

Neutralisation von Desinfektionsmittelrückständen

Mikrobiologisches Umgebungsmonitoring in Reinräumen und Isolatoren

Rolf Müller, Ulrich Eikmanns, Heinz Schindler

PharmaMedia Dr. Müller GmbH, Leimen

Korrespondenz: Dr. Ulrich Eikmanns, PharmaMedia Dr. Müller GmbH, Gustav-Throm-Str. 1, 69181 Leimen (Germany); e-mail: ulrich.eikmanns@pmm-leimen.de

ZUSAMMENFASSUNG

In der pharmazeutischen Industrie werden Desinfektionsmittel verschiedener Wirkstoffklassen häufig im Wechsel eingesetzt, um ein möglichst breites mikrobielles Spektrum abzutöten. Oft enthält zumindest eines der verwendeten Desinfektionsmittel Quartäre Ammonium-Verbindungen (QAV). Diese QAV können nach der Desinfektion, selbst bei einer gründlichen Nachreinigung, in geringer Konzentration auf den Oberflächen zurückbleiben, da sie im Gegensatz zu z.B. Alkoholen nicht rückstandslos verdampfen. Bei Einsatz der heute gebräuchlichen TSA+LTHT[®]-Abklatschagarplatte im mikrobiologischen Hygienemonitoring können selbst diese geringen Konzentrationen an QAV zu falsch-negativen Ergebnissen führen, da sie bei Abklatschuntersuchungen mit auf das Nährmedium übertragen werden. Aufbauend auf der etablierten Rezeptur wurde deshalb ein Nährmedium entwickelt, das in der Lage ist auch hohe Konzentrationen an QAV zu neutralisieren.

KEY WORDS

- Hygienemonitoring
- Abklatschmedium
- Quartäre Ammoniumverbindung
- Desinfektionsmittelrückstände
- Neutralisation
- Enthemer

Pharm. Ind. 79, Nr. 9, 1298–1302 (2017)

[®]TSA+LTHT = Tryptic Soy Agar mit Lecithin, Tween 80, Histidin und Thiosulfat

ABSTRACT

Neutralization of Residuals of Disinfectants in Clean Rooms and Isolators on Environmental Monitoring Plates

In pharmaceutical industry it is good practice to rotate the disinfectants used in critical areas. This rotation helps to kill a maximum spectrum of potential contaminations. Quite often at least one of the used disinfectants contains a Quaternary Ammonium Compound (QAC) as active component. QACs as well as Biguanides are not volatile. Therefore residues will remain on surfaces after disinfection. Even after a rinsing step it cannot be ruled out that residues will remain in lower concentrations on the sanitized surfaces. When performing contact tests with the commonly used TSA+LTHT[®] contact plate, even such low concentrations of residues can result in false-negative results, as the residues are picked up by the contact plate together with a potential contamination. Therefore, based on the widely used TSA+LTHT contact plate a medium was developed, which is able to inactivate QAC as well as Biguanides even in high concentrations.

1. Einleitung

Desinfektionsmittel mit quartären Ammoniumsalzen, Benzylalkonium-Verbindungen und Biguaniden werden im Pharmabereich häufig verwendet, da in regelmäßigen Abständen ein Wechsel des Desinfektionsmittels (Wechsel der Wirkstoffgruppen) empfohlen wird. Darüber hinaus verfügen diese Desinfektionsmittel auch in einer niedrigeren Konzentration über eine sehr gute Abtötungswirkung gegenüber grampositiven Keimen. Nachteile dieser Desinfektionsmittel sind die jeweiligen Rückstände, die regelmäßig entfernt werden müssen, um falsch-negative Ergebnisse zu vermeiden. Bei glatten Flächen lässt sich die Reinigung mit sterilem Wasser oder mit Alkohol erreichen. Bei verwinkelten Flächen und Vertiefungen ist das aber nicht ganz unproblematisch. Ein Verbleib bzw. sogar eine Anreicherung dieser Substanzen kann bei einer Untersuchung mit einem Abklatschnährmedium zu der falschen Annahme führen, dass die Oberfläche keine vermehrungsfähigen Mikroorganismen enthält, obwohl diese noch vorhanden sind. Solch falsch-negative Ergebnisse können dadurch zustande kommen, dass Reste des Desinfektionsmittels bei der Testdurchführung auf

genommen werden und die Desinfektionswirkung beim Bebrüten des Nährmediums einsetzt. In mehrjähriger Entwicklungsarbeit haben es sich die Autoren zur Aufgabe gemacht, ein Produkt zu entwickeln, welches dieses Problem löst. Ein Neutralisationsmittel für Quartäre Ammonium-Verbindungen (QAV) sollte gefunden werden.

