüfkörpern ohne Ultraschallbehandlung zeigen zweierlei Aspekte der angewandten Methoden. Einerseits bringt der Einsatz von Ultraschall im Vergleich zur Spülung ohne vorherigen Einsatz keinen Vorteil. Auch waren die Prüfkörper nach Beschallung optisch nicht sauberer. Hinsichtlich der Beschallungsdauer von zehn Minuten kann gesagt werden, dass diese Zeit als durchaus ausreichend für eine Behandlung mit Ultraschall erachtet werden kann. Die Untersuchungen zur Wirksamkeit des Ultraschalls im Reagenzglas zeigten bereits bei kurzen Ultraschalleinwirkzeiten von nur fünf Minuten eine fast vollständige Perforation der Aluminiumfolie (siehe 2.2.7.1). Im Alltag wäre diese Zeitdauer und der Einsatz von Ultraschall an sich bei der Aufbereitung sicherlich praktikabel, jedoch nach diesen Ergebnissen nicht erforderlich, bzw. würde keine Besserung der Aufbereitung erbringen. Der zweite Rückschluss aus den Ergebnissen ist, dass die Methode zur Spülung der Prüfkörper mit 50 ml 0,9%-iger NaCL-Lösung gut durchführbar und reproduzierbar ist. Betrachtet man die Mediane aus den einzelnen Versuchsreihen, so schwanken diese um maximal 0,3 log-Stufen. Obwohl der Nachweis der Wirksamkeit des Ultraschall im Reagenzglas erbracht wurde, so bleibt noch zu untersuchen, ob der Ultraschall im PTFE-Schlauch wirkt. Aus technischen Gründen wurde dies in dieser Arbeit nicht weiter verfolgt.

5.3 Zusammenfassung der Schlussfolgerungen aus den Versuchsreihen

Aus den Ergebnissen und Schlussfolgerungen der 3 Versuchsreihen und aus den Ergebnissen zum Überlebensverhalten von *P. aeruginosa* läßt sich Folgendes zusammenfassen: Nach Untersuchung der verschiedenen Spüllösungen und Spültechniken ist aus Kosten-, Praktikabilitäts- und Verarbeitungsgründen der 0,9%-igen NaCl-Lösung und das einmalige manuelle Spülen mit 50 ml mit anschließendem Durchblasen des Prüfkörpers mit 2x50 ml Luft mittels Blasenspritze der Vorzug zu geben. Zwar bringt das einmalige Spülen mit 10 ml 0,9%-iger NaCl-Lösung eine fast ebenso gute KBE-Reduktion, jedoch liegt sie mit 88% Reduktion niedriger als beim Einsatz von 50 ml 0,9%-iger NaCl-Lösung mit knapp über 90%. Der Einsatz eines Infusomaten®, bzw. einer Sog-Pumpe ist nicht sinnvoll, da inkonstante Drücke zur Überwindung des Widerstandes, hervorgerufen durch anhaftende Koagel, zu beobachten waren. Nach Etablierung der Methode zum Überlebensverhalten von *P. aeruginosa* zeigten die Ergebnisse beim Einsatz von Ultraschall keine Vorteile, sodass die bei den untersuchten Parametern der Einsatz des Ultraschall unter den gegebenen Bedingungen nicht zum Einsatz bei der Aufbereitung kommen sollte.

