



Die Sockentupferprobe: Eine geeignete und standardisierbare Maßnahme zur Überprüfung der Flächendesinfektion im Stall?

Abschlussbericht

PD Dr. Jochen Schulz
Institut für Tierhygiene, Tierschutz und
Nutztierethologie (ITTN)
Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover
Bischofsholer Damm 15
30175 Hannover



Inhaltsverzeichnis

1. Hintergrund des Projektes	3
2. Aufgabenstellung und Zielsetzung	4
3. Planung und Ablauf des Vorhabens	5
4. Ergebnisse und Diskussion	11
5. Verwertung der Ergebnisse und Ausblick	28
6. Literaturverzeichnis	28

1 Hintergrund des Projektes

Die Routinedesinfektion in Nutztierställen stellt eine wichtige hygienische Maßnahme dar, um zu vermeiden, dass Krankheitserreger, Zoonoseerreger oder resistente Bakterien durch Kontaminationen aus einem vorangegangenen Durchgang in den nächsten Produktionszyklus übertragen werden. Voraussetzung dafür ist, dass die Desinfektion sachgerecht mittels eines wirksamen Desinfektionsmittels durchgeführt wird. Das bedingt ferner, dass ein Nutztierstall vor der Desinfektionsmaßnahme gründlich gereinigt wird und die Oberflächen vor der Ausbringung des Desinfektionsmittels trocken sind. Das Ablaufschema in **Abbildung 1** soll den Gesamtablauf der Reinigung und Desinfektion verdeutlichen.

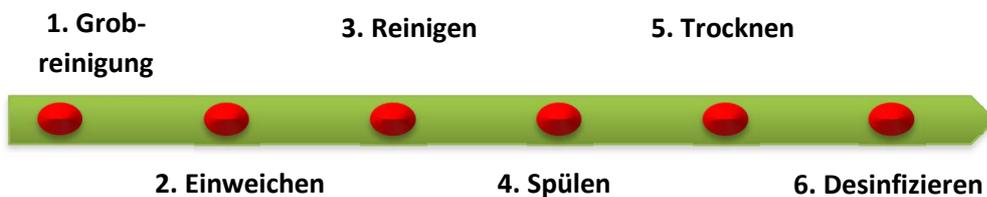


Abbildung 1: Ablauf der Arbeitsschritte bei der R&D im Stall

Reinigung und Desinfektion (R&D) sind aufwendig und gehören eher zu den unbeliebten Tätigkeiten eines Tierhalters. Erfahrungen aus der Praxis haben gezeigt, dass bei der Durchführung der Reinigung Unterschiede in der Gründlichkeit sichtbar wurden. Van Hoorebeke et al. (2010)¹ zeigten sogar statistische Zusammenhänge zwischen dem Auftreten von Salmonellen und dem Weglassen der Trockenreinigung in Legehennenhaltungen. Zudem muss mit Anwendungsfehlern beim Einsatz von Desinfektionsmitteln (z.B. Dosierungsfehler oder Kältefehler nicht beachtet) gerechnet werden. Der Erfolg der routinemäßigen R&D sollte daher überprüfbar sein. Nach Böhm (1998)² sollte sich der Keimgehalt von Mikroorganismen im Idealfall von der Ausgangsbelastung einer kontaminierten Oberfläche bis zum Zeitpunkt nach der Desinfektion bei sachgerechter Durchführung um insg. 1 Mio. Keime pro Quadratzentimeter verringern. Damit wäre zumindest ein quantitativer Maßstab gegeben, der den Erfolg der R&D bewertbar macht.

Eine bewertbare mikrobiologische Methode könnte nicht nur Fehler bei der Durchführung der R&D aufdecken, sondern in Funktion als Kontrollmaßnahme auch bestätigen, dass die Maßnahmen effektiv durchgeführt wurden. Dies wäre z.B. eine wichtige Information für den Tierhalter, der die Effizienz seiner eigenen Arbeit oder die eines Dienstleisters prüfen möchte. Das Problem besteht nun darin, dass die eingesetzten Methoden zur Überprüfung des R&D-Erfolges nur begrenzt geeignet sind oder noch nicht hinreichend evaluiert sind. Dies ist vermutlich auch der Grund dafür, dass noch keine einheitlichen Methoden zur Überprüfung der R&D von

Die Sockentupferprobe: Eine geeignete und standardisierbare Maßnahme zur Überprüfung der Flächendesinfektion im Stall?