Beim Einsatz von Desinfektionsmitteln in der pharmazeutischen Industrie müssen die Anwender den Behördenvertretern sowohl die Wirksamkeit der Desinfektionsmittel als auch die Inaktivierung von Desinfektionsmittelrückständen auf den verwendeten Nährmedien nachweisen.

Der Inaktivierung von QAV und Biguaniden auf festen Nährmedien wurde lange Zeit nicht in ausreichendem Maße nachgegangen. Derzeit sind den Autoren auch keinerlei Studien bekannt, die den Wirkmechanismus von Enthemmern auf QAV und Biguanide beschreiben. In der EP 2.6.12 ist eine Aufzählung von „Interfering Substances“

sowie deren „Potential Neutralizing Method“ aufgelistet. In dieser Aufzählung wird im Prinzip zu jeder heute in Desinfektionsmitteln verwendeten Wirkstoffgruppe mindestens eine Neutralisierungssubstanz beschrieben. Folgt man den Empfehlungen, so müssten mit den heute gebräuchlichen TSA+LTHT-Nährmedien alle Desinfektionsmittelrückstände inaktiviert werden können. Allerdings zeigte sich in den letzten Jahren, dass insbesondere Rückstände neuerer Desinfektionsmittel nicht ausreichend inaktiviert werden. Typisch für solch neue Desinfektionsmittel ist, dass sie meistens QAV oder Biguanide bzw. eine Mischung beider Komponenten in oft hoher Konzentration enthalten.

Um die mangelnde Inaktivierung der Rückstände zu kompensieren, wäre es naheliegend, die Konzentration der zugesetzten Enthemmer in den Nährmedien einfach zu erhöhen. Allerdings zeigte sich, dass eine Erhöhung der Enthemmerkonzentration in Agarmedien nicht ausreicht,

■ **Tabelle 1**

Liste der verwendeten Desinfektionsmittel – Wirkstoffangaben in mg pro 100 ml.

Desinfektionsmittel	QAV	Biguanid	Chlordioxid	Phenoxypropanol	Phenoxyethanol	Glutaraldehyd	Glyoxal	Aminopropyl-diamin	Propanol/2-Popanol
Gigasept AF (4 %)	876			400					
Hexaquant forte (2 %)	558								
Biocide A	500	200							
Microbac forte (2 %)	498								
Terralin Protect (2 %)	458				340				
Gigasept AF (1,5 %)	329			150					
Biocide B	290		920						
Microbac forte (1 %)	249								
Sterillium classic pur	200								75 ml
Lysoformin 3000 (2 %)	192					190	150		
Melsept SF (2 %)	150					90	64		
Hexaquant forte (0,5 %)	140								
Microbac forte (0,5 %)	125								
Korsolin FF (2 %)	120					100			
Hexanios G+R	117	12							
Terralin Protect (0,5 %)	115				85				
Amphospray 41 IP	109	96						33 ml	
Incidin Rapid (0,75 %)	75					74			
Lysoformin special (0,75 %)	72	22							
Lysoformin 3000 (0,5 %)	48					47,5	37,5		
Melsept SF (0,5 %)	38					22,5	16		
Korsolin FF (0,5 %)	30					25			
Incidin Rapid (0,25 %)	25					25			
Lysoformin special (0,25 %)	24	7							

um die neuen Desinfektionsmittel zu inaktivieren. Ab dem Jahr 2005 wurden deshalb von verschiedenen Herstellern Nährmedien mit neuen Enthemmern entwickelt, die speziell die Inaktivierung von QAV- und biguanidhaltigen Desinfektionsmitteln bewirken sollten. Diese neu entwickelten Nährmedien konnten zwar die QAV und Biguanide z. T. inaktivieren, hatten aber alle verschiedene Nachteile (Haltbarkeitsprobleme, Bildung von Präzipitaten, schlechte Wiederfindung einzelner Keime, trübes Medium), sodass diese sich am Markt nicht durchsetzen konnten.