6 Zusammenfassung

Die Aufbereitung von flexiblen Endoskopen spielt in der heutigen Zeit eine entscheidende Rolle. Das Auftreten von HIV in den 80er Jahren, sowie das der Prionerkrankungen in den 90er Jahren machen klar, dass im Laufe der Zeit sicherlich nicht mit einem Rückgang von Infektionserregern zu rechnen ist, eher mit einer Zunahme. Bei der Aufbereitung flexibler Endoskope spielt die Maßnahme der Reinigung, mit dem Beginn bereits unmittelbar nach der Untersuchung, die Schlüsselrolle. Die Richtlinien des RKI sowie die Entwicklung einer Norm machen deutlich, wie wichtig und nötig es geworden war eine standardisierte Aufbereitung und Prüfmethode zu entwickeln, bei bis dato unterschiedlichen Herangehensweisen.
Die vorliegende Arbeit sollte in Anlehnung an die DIN ISO/TS 15883-5 zeigen, wie hoch die Rückgewinnung von *P. aeruginosa* in Bezug auf verschiedene Parameter war und untersuchen, inwieweit die durchgeführte Methode reproduzierbar und somit für eine Validierung des Aufbereitungsprozesses geeignet ist. Dabei wurden entsprechend der ISO 15883 Prüfkörper mit heparinisiertem Schafblut und, entgegen der Norm, mit *P. aeruginosa* kontaminiert. Nach einer Einwirkzeit von einer Stunde wurden Proben auf unterschiedliche Art und Weise gewonnen. Dabei wurden zunächst unterschiedliche Spüllösungen, anschließend unterschiedliche Spültechniken und zum Schluss der Einsatz und die Rückgewinnung unter Zuhilfenahme von Ultraschall untersucht. Nach Gewinnung der Proben wurden diese zunächst auf Nährböden kultiviert, anschließend ausgewertet und protokoliert.
Nach Beginn der Versuche konnte eine Spüllösung (1%-ige Sodium-Dodecyl-Sulfat-Lösung) zur weiteren Durchführung nicht mehr verwendet werden, da es zu einem Absterben des Testorganismus gekommen war. Die weiteren Ergebnisse zeigten hinsichtlich der Rückgewinnung jedoch interessante Aspekte, einerseits bei der Rückgewinnung, andererseits durch aufgetretene Probleme und Fragestellungen für weitere Untersuchungen.
Die Ergebnisse der Untersuchungen mit unterschiedlichen Spüllösungen zeigten keine signifikanten Unterschiede, jedoch machen sie klar, dass die einfache Spülung mit 50 ml steriler 0,9%-iger NaCl-Lösung eine Rückgewinnung von *P. aeruginosa* von ca. 90%

bringt.
Die Ergebnisse der Untersuchungen mit unterschiedlichen Spültechniken zeigten hingegen mehrere interessante Aspekte:
Der Einsatz technischer Hilfsmittel bei der Rückgewinnung (hier der Infusomat® und die Sog-Pumpe) führen einerseits zu einer geringeren Rückgewinnung von unter 8,5 $\log_{10}$ und zu einer höheren Streuung der Werte im Falle des Infusomaten®, andererseits im Falle der Sog-Pumpe zu einer höheren Streuung bei guter Rückgewinnung. Auffallend und gleichzeitig überraschend ist die sehr hohe Rückgewinnung bei einer einzigen Spülung mit 10 ml 0,9%-iger NaCl-Lösung von 88%, entsprechend 8,6 $\log_{10}$.
Der Einsatz von Ultraschall war hingegen ernüchternd und brachte keine neuen Aspekte oder gar eine höhere Rückgewinnung von *P. aeruginosa*. Für weitere Untersuchungen und mögliche Standardisierungen ist der Einsatz von 50 ml steriler 0,9%-iger NaCl-Lösung mit einmaliger Spülung und anschließendem Durchblasen mit 2x50 ml Luft eindeutig der Vorzug zu geben. Die Prüfmethode ist für eine Prozess-Validierung in der hier beschriebenen Form anwendbar.