Oberflächen in Nutztierställen in Deutschland eingeführt wurden. Die teilweise eingesetzte Abklatschmethode, bei der Kulturmedien auf die Oberflächen gedrückt werden die anschließend bebrütet werden, ist nach Luyckx et al. (2015)³ für quantitative Betrachtungen weniger geeignet und kann bei den im Stall vorherrschenden hohen Ausgangsbelastungen nicht eingesetzt werden, da die Medien überwachsen und nicht mehr auszählbar sind. Eine andere Möglichkeit die Keimbelastung von Oberflächen zu messen sind sogenannte Tupfermethoden. Dabei handelt es um sterile Stoffe, welche mit einer sterilen Pufferlösung befeuchtet werden, um den Restschmutz von Oberflächen aufzunehmen. Anschließend können diese Tupfer mit Lösungen im Labor ausgewaschen werden und daraus lassen sich die Keimzahlen bestimmen. Durch die Möglichkeit des Ansatzes von Verdünnungsreihen lassen sich auch sehr hohe Keimbelastungen feststellen. Zudem können durch den Einsatz von Selektivmedien bestimmte Keime angezüchtet werden, die im Rahmen der Bewertung als Indikatorkeime dienen können. So wurden beispielsweise Sockentupfer eingesetzt, um Methicillin resistente *Staphylococcus aureus* auf Stallböden oder in der Umgebung von Ställen nachzuweisen (Schulz et al. 2012)⁴. Die Art der Probenahme (das Abschreiten von Stallungen) ermöglicht eine relativ rasche Beprobung von deutlich größeren Flächen als beispielsweise die Abklatschmethode, was für die Durchführung und die Beurteilung von großen Flächen wie Stallböden von Vorteil ist. Ferner kann durch Pufferzusätze sichergestellt werden, dass Desinfektionsmittelrückstände auf Oberflächen das Ergebnis der Beprobung nach der Desinfektion nicht signifikant beeinflussen. Für Tupferproben, die per Hand von definierten Oberflächen der Größe eines DIN A4 Formates (625 cm²) genommen wurden, liegen bereits evaluierte Daten aus Masthühnerställen vor (Luyckx et al. 2015)³. Der Aufwand der Beprobung erscheint in der Veröffentlichung jedoch verhältnismäßig hoch, während z.B. die Gesamtfläche des beprobten Stallbodens gering bleibt (12 Proben x 625 cm²). Der Sockentupfer stellt somit möglicherweise eine praktikablere Methode dar. Ein weiterer interessanterer Aspekt in der Studie von Luyckx et al. (2015)³ war die Feststellung, dass anhand eines ATP (Adenosin-Triphosphat) -Monitorings augenscheinlich saubere Flächen noch starke organische Belastungen aufwiesen, die durchaus von Bakterien stammen konnten. Der Zusammenhang zwischen den gemessenen ATP-Konzentrationen und der mikrobiellen Belastung der Oberflächen wurde jedoch nicht untersucht.

2 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Die R&D in Nutztierställen stellt eine zwingend notwendige Maßnahme im Sinne des Tier- und des Verbraucherschutzes dar und wird auf europäischer und nationaler Ebene in Richtlinien gefordert. Daher kommt der Überprüfung der Wirksamkeit dieser Maßnahmen eine wichtige Bedeutung zu. Im Rahmen dieses Vorhabens sollte die praktikable Sockentupferprobe hinsichtlich ihrer Eignung zur Überprüfung der R&D von Stallböden in Nutztierhaltungen geprüft

Die Sockentupferprobe: Eine geeignete und standardisierbare Maßnahme zur Überprüfung der Flächendesinfektion im Stall?