In dem vorliegenden Beitrag ist die Entwicklung eines neuen Nährmediums beschrieben. Dieses kann Desinfektionsmittelrückstände selbst sehr hoch konzentrierter Desinfektionsmittel problemlos neutralisieren – ohne dass die o.g. Nachteile auftreten. Die Untersuchungen wurden alle mittels eines Worst-Case-Tests durchgeführt,

bei dem das Desinfektionsmittel direkt auf das Nährmedium aufgetragen wird.

2. Material und Methoden

Um die Wirksamkeit der Neutralisation von Desinfektionsmittel nachzuweisen, können 2 verschiedene Testansätze durchgeführt werden:

- oberflächenunabhängiger Direct-Plating-Test
- oberflächenabhängiger Practical-Test

Bei dem oberflächenunabhängigen Direct-Plating-Test wird das Desinfektionsmittel gleichmäßig auf die Platte aufgetragen und muss für 15–20 Min. einwirken. Anschließend wird die Platte mit einer Keimsuspension bekannter Keimzahl mittels Autoplater beimpft. Der Direct-Plating-Test ist im Vergleich zum Practical-Test vergleichbarer und ermöglicht es, relativ schnell eine hohe Anzahl an Proben zu testen. Der Direct-Plating-Test kann als Worst-Case-Test angesehen werden, da hier die gesamte Menge an Desinfektionsmittel auf die Platte aufgetra-

■ **Tabelle 2**

Desinfektionsmittelinaktivierung auf TSA+LTHT – Wiederfindung in %.

Desinfektionsmittel	Wirkstoffkonzentration in mg/100 ml		Testkeim		
	QAV	Biguanid	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. epidermidis</i>
			µl disinfectant pro TSA+LTHT-Abklatschplatte		
			50	50	50
Gigasept AF (4 %)	876		0	0	0
Hexaquart forte (2 %)	558		0	0	0
Biocide A	500	200	0	0	0
Microbac forte (2 %)	498		s. Microbac forte (0,5 %)		
Terralin Protect (2 %)	458		s. Terralin protect (0,5 %)		
Gigasept AF (1,5 %)	329		0	0	0
Biocide B	290		n.t.	n.t.	0
Microbac forte (2 %)	249		n.t.	5	1
Sterillium classic pur	200		4	0	6
Lysoformin 3000 (2 %)	192		s. Lysoformin 3000 (0,5 %)		
Melsept SF (2 %)	150		n.t.	0	0
Hexaquart forte (0,5 %)	140		0	0	0
Microbac forte (0,5 %)	125		n.t.	5	1
Korsolin FF (2 %)	120		0	0	1
Hexanios G+R	117	12	n.t.	n.t.	0
Terralin Protect (0,5 %)	115		n.t.	7	0
Amphospray 41 IP	109	96	0	0	0
Incidin Rapid (0,75 %)	75		0	1	1
Lysoformin special (0,75 %)	72	22	0	0	3
Lysoformin 3000 (0,5 %)	48		n.t.	1	37
Melsept SF (0,5 %)	38		n.t.	2	64
Korsolin FF (0,5 %)	30		74	52	74
Incidin Rapid (0,25 %)	25		81	59	69
Lysoformin special (0,25 %)	24	7	33	1	0

gen wird und nicht nur ein Teil des auf der Oberfläche befindlichen Desinfektionsmittelrückstands beim Abklatsch aufgenommen wird.

Beim Practical-Test wird zunächst eine Oberfläche mit dem zu testenden Desinfektionsmittel behandelt. Das Desinfektionsmittel muss zunächst eintrocknen (z.B. für 3 h). Danach wird ein Abklatsch der behandelten Oberfläche durchgeführt. Nach einer Einwirkzeit, typischerweise von 15 oder 30 Min., wird die Platte mit einer Keimsuspension mit bekannter Keimzahl mittels Autoplater beimpft.

Für die in dieser Studie vorgestellten Daten wurde ausschließlich der Direct-Plating-Test durchgeführt. Die verwendeten Desinfektionsmittel sind in Tab. 1 aufgelistet. Die Desinfektionsmittel wurden entweder gebrauchsfertig gekauft oder gemäß Anleitung angesetzt.