Abbildungsverzeichnis

1.1 Schema der Aufbereitung flexibler Endoskope (siehe 1.1) nach der Empfehlung des RKI. 14
1.2 Aufbau eines flexiblen Endoskopes (Duodenoskop) mit Darstellung von Versorgungsstecker, -schlauch, Kontrollkörper, Einführschlauch und distalem Ende (mit freundlicher Genehmigung der PENTAX Europe GmbH, Hamburg, Deutschland). 17
1.3 Schematischer Aufbau eines flexiblen Endoskopes mit Darstellung von Versorgungsstecker, -schlauch, Kontrollkörper, Einführschlauch und distalem Ende sowie innenliegenden Luft- und Wasserkanälen (mit freundlicher Genehmigung der PENTAX Europe GmbH, Hamburg, Deutschland). 18
1.4 Aufbau des Versorgungssteckers eines flexiblen Endoskopes mit Darstellung von Lichtleiterstecker, Anschlüssen für Absaugung, Luft- und Wasserzufuhr (mit freundlicher Genehmigung der PENTAX Europe GmbH, Hamburg, Deutschland). 19
1.5 Aufbau des Kontrollkörpers eines flexiblen Endoskopes mit Darstellung der Öffnung des Arbeitskanals, Abwinkelunshebel/Fernbedienungstasten sowie Ventilöffnungen (mit freundlicher Genehmigung der PENTAX Europe GmbH, Hamburg, Deutschland). 19
1.6 Aufbau des distalen Endes eines flexiblen Endoskopes mit Darstellung von Lichtleiter, Arbeitskanal (Biopsiekanal), Objektiv sowie Luft- und Wasserdüse; Aufsicht (mit freundlicher Genehmigung der PENTAX Europe GmbH, Hamburg, Deutschland). 20
1.7 Aufbau des Einführschlauches mit distalem Ende eines flexiblen Endoskopes. Darstellung des Wandaufbaus und der einzelnen innenliegenden Bestandteile (mit freundlicher Genehmigung der PENTAX Europe GmbH, Hamburg, Deutschland). 21

2.1 Vorbereitete Spüllösungen vor Versuchsbeginn, siehe 2.1.9 34

2.2 Phasen der Herstellung der Bakteriensuspension: a) Abschwemmen des Bakterienrasens, b) Abpipettieren, c) Vorbereiten der Lösungen zur Zentrifugation, d) Bodensatz nach Zentrifugation, siehe 2.2.2. 36
2.3 Anschmutzung der Prüfkörper mit Testanschmutzung, siehe 2.2.5 38
2.4 Lagerung der Prüfkörper nach Anschmutzung, siehe 2.2.5. 40
2.5 Aufbringen der verdünnten Proben auf CSA mittels Spiral-Plater 41

4.1 Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KBE) von *P. aeruginosa* in den Prüfkörpern der ersten Versuchsreihe, log-Darstellung als Boxplot, N=12. 46
4.2 Rückgewinnung koloniebildender Einheiten (KBE) von *P. aeruginosa* in Abhängigkeit von verschiedenen Spüllösungen: 0,9%-ige NaCl-Lösung, 0,9%-ige NaCl-Lösung + Tween 80 0,1%-ig, Caseinpepton-Sojamehlpepton-Bouillon (CSB) und CSB+Enthemmersubstanzen, log-Darstellung als Boxplot, N=48. 47
4.3 Anzahl der koloniebildende Einheiten (KBE) von *P. aeruginosa* in den Prüfkörpern der zweiten Versuchsreihe, log-Darstellung als Boxplot, N=9. 49
4.4 Rückgewinnung koloniebildender Einheiten (KBE) von *P. aeruginosa* in Abhängigkeit von verschiedenen Spültechniken: Spülung mit 50 ml 0,9%-iger NaCl-Lösung, 20 ml 0,9%-iger NaCl-Lösung mit 5 x Aspiration, 50 ml 0,9%-iger NaCl-Lösung mittels Infusomat®, 50 ml 0,9%-ige NaCl-Lösung mit Sog, log-Darstellung als Boxplot, N=36. 50
4.5 Rückgewinnung koloniebildender Einheiten (KBE) von *P. aeruginosa* in Abhängigkeit von verschiedenen Spültechniken: 5x10 ml 0,9%-iger NaCl-Lösung, log-Darstellung als Boxplot, N=45. 51
4.6 Anzahl der koloniebildende Einheiten (KBE) von *P. aeruginosa* in den Prüfkörpern der dritten Versuchsreihe, log-Darstellung als Boxplot, N=8. 53
4.7 Rückgewinnung koloniebildender Einheiten (KBE) von *P. aeruginosa* bei acht Prüfkörpern ohne und 16 Prüfkörpern mit Ultraschallbehandlung, log-Darstallung als Boxplot, N=24 54