und evaluiert werden. Zur Einschätzung der Keimbelastung gereinigter und desinfizierter Flächen, sollte die Anzahl mesophiler Gesamtkeime aus Sockentupferproben ermittelt und mit Ergebnissen einer standardisierten Abklatschprobenahme nach niederländischem Vorbild (IKB (Integrale Keten Beheersing)-System) verglichen werden. Ferner sollte untersucht werden, ob der Nachweis von Fäkalbakterien aus den Sockentupfern eine geeignete Methode zur Bewertung des Reinigungs- und Desinfektionserfolges darstellen könnte. Neben den kulturbasierten Laborverfahren sollte erstmals ein Schnellverfahren zur Messung der ATP-Konzentrationen auf gereinigten und desinfizierten Oberflächen in Ställen zum Einsatz kommen, um abschätzen zu können inwieweit ein solches Verfahren eine Beurteilung zur mikrobiellen Oberflächenkontamination in Nutztierhaltungen zulässt. Vor- und Nachteile der verschiedenen Methoden hinsichtlich der Praxistauglichkeit sollten vergleichsweise herausgestellt werden.

3 Planung und Ablauf des Vorhabens

Entsprechend der Antragsplanung wurden insgesamt fünfzehnmal der Reinigungs- und Desinfektionserfolg in Geflügelställen und in Schweineställen mit verschiedenen Verfahren untersucht. In den Schweinehaltungen wurde zu den verschiedenen Probenahmezeitpunkten vor der Reinigung, nach der Reinigung und nach der Desinfektion jeweils dasselbe Abteil untersucht. Die untersuchten Geflügelställe waren in zwei Abteile eingeteilt. Dort wurde die R&D soweit möglich jeweils in beiden Abteilen zeitgleich beprobt. Der Mehraufwand wurde betrieben, um zusätzlich Daten und Erkenntnisse zu gewinnen. Beispielsweise wurden die Abteile auf gleiche Weise und ca. zeitgleich, aber von verschiedenen Personen gereinigt und desinfiziert, was möglicherweise einen Einfluss auf das Ergebnis hätte haben können. Die Untersuchungstermine, Haltungsformen, Informationen zur R&D sowie die an den jeweiligen Untersuchungstagen eingesetzten Probenahmeverfahren sind in **Tabelle 1** zusammengefasst.

Tabelle 1: Zusammengefasste Daten zur Untersuchung der Reinigung und Desinfektion in Schweine- und Geflügelställen.