20, 50 und 100 µl der jeweiligen Desinfektionsmittel wurden jeweils auf eine Abklatschplatte aufgetragen. Im Folgenden sind aus Gründen der besseren Übersichtlichkeit und Vergleichbarkeit nur die Ergebnisse mit 50 µl dargestellt. 50 µl Desinfektionsmittel pro Abklatschplatte (25 cm²) entspricht ungefähr einer Menge von 20 ml pro m². Damit würde die Menge an Desinfektionsmittel in etwa 50 % der Menge entsprechen, die bei den meisten Desinfektionsmitteln für die Reinigung von Oberflächen empfohlen wird (ca. 40 ml pro m²). Unter der Annahme, dass bei einer Abklatschuntersuchung ungefähr 50 % der auf einer Oberfläche vorhandenen Desinfektionsmittelrückstände aufgenommen werden, entspricht die Menge von 50 µl Desinfektionsmittel pro Abklatschplatte der maximalen Menge an Desinfektionsmittel, die von einer Abklatschplatte neutralisiert werden muss. Da allerdings keine Daten zur Aufnahme von Desinfektionsmittelrückständen durch Abklatschmedien verfügbar sind, wurden die Untersuchungen zur Inaktivierung durch die TSA-U+-Abklatschplatte auch mit 100 µl Desinfektionsmittel pro Abklatschplatte durchgeführt (Daten auf Anfrage verfügbar).

2.1 Verwendete Nährmedien

1. TSA+LTHT-Abklatschplatten (z.B. Ref. 100.0100): Zur Inaktivierung enthält diese Platte eine Kombination von 0,7 g Lecithin (L), 5 ml Tween 80 (T), 0,5 g Histidin (H) und 0,1 g Na-Thiosulfat (T) pro Liter Nährmedium.
2. TSA-U+-Abklatschplatten (Ref. 101.0100): Zur Inaktivierung enthält diese Platte eine Kombination von 3 g Lecithin (L), 20 ml Tween 80 (T), 0,5 g Histidin (H) pro Liter Nährmedium. Zusätzlich enthielt das Medium den von den Autoren entwickelten neuen Enthemer-Plus-Zusatz.

2.2 Verwendete Teststämme

Als Testorganismen wurden *B. subtilis* (ATCC 6633), *Staph. aureus* (ATCC 6538) und *Staph. epidermidis* (ATCC 14990) eingesetzt, daneben aber auch *E. coli* (ATCC 8739), *Ps. aeruginosa* (ATCC 9027), *C. albicans* (ATCC 10231) und *A. brasiliensis* (ATCC 16404) mitgetestet. Die grampositiven Keime erwiesen sich als besonders empfindlich gegenüber QAV-haltigen Desinfektionsmitteln.

3. Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse der Tests sind in den folgenden beiden Tabellen dargestellt. In einem ersten Ansatz wurde untersucht, welche Desinfektionsmittel im Direct-Plating-Test bei Aufbringung von 50 µl pro Standard-Abklatschplatte (TSA+LTHT) noch inaktiviert werden (Tab. 2). Dabei stellte sich heraus, dass nur Desinfektionsmittel mit niedriger QAV-Konzentration ausreichend neutralisiert werden können: Übersteigt die Konzentration an QAV

30 mg pro 100 ml, ist davon auszugehen, dass eine Standard-TSA+LTHT-Platte keine ausreichende Inaktivierungskapazität hat.

In einem weiteren Ansatz wurde dann das neu entwickelte TSA-U+-Nährmedium mit den gleichen Desinfektionsmitteln unter den gleichen Versuchsbedingungen getestet. Die Ergebnisse sind in Tab. 3 aufgelistet. Bei allen Testkeimen zeigte sich, dass die Wiederfindung deutlich über 50 % lag und damit eine ausreichende Inaktivierung der Desinfektionsmittel gegeben ist. Selbst die am höchsten konzentrierten Desinfektionsmittel ließen sich inaktivieren. Die niedrig dosierten Desinfektionsmittel wurden nicht mehr mitgetestet, wenn bereits höhere Konzentrationen inaktiviert wurden (z.B. Melsept, Lysoformin 3000).

Die Daten zur Inaktivierung weiterer Desinfektionsmittel sowie höherer Konzentrationen der aufgelisteten Desinfektionsmittel (100 µl pro Abklatschplatte) wurden ebenfalls erhoben und sind auf Anfrage bei den Autoren erhältlich.