5.1 a) schematische Darstellung eines Biofilms auf einer glatten Oberfläche. Copyright Center for Biofilm Engineering, Montana State University, Bozeman, Mont., b) Rasterelektronische Aufnahme eines Biofilms auf einer Metalloberfläche eines Wassersystems. Copyright American Society for Mikrobiology. CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS, Apr. 2002, p. 167–193. 62

Tabellenverzeichnis

2.1 Zusammensetzung der Caseinpepton-Sojamehlpepton-Bouillon in g/l . . 32
2.2 Zusammensetzung des Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agars in g/l 33
2.3 Zusammensetzung des Enthemmers 34

4.1 Interquartilsbereiche, Maxima und Minima der Boxplots in Abb. 4.2 bei Einsatz von 0,9%-iger NaCl-Lösung (NaCl), 0,9%-ige NaCl-Lösung + Tween 80 0,1%-ig (NaCl+Tween 80), Caseinpepton-Sojamehlpepton-Bouillon (CSB) und CSB+Enthemmersubstanzen, Werte in $\log_{10}$. 48
4.2 Interquartilsbereiche, Maxima und Minima der Boxplots in Abb. 4.4 und Abb. 4.5 bei Einsatz verschiedener Spültechniken: 50 ml NaCl, 20 ml NaCl, Infusomat, Sog, fünf Einzelspülungen mit je 10 ml NaCl, Werte in $\log_{10}$. 52
4.3 Überlebensverhalten von *P. aeruginosa* im Ultraschallbad nach Beschallung von 0, 1, 2, 3, 5, 10, 15 Minuten, in koloniebildenden Einheiten/Platte (KBE/Platte), N=42. 52
4.4 Interquartilsbereiche, Maxima und Minima aus Abb. 4.7, Werte in $\log_{10}$. 55

Literaturverzeichnis

[1] Alfa M.J., Olson N., DeGagne P., Jackson M. A survey of reprocessing methods, residual viable bioburden, and soil levels in patient-ready endoscopic retrograde cholangiopancreatography duodenoscopes used in canadian centers. Infection Control and Hospital Epidemiology 2002; 23: 198-206.

[2] Alfa M.J. Leserbrief Testanschmutzung zu de Bruijn A.C.P. Zentralsterilisation 2006;14: 46-47.

[3] Alfa M.J. DeGagne P., Olson N. Validierung der künstlichen Testanschmutzung ATS zur Ermittlung der Reinigungs- und Sterilisationswirkung bei Instrumenten mit engem Lumen. Zentralsterilisation 2005; 13: 387-402.

[4] Allen J.I., O´Connor Allen M., et al. pseudomonas infection on the biliary system resulting from use of a contaminated endoscope. Gastroenterology 1987; 92: 759-763.

[5] Alvarado, C. J. and M. Reichelderfer (2000). APIC guideline for infection prevention and control in flexible endoscopy. American Journal of Infection Control 2000; 28: 138-155.

[6] Alvarado C.J., Stolz S.M., Maki D.G. nosocomial infections from contaminated endoscopes: a flawed automated endoscope washer. An investigation using molecular epidemiology. The American Journal of Medicine 1991; 91 (Suppl 3B): 272S-280S.

[7] Axon A.T.R., Beilenhoff U., Bramble M.G., Ghosh S., Kruse A., McDonnell G.E., Neumann C., Rey J.-F., Spencer K. Variant Creutzfeldt-Jakob Disease (vCJD) and Gastrointestinal Endoskopy. E.S.G.E guidelines. Endoscopy 2001; 33: 1070-1080.

[8] Bezel R., Salfinger M., Brändli O. Transmission von Mykobakterien durch das Fiberendoskop. Schweiz. med. Wschr. 1985; 115: 1360-1365.

[9] Birnie G.G., Quigley E.M., Clements G.B., Follet E.A.C., Watkinson G. Endoscopic transmission of hepatitis B virus. Gut 1983; 24: 171-174.

[10] Bronowicki J.P. et al. Patient-to-Patient Transmission of Hepatitis C virus during

Colonoscopy. New England Journal of Medicine 1997; 337: 237-240.

[11] de Bruijn A.C.P., van Drongelen A.W. EN ISO 15883: Norm prima, Testanschmutzung eher nicht. Zentralsterilisation 2005; 13: 330-333.