Stall	Abteil	Probennahmedatum	Nassreinigung	Desinfektionsmittel	Zeitpunkt: Probenahmeverfahren
Putenmast	1	28.05.2018 01.06.2018 03.06.2018	Hochdruckreiniger (Wasser 70 °C)	Aldecol DES 03 (EWABO)	VR: STP, AB, ATP, ATP <i>EB.</i> , Temp., r. F. NR: STP, AB, ATP, ATP <i>EB.</i> , Temp., r. F. ND: STP, AB, ATP, ATP <i>EB.</i> , Temp., r. F.
Putenmast	2	28.05.2018 01.06.2018 03.06.2018	Hochdruckreiniger (Wasser 70 °C)	Aldecol DES 03 (EWABO)	VR: STP, AB, ATP, ATP <i>EB.</i> , Temp., r. F. NR: STP, AB, ATP, ATP <i>EB.</i> , Temp., r. F. ND: STP, AB, ATP, ATP <i>EB.</i> , Temp., r. F.
Ferkelaufzucht	28	04.07.2018 06.07.2018 09.07.2018	Sprinkleranlage/ Schaum StallClean basis/ Hochdruckreiniger	DESINTEC® Peroxx Liquid (AGRAVIS)	VR: STP, SB, AB, ATP, ATP <i>EB.</i> , Temp., r. F. NR: STP, SB, AB, ATP, ATP <i>EB.</i> , Temp., r. F. ND: STP, SB, AB, ATP, ATP <i>EB.</i> , Temp., r. F.
Mastschwein	35	04.07.2018 06.07.2018 09.07.2018	Sprinkleranlage/ Schaum StallClean basis/ Hochdruckreiniger	DESINTEC® Peroxx Liquid (AGRAVIS)	VR: STP, SB, AB, ATP, ATP <i>EB.</i> , Temp., r. F. NR: STP, SB, AB, ATP, ATP <i>EB.</i> , Temp., r. F. ND: STP, SB, AB, ATP, ATP <i>EB.</i> , Temp., r. F.
Broilermast	1	28.08.2018 31.08.2018 04.09.2018	Hochdruckreiniger (Wasser 70 °C)	Aldecol DES 03 (EWABO)	VR: STP, AB, ATP, ATP <i>EB.</i> , Temp., r. F. NR: STP, AB, ATP, ATP <i>EB.</i> , Temp., r. F. ND: STP, AB, ATP, ATP <i>EB.</i> , Temp., r. F.
Broilermast	2	28.08.2018 31.08.2018 04.09.2018	Hochdruckreiniger (Wasser 70 °C)	Aldecol DES 03 (EWABO)	VR: STP, AB, ATP, ATP <i>EB.</i> , Temp., r. F. NR: STP, AB, ATP, ATP <i>EB.</i> , Temp., r. F. ND: STP, AB, ATP, ATP <i>EB.</i> , Temp., r. F.
Ferkelaufzucht	22	11.09.2018 14.09.2018 17.09.2018	Sprinkleranlage/ Schaum StallClean basis/ Hochdruckreiniger	DESINTEC® Peroxx Liquid (AGRAVIS)	VR: STP, SB, AB, ATP, ATP <i>EB.</i> , Temp., r. F. NR: STP, SB, AB, ATP, ATP <i>EB.</i> , Temp., r. F. ND: STP, SB, AB, ATP, ATP <i>EB.</i> , Temp., r. F.
Abferkelstall	11	11.09.2018 14.09.2018 17.09.2018	Sprinkleranlage/ Schaum StallClean basis/ Hochdruckreiniger	DESINTEC® Peroxx Liquid (AGRAVIS)	VR: STP, SB, AB, ATP, ATP <i>EB.</i> , Temp., r. F. NR: STP, SB, AB, ATP, ATP <i>EB.</i> , Temp., r. F. ND: STP, SB, AB, ATP, ATP <i>EB.</i> , Temp., r. F.
Mastschwein	30	11.09.2018 17.09.2018 19.09.2018	Sprinkleranlage/ Schaum StallClean basis/ Hochdruckreiniger	DESINTEC® Peroxx Liquid (AGRAVIS)	VR: STP, SB, AB, ATP, ATP <i>EB.</i> , Temp., r. F. NR: STP, SB, AB, ATP, ATP <i>EB.</i> , Temp., r. F. ND: STP, SB, AB, ATP, ATP <i>EB.</i> , Temp., r. F.
Putenmast	1	02.10.2018 05.10.2018 07.10.2018	Hochdruckreiniger (Wasser 70 °C)	Aldecol DES 03 (EWABO)	VR: STP, ATP <i>EB.</i> , Temp., r. F. NR: STP, AB, ATP, ATP <i>EB.</i> , Temp., r. F. ND: STP, AB, ATP, ATP <i>EB.</i> , Temp., r. F.
Putenmast	2	02.10.2018 05.10.2018 07.10.2018	Hochdruckreiniger (Wasser 70 °C)	Aldecol DES 03 (EWABO)	VR: STP, ATP <i>EB.</i> , Temp., r. F. NR: STP, AB, ATP, ATP <i>EB.</i> , Temp., r. F. ND: STP, AB, ATP, ATP <i>EB.</i> , Temp., r. F.
Broilermast	1	10.10.2018 12.10.2018 16.10.2018	Hochdruckreiniger (Wasser 70 °C)	Calgonit Sterizid AS (Calvatis)	VR: STP, ATP <i>EB.</i> , Temp., r. F. NR: STP, AB, ATP, ATP <i>EB.</i> , Temp., r. F. ND: STP, AB, ATP, ATP <i>EB.</i> , Temp., r. F.
Broilermast	2	10.10.2018 12.10.2018	Hochdruckreiniger (Wasser 70 °C)	Calgonit Sterizid AS (Calvatis)	VR: STP, ATP <i>EB.</i> , Temp., r. F. NR: STP, AB, ATP, ATP <i>EB.</i> , Temp., r. F.