4. Schlussfolgerung

Aufbauend auf dem etablierten TSA+LTHT-Standard-Abklatschmedium mit den Enthemmern Lecithin (0,7 g/L), Tween 80 (50l/L), Histidin (0,5 g/L) und Na-Thiosulfat (0,1 g/L) wurde ein Neutralisationsmedium entwickelt, das die Wirkstoffe auch von neueren Desinfektionsmitteln mit höheren Wirkstoff-Konzentrationen neutralisieren kann. Das neu entwickelte TSA-U+-Abklatschmedium kann nach den vorliegenden Ergebnissen mindestens 20-fach höhere Wirkstoffkonzentrationen an QAV und Biguaniden inaktivieren, als die bisher gebräuchlichen Standard-TSA-Abklatschmedien mit LT bzw. mit LTHT. Die bisher bereits vorhandenen, guten Neutralisationseigenschaften der etablierten Abklatschmedien gegenüber anderen Desinfektionsmittelwirkstoffen sind dabei erhalten geblieben.

Die Entwicklung dieses Nährmediums stellt einen wichtigen Schritt zur Verbesserung des Hygiene-Monitorings in Reinräumen und Isolatoren dar. Es wird sichergestellt, dass Mikroorganismen auch dann nachgewiesen werden können, wenn bei der Beprobung von Oberflächen Wirkstoffreste mitaufgenommen werden. Im Vergleich zu bisher verfügbaren Abklatschmedien zeichnet es sich zudem durch verschiedene Vorteile aus. Das Medium erreicht u.a. ohne Einbußen bei der Wirksamkeit eine Haltbarkeit von mindestens 9 Monaten, ist durchsichtig und bildet auch bei längerer Lagerung keinerlei Kristalle/Präzipitate aus.

Bei der bereits entwickelten Version der TSA-U+-Abklatschplatte werden in den nächsten Monaten weitere Daten zu einer möglichen Haltbarkeitsverlängerung erhoben werden. Derzeit wird davon ausgegangen, dass die Haltbarkeit problemlos verlängert werden kann. Parallel

dazu werden die anhand der TSA-U+-Platte erlangten Ergebnisse auch bei anderen Nährmedien getestet (z.B. SDA). Bei Bedarf kann auch eine TSA-U+-Sedimentationsplatte entwickelt werden.

■ **Tabelle 3**

Desinfektionsmittelinaktivierung auf TSA-U+ – Wiederfindung in %.

Desinfektionsmittel	Wirkstoffkonzentration in mg/100 ml		Testkeim						
			<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. coli</i>	<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. brasiliensis</i>
	QAV	Biguanid	µl Desinfektionsmittel pro TSA-U+-Abklatschplatte						
			50	50	50	50	50	50	50
Gigasept AF (4 %)	876		92	76	83	116	97	123	99
Hexaquart forte (2 %)	558		86	106	79	92	101	97	108
Biocide A	500	200	111	109	126	105	95	112	89
Microbac forte (2 %)	498		103	98	104	75	99	90	107
Terralin Protect (2 %)	458		111	122	97	61	103	106	94
Gigasept AF (1,5 %)	329		s. Gigasept AF 4 %						
Biocide B	290		89	74	109	65	97	102	92
Microbac forte (2 %)	249		103	98	104	75	99	90	107
Sterillium classic pur	200		102	106	102	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
Lysoformin 3000 (2 %)	192		116	87	92	86	99	104	104
Melsept SF (2 %)	150		110	60	131	76	93	106	133
Hexaquart forte (0,5 %)	140		s. Hexaquart forte 2 %						
Microbac forte (0,5 %)	125		s. Microbac forte 2 %						
Korsolin FF (2 %)	120		64	94	82	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
Hexanios G+R	117	11,5	105	106	123	99	131	103	72
Terralin Protect (0,5 %)	115		s. Terralin Protect 2 %						
Amphospray 41 IP	109	96	87	93	89	85	127	127	119
Incidin Rapid (0,75 %)	75		99	95	92	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
Lysoformin special (0,75 %)	72	22	85	72	92	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
Lysoformin 3000 (0,5 %)	48		109	77	107	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
Melsept SF (0,5 %)	37,5		s. Melsept SF 2 %						
Korsolin FF (0,5 %)	30		s. Korsolin FF 2 %						
Incidin Rapid (0,25 %)	25		s. Incidin Rapid 0,75 %						
Lysoformin special (0,25 %)	24	7	s. Lysoformin special 0,75 %						