[12] Bryce E.A, Walker M., Bevan C., Smith J.A. Contamination of bronchoscopes with *Mycobacterium tuberculosis*. Infection control forum 1993; 8: 35-36.

[13] Burkhardt F. Salmonellenübertragung durch Gastroskopie. Hospital-Hygiene 1976; 11: 337-339.

[14] Cowen A.E. The clinical risk of infection associated with endoscopy. Can J Gastroenterology 2001; 15: 321-331.

[15] Davion T., Braillon A., Delamarre J., Delcenserie R., Joly J-P., Capron J-P. *P. aeruginosa* liver abscesses following endoscopic retrograde cholangiography. Report of a case without biliary tract disease. Digestive Diseases and Sciences 1987; 32: 1044-1046.

[16] Arbeitskreis Endoskopie der DGKH. Prüfung und Bewertung der Reinigungs- und Desinfektionswirkung von Endoskop-Dekontaminationsautomaten sowie - Desinfektionsautomaten. Hyg Med (1995; 20: 40-47) 2001; 26: 524.

[17] Arbeitskreis Endoskopie der DGKH. Prüfung und Bewertung der Reinigungs- und Desinfektionswirkung von Endoskop-Dekontaminationsautomaten sowie - Desinfektionsautomaten. Hyg Med 1995; 20: 40-47.

[18] Leitlinie zur Validierung maschineller Reinigungs-Desinfektionsprozesse zur Aufbereitung thermolabiler Endoskope, Zentralsterilisation 2011; 3: 5-70

[19] Donlan R.M., Costeron J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clinical Microbiology Reviews 2002: 15: 167-193.

[20] Frommeyer L., Bihl P., Schmidt-Wilcke H.A. Iatrogene Candidainfektion von Pankreaspseudozysten. Gastroenterologie 1991; 29: 392-394.

[21] Früh B. Kontrolle der Reinigungsleistung bei der Instrumentenaufbereitung. Krankenhaushygiene und Infektionsverhütung 2002; 24: 89-91.

[22] Gorse J.G., Messner R.L. Infetion Control Practices in Gastrointestinal Endoscopy In The United States: A National Survey. Infection Control And Hospital Epidemiology 1991; 12: 289-296.

[23] Hagelueken G., Adams T.M., Wiehlmann L., Widow U., Kolmar H., Tümmler B.,

Heinz D .W., Schubert W.D. The crystal structure of SdsA1, an alkylsulfatase from Pseudomonas aeruginosa, defines a third class of sulfatases. PNAS 2006; 103: 7631-7636.

[24] Helm E.B., Bauernfein A., Frech K., Hagenmüller F. Pseudomonas-Septikämie nach endoskopischen Eingriffen am Gallengangsystem. DMW 1984; 109: 697-701.

[25] Hussain S.A. fiberoptic bronchoscope-related outbreak of infection with *Pseudomonas*. Chest 1978; 74: 438.

[26] Bader L., et al. HYGEA, Studie zur Qualität der Aufbereitung von flexiblen Endoskopen in Klinik und Praxis. Gastroenterologie 2002; 40: 157-170

[27] Infektionsprophylaxe in der Endoskopie, 1. Stellungnahme des Arbeitskreises Endoskopie, Hyg. Med. 1990; 15; 502-504

[28] Anforderungen an Endoskop-Reinigungs-Desinfektionsgeräte, Arbeitskreis Endoskpie, Hyg. Med. 1991; 16: 74-76

[29] Prüfung und Bewertung der Reinigungs- und Desinfektionswirkung von Endoskop-Dekontaminationsautomaten sowie -Dekontaminationsautomaten, Arbeitskreis Endoskopie, Hyg. Med. 1995; 20: 40-47

[30] DIN EN ISO 15883-5, Reinigungs-Desinfektionsgeräte - Teil 5: Prüfanschmutzungen und -verfahren zum Nachweis der Reinigungswirkung (ISO/TS 15883-5:2005); Deutsche Fassung CEN ISO/TS 15883-5: Beuth Verlag Berlin 2005

[31] Methode zur Überprüfung der Gesamtprozessleistung von Reinigungs-Desinfektionsgeräten für flexible Endoskope. Hyg. Med. 2012; 37: 245-249

[32] Kampf G., Bloß R., Martiny H. Surface fixation of dried blood by glutaraldehyde and paracetic acid. Journal of Hospital Infection 2004;57: 139-143.