Die Sockentupferprobe: Eine geeignete und standardisierbare Maßnahme zur Überprüfung der Flächendesinfektion im Stall?

		16.10.2018			ND: STP, AB, ATP, ATP <i>EB</i> , Temp., r. F.
Putenmast	1	12.02.2019 14.02.2019 17.02.2019	Hochdruckreiniger (Wasser 70 °C)	Aldecol DES 03 (EWABO)	VR: STP, ATP <i>EB</i> , Temp., r. F. NR: STP, AB, ATP, ATP <i>EB</i> , Temp., r. F. ND: STP, AB, ATP, ATP <i>EB</i> , Temp., r. F.
Putenmast	2	12.02.2019 14.02.2019 17.02.2019	Hochdruckreiniger (Wasser 70 °C)	Aldecol DES 03 (EWABO)	VR: STP, ATP <i>EB</i> , Temp., r. F. NR: STP, AB, ATP, ATP <i>EB</i> , Temp., r. F. ND: STP, AB, ATP, ATP <i>EB</i> , Temp., r. F.
Broilermast	1	04.04.2019 06.04.2019 09.04.2019	Hochdruckreiniger (Wasser 70 °C)	Aldecol DES 03 (EWABO)	VR: STP, ATP <i>EB</i> , Temp., r. F. NR: STP, AB, ATP, ATP <i>EB</i> , Temp., r. F. ND: STP, AB, ATP, ATP <i>EB</i> , Temp., r. F.
Broilermast	2	04.04.2019 06.04.2019 09.04.2019	Hochdruckreiniger (Wasser 70 °C)	Aldecol DES 03 (EWABO)	VR: STP, ATP <i>EB</i> , Temp., r. F. NR: STP, AB, ATP, ATP <i>EB</i> , Temp., r. F. ND: STP, AB, ATP, ATP <i>EB</i> , Temp., r. F.
Abferkelstall	3	24.05.2019 24.05.2019 25.05.2019	Hochdruckreiniger	VENNO® VET 1 MENNO	VR: STP, SB, ATP <i>EB</i> , Temp., r. F. NR: STP, SB, AB, ATP, ATP <i>EB</i> , Temp., r. F. ND: STP, SB, AB, ATP, ATP <i>EB</i> , Temp., r. F.
Ferkelaufzucht	22	28.06.2019 01.07.2019 04.07.2019	Sprinkleranlage/ Schaum StallClean basis/ Hochdruckreiniger	DESINTEC® Peroxx Liquid (AGRAVIS)	VR: STP, SB, ATP <i>EB</i> , Temp., r. F. NR: STP, SB, AB, ATP, ATP <i>EB</i> , Temp., r. F. ND: STP, SB, AB, ATP, ATP <i>EB</i> , Temp., r. F.
Broilermast	1	08.08.2019 13.08.2019 20.08.2019	Hochdruckreiniger (Wasser 70 °C)	Aldecol DES 03 (EWABO)	VR: STP, ATP <i>EB</i> , Temp., r. F. NR: STP, AB, ATP, ATP <i>EB</i> , Temp., r. F. ND: STP, AB, ATP, ATP <i>EB</i> , Temp., r. F.
Abferkelstall	3	15.08.2019 15.08.2019 16.08.2019	Hochdruckreiniger	VENNO® VET 1 MENNO	VR: STP, SB, ATP <i>EB</i> , Temp., r. F. NR: STP, SB, AB, ATP, ATP <i>EB</i> , Temp., r. F. ND: STP, SB, AB, ATP, ATP <i>EB</i> , Temp., r. F.

VR = Vor Reinigung; NR = Nach Reinigung; ND = Nach Desinfektion; STP = Sockentupferprobe; SB = Spaltenbodenprobe;
ATP = ATP Gesamtmessung; ATP *EB* = ATP aus Enterobacteriaceae; Temp. = Temperatur; r. F. = relative Feuchte;

Die Sockentupferprobe: Eine geeignete und standardisierbare Maßnahme zur Überprüfung der Flächendesinfektion im Stall?

Im Zuge der Probenahmen wurde vor der Nassreinigung auf den Einsatz von Abklatschplatten und dem ATP-Nachweis verzichtet, da die sehr hohen Flächenbelastungen zu diesem Zeitpunkt eine quantitative Auswertung mittels dieser Methoden nicht zulassen. Ergänzend zur Beschreibung im Antrag wurden zusätzliche Spaltentupfer in den Schweineställen eingesetzt. Spalten sind schwieriger zu reinigen und stellen eine potentielle Kontaktfläche für Tiere da. Es galt die Frage zu beantworten, inwiefern von der Beprobung der Oberflächen auch Rückschlüsse auf die Sauberkeit der Spalten gewonnen werden konnten.

Material und Methode

Sockentupferproben

Im Stallraum wurde ein steriles Sockentupferpaar mit frischen Handschuhen in einen Stomacherbeutel mit 10ml PBS-Tween 20 (steril) überführt und angefeuchtet. Dazu wurde der Stomacherbeutel mehrfach geknetet. Dann wurden am Startpunkt Überschuhe übergestreift, auf die dann die befeuchteten Socken gezogen wurden. Der Startpunkt in den Abteilen der Schweineställe war entweder die linke oder die rechte erste Bucht vom Stallgang aus gesehen. Dann wurde das Abteil angefangen auf der linken/rechten Seite durch die ersten Buchten bis zur Mitte abgeschritten. Es erfolgte der Seitenwechsel über den Abteilgang und das weitere Abschreiten der rechten/linken Buchten bis zum Ende des Abteils. Die Schrittzahlen wurden notiert und lagen in den Abteilen zwischen 25 und 49 Schritten. In Geflügelställen wurden die Stallabteile I und II jeweils einmal diagonal mit einem Sockentupferpaar abgeschritten. Die Schrittzahlen lagen zwischen 26 und 30 Schritten pro Abteildiagonale. Alle Proben wurden von derselben Person genommen, die bei der Beprobung desselben Abteils vor der Nassreinigung, nach der Nassreinigung und nach der Desinfektion exakt die gleiche Anzahl an Schritten durchführte. Nach dem letzten Schritt wurden die Sockentupfer zurück in den Stomacherbeutel überführt und anschließend in einer Kühlbox zum Labor transportiert.

Im Labor wurden die gekühlten Proben (4 °C) innerhalb von 24 Stunden aufgearbeitet. Zu jedem Sockentupferpaar im Stomacherbeutel wurden 240 ml steriler PBS-Tween 20 (0,01%) Puffer zugegeben. Durch die Vorlage von 10ml Puffer im Beutel wurde somit ein Endvolumen von 250 ml erreicht. Der aufgefüllte Stomacherbeutel wurde 2 min bei 240 rpm im Stomacher (Stomacher 400 Circulator, Seward Ltd. Worthing UK) durchgemischt. Die hohe Verdünnung mit Puffer diente gleichzeitig der Inaktivierung von evtl. vorhandenen Desinfektionsmittelrückständen nach der Beprobung desinfizierter Flächen. Für die quantitative Bestimmung der Mikroorganismen wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt und dreimal 100 µl auf verschiedenen Nährmedien, nach der Desinfektion auch 500 µl auf Selektivmedien, ausgespatelt. Es wurden Caso Agar (CM0131 Oxoid, Wesel), Galle- Aesculin- Azid Agar (SAFF06105 VWR, Hannover) und MacConkey Agar Nr.3 (CM0115 Oxoid, Wesel) für 24 bis 48 h bei 36 °C aerob bebrütet. Koloniezahlen zwischen

Die Sockentupferprobe: Eine geeignete und standardisierbare Maßnahme zur Überprüfung der Flächendesinfektion im Stall?