[33] A. Kramer, Mitteilung des Vorstandes zur Prüfung und Bewertung der Reinigungs- und Desinfektionswirkung von Endoskop-Dekontaminationsautomaten sowie -Dekontaminationsautomaten, Hyg. Med. 2001; 12: 524

[34] Kovaleva, "Is bacteriologic surveillance in endoscope reprocessing stringent enough?". Endoscopy 2009

[35] Leung J.W. reprocessing of flexible endoscopes. Journal of Gastroenerology and Hepatology 2000; 15: G73-G77.

[36] Levy P-Y. A nosocomial outbreak of *Legionella pneumophila* caused by contamina-

ted transesophageal echocardiography probes. Concise Communications 2003; 24: 619-624.

[37] Lindsay D., von Holy A. Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. Journal of Hospital Infection 2006; 64: 313-325.

[38] Martiny H., Floss H., Zühlsdorf B. The importance of cleaning for the overall results of processing endoscopes. Journal of Hosiptal Infection 2004;56: S16-S22.

[39] Miksits, Hahn, Basiswissen medizinische Mibrobiologie und Infektiologie, 2. Auflage, 1999, Springer Verlag.

[40] Mitchell D.H., Hicks L.J., Chiew R., Montanaro J.C., Chen S.C. Pseudoepidemic of *Legionella pneumophila* serogroup 6 associated with contaminated brochnoscopes. Journal of Hospital Infection 1997; 37: 19-23.

[41] Miyaji H., Kohli Y., Azuma T., Ito S., Hirai M., Ito Y., Kato T., Kuriyama M. Endoscopic cross-infection with *Helicobacter pylori*. The Lancet February 18, 1995; 345: 464.

[42] Morris I.M., Cattle D.S., Smits B.J. endoscopy and transmission of Hepatitis B. The Lancet December 6, 1975: 1152.

[43] Bundesministerium der Justiz, Medizinprodukte-Betreiberverordnung in der Fassung der Bekanntmachung vom 21. August 2002 (BGBl. I S. 3396), zuletzt geändert durch Artikel 386 der Verordnung vom 31. Oktober 2006 (BGBl. I S. 2407)

[44] Bundesministerium der Justiz, Medizinproduktegesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 7. August 2002 (BGBl. I S. 3146), zuletzt geändert durch Artikel 1 des Gesetzes vom 14. Juni 2007 (BGBl. I S. 1066)

[45] Muqbil I., Burke F.J.T., Miller C.H., Palenik C.J., Antimicrobial activity of ultrasonic cleaners, Journal of Hospital Infection 2005; 60: S249-255

[46] Muscarella L.F. Prevention of diesease transmission during flexible larongoscopy. American Journal of Infection Control 2007; 35: 536-544.

[47] Nakata S., Fushimi R., Hanamura R., Noguchi S., Umeshita K., Takashina M., Kawamoto T. Vordesinfektion von Instrumenten erschwert eine wirksame Reinigung. Zentralsterilisation 2007; 15: 438-448.

[48] The National Creutzfeldt-Jakob Disease Surveillance Unit (NCJDSU) 2008. The University of Edinburgh http://www.cjd.ed.ac.uk/vcjdworld.htm.

[49] Orzechowski T.J.H., de Bruijn A.C.P., Wassenaar C. Validierung eines Reinigungstestverfahrens für flexible Endoskope. Zentralsterilisation 2003; 11: 165-178.

[50] Pfeifer M. Standardisierte Testanschmutzung Blut 1: Zusammensetzung, Herstellung, Anwendung. Zentralsterilisation 1998; 6: 381-385.

[51] Ponchon T. transmission of Hepatitis C and prion diseases through digestive endoscopy: Evaluation of risk and recommended practices. Endoscopy 1997: 29: 199-202.