1 und 300 pro platte wurden für die Auswertung herangezogen. Bei mehr als einer auswertbaren Verdünnungsstufe wurde der gewichtete Mittelwert bestimmt. Von verdächtigen Enterokokken und *Escherichia coli* Bakterien wurden drei Isolate pro Probe auf Columbia Agar (Oxoid) als Reinkultur ausgestrichen und bei – 80°C in Cryoröhrchen (P730.2 Carl Roth, Karlsruhe) asserviert. Zur Differenzierung wurden von Enterokokken alle drei Isolate und von *Escherichia coli* ein Isolat pro Probe mittels Matrix–Assistierte Laser–Desorption–Ionisierung (MALDI) mit der Flugzeitanalyse (engl. time of flight, TOF) in einem Gerät von der Bruker Daltonik GmbH (Bremen) differenziert.

Zur Erhöhung der Sensitivität des *E. coli* Nachweises wurde ein Anreicherungsverfahren eingesetzt. Dazu wurden 10 ml Probeflüssigkeit mit 90 ml LB-Medium nach Luria/Miller (X968.1 Carl Roth, Karlsruhe) gemischt und bei 36°C 24 h lang bebrütet. Anschließend wurden mit einer 10 µl Öse (Sarstedt, Nümbrecht) aus der Anreicherung fraktioniert auf einen MacConkey Agar ausgestrichen. Die beimpften Platten wurden für 24 h bei 36°C aerob bebrütet. Danach wurden wie oben geschildert 3 verdächtige *E. coli* Isolate asserviert und zunächst eins davon identifiziert. Bei *E. coli* negativem Ergebnis wurde das jeweils nächste Isolat identifiziert.

Spaltenschwämmchenproben

Vor der Probenahme wurden 5 Schwämmchen (Whirl- Pak T263.2, Carl Roth, Karlsruhe) in ein Weihalsbecherglas eingebracht, mit 40 ml PBS-Tween20 (0,01%) versetzt und im Vakuumautoklaven bei leicht geöffnetem Deckel autoklaviert. Nach dem Abkühlen im Autoklaven wurde die Deckel verschlossen und die Gläser für die Probenahmen bereitgestellt. Vor Ort im Stall wurde jeweils ein Schwämmchen mit einer Arterienklemme (Peanklemme) fixiert und die Seiten und Unterkante der Spalte abgestrichen (**Abbildung 2**). Im Falle von Betonspalten wurden fünfmal eine große Spalte im Abteil beprobt und bei Kunststoff- bzw. Metallspalten wurden fünfmal sechs kleine Spalten im Abteil beprobt. Die jeweils fünf Schwämmchen wurden als Poolprobe in einen Stomacherbeutel überführt. Die Auswahl der Spalten erfolgte zufällig über das Abteil verteilt. Nach der Probenahme erfolgte der Transport und die Lagerung wie bei den Sockentupfern. Innerhalb von höchstens 24 h erfolgte die Aufarbeitung. In die Stomacherbeutel wurden 210 ml steriler PBS-Tween 20 (0,01%) hineingegeben (Endvolumen 250 ml Puffer). Der aufgefüllte Stomacherbeutel und dessen Inhalt wurde in gleicher Weise weiterbearbeitet und analysiert wie bei der Untersuchung der Sockentupferpaare.

Die Sockentupferprobe: Eine geeignete und standardisierbare Maßnahme zur Überprüfung der Flächendesinfektion im Stall?