[52] Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention am Robert-Koch-Institut (RKI). Anforderung an die Hygiene bei der Aufbereitung flexibler Endoskope und endoskopischen Zusatzinstrumentariums (Empfehung). Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz 2002; 45: 395-411.

[53] Anforderungen an die Hygiene bei der Aufbereitung von Medizinprodukten. Empfehlung der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) beim Robert-Koch-Institut (RKI) und des Bundesinstitutes für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM). Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz 2012; 55: 1-67

[54] Sammartino M.T., Israel R.H., Magnussen C.R. *Pseudomonas aeruginosa* contamination of fibreoptic bronchoscopes. Journal of Hospital Infection 1982; 3: 65-71.

[55] Schulze L. Aufbereitung flexibler Endoskope: Praktische Erfahrungen mit verschiedenen Endoskop-Reinigungs- und Desinfektions-Automaten (ERDA). Krankenhaus Hygiene und Infektionsverhütung 1997; 19: 76-82.

[56] Singh S., Singh N., Kochhar R., Mehta S. K., Talwar P. Contamination of an endoscope due to *Trichosporon beigelli*. The Hospital Infection Society 1989; 14: 49-53.

[57] Spach D.H., Silverstein F.E., Stamm W.E. transmission of infection by gastrointestinal endoscopy and bronchoscopy. Annals of Internal Medicine 1993; 188: 117-128.

[58] Spicher G, Peters J. Eine Methode zur Kontamination von Testobjekten mit gerinnendem Blut. (A method of contaminating test objects with coagulationg blood). Zbl Bakt Hyg B 1985; 182: 89-94.

[59] Suratt P.M., Gruber B., Wellons H.A., Wenzel R.P. absence of clinical pneumonia following bronchoscopy with contaminated and clean bronchofiberscopes. Chest 1977; 71: 52-54.

[60] Tennenbaum R., Colardelle P., Chochon M., Maisonneuve P., Jean F., Andrieu

J. Hepatité C aprés cholangigraphie rétrograde. Gastroenterol Clin Biol 1993; 17: 763-75.

[61] Bundesministerium der Justiz, Bundesanzeiger, Bekanntmachung der Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie) gemäß §§ 12 und 18 des Transfusionsgesetzes (TFG) (Novelle 2005), 19.09.2005, 12, 2.2.2.2

[62] Methode zur Überprüfung der Reinigungsleistung von Reinigungs-Desinfektionsgeräten für flexible Endoskope. Hyg. Med. 2011; 36: 313-317

[63] Wischnewski N., Sohr D., Rüden H. Empfehlungen zur manuellen und maschinellen Aufbereitung von Duodenoskopen. Verdauungskrankheiten 1998; 16: 199-205.

[64] Wloka M. Rheologische Untersuchungen an nativen Biofilmen von Pseudomonas aeruginosa. Inaugural Dissertation 2006.

[65] Zühlsdorf B. Bestimmung der Reinigungsleitung von Prozessen mit verschiedenen Reinigern in Reinigungs- und Desinfektionsgeräten für flexible Endoskope. Inaugural-Dissertation 2005.

7 Danksagungen

Bei folgenden Personen möchte ich mich für die Betreuung, Einarbeitung, EDV-Unterstützung, sowie Mithilfe bedanken.

Frau Prof. Dr. rer. nat. H. Martiny

Frau Dr. rer. med. B. Kampf

Frau PD Dr. ing. M. Emmrich

Frau Dr. rer. nat. U. Kircheis

Frau H. Sedlmair, CBTA

Frau Franziska Schäfer

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern und denen, die mich bei der Erstellung dieser Dissertation in jedweder Art und Weise unterstützt haben.

8 Lebenslauf

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

9 Eidesstattliche Versicherung

Ich, Matthias Georg Kumor, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: "Anwendung verschiedener Untersuchungsmethoden zur Rückgewinnung von *Pseudomonas aeruginosa* bei der Standardisierung einer Prüfmethode zur Aufbereitung von flexiblen Endoskopen nach DIN ISO/TS 15883-5" selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.
Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet. Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet. Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Datum, Unterschrift