Abbildung 2: Beprobung einer Spalte mit einem Schwämmchen mittels Arterienklemme (Peanklemme)

Abklatschproben

In den Abteilen von Schweinställen wurden 22 Caso+LTH (PO5172C Oxoid, Wesel) Kontaktplatten an verschiedenen Stellen im Abteilgang und in den Buchten auf die Bodenoberflächen aufgedrückt (2-3 Sekunden leicht angedrückt). Die Medien waren mit Lecithin, Tween 80 und Histidin supplementiert, um die Wirkung von Reinigungs- und Desinfektionsmittelrückständen zu neutralisieren. Im Geflügelstall wurden die 22 Platten ca. über den Stallraum verteilt eingesetzt. Nach der Probenahme wurde die Deckel der Platten mit Tesafilm fixiert und in einer Kühlbox zum Labor transportiert. Dort wurden die Platten unmittelbar für bis 48 h bei 36 °C bebrüten und ausgezählt. Die Auswertung wurde nach der Kategorisierung des IKB-System wie folgt durchgeführt:

Kategorie	KBE/Platte
0	0
1	1-40
2	41-120
3	> 120

\sum Kategorien / Anzahl Proben = Score

Für eine ordnungsgemäße R&D sollte der Score < 1,5 liegen (IKB-Norm).

ATP Proben

Es wurden 15 Tupfer für die ATP Gesamtverunreinigung (UltraSnap, Hygiena, medogen, Altenmünster) und fünf Tupfer für die ATP Belastung durch *Enterobacteriaceae* (MikroSnap EB, Hygiena, medogen, Altenmünster) pro Abteil für die Bewertung der Oberflächenkontamination eingesetzt. Dazu wurden pro Tupfer Bodenflächen von 10x10 cm mittels einer sterilen Kunststoffschablone abgestrichen. Die Tupferproben wurden in der Nähe der mittels Kontaktplatten beprobten Flächen genommen. Die einzelnen Probenahmeorte wurden in den Probenahmeprotokollen näher beschrieben. Nach dem Abstreichen der Oberflächen wurden die

Die Sockentupferprobe: Eine geeignete und standardisierbare Maßnahme zur Überprüfung der Flächendesinfektion im Stall?

Tupfer für die Gesamtbelastung unmittelbar vor Ort nach Angaben des Herstellers behandelt und im Messgerät (Manual EnSure, Hygiena, Medogen, Altenmünster) ausgelesen. Die Tupfer für die ATP Werte der *Enterobacteriaceae* wurden in einer Kühlbox zum Labor transportiert und anschließend bei 36 °C für 18-20 Stunden bebrütet und nach Angabe des Herstellers ausgewertet. Die Ergebnisse in relativen Lichteinheiten (RLU) wurden protokolliert und gespeichert. Im Falle der ATP Gesamtverunreinigung wurde für n = 15 Tupfer der arithmetische Mittelwert bestimmt und für die ATP Belastung durch *Enterobacteriaceae* wurde aus n = 5 Tupferproben der geometrische Mittelwert berechnet.

Temperatur und Luftfeuchte

Die Temperaturen und relativen Luftfeuchten wurde während der Untersuchungen ca. mittig in den Abteilen gemessen. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Sensoren nicht in unmittelbarer Zugluft oder im Lüftungsstrom stehen. Es wurde ein PCE Data Recorder Messgerät (PCE-THB 40, PCE, Meschede) für die Erfassung der Parameter verwendet. Die Werte wurden am Ende der Probenahme abgelesen und protokolliert. Die Luftfeuchten spielen für die Auswertung und Diskussion der in diesem Bericht dargestellten Ergebnisse keine weitere Rolle und werden nicht weiter aufgeführt.

Statistik

Für die Durchführung von statistischen Tests wurde das Programm SAS 9.4 (SAS Institute, Inc. Cary, NC, USA) verwendet.

4 Ergebnisse und Diskussion

Sockentupferproben aus Geflügelställen

Die Ausgangsbelastung (vor der Nassreinigung) der Sockentupferpaare lag in den Geflügelställen ca. zwischen 10^8 und 10^{11} KBE (Kolonie bildende Einheiten) mesophiler Gesamtkeime (**Abbildungen 3 und 4**). Bis auf eine Ausnahme (Probenahme 28.05./01.06.) zeigte sich bei allen anderen Probenahmen eine erwartete abgestufte Keimabnahme von der Ausgangsbelastung bis hin zum Zeitpunkt nach der Desinfektion. In den häufigsten Fällen wurden Keimabnahmen von ca. zwei bis drei Logstufen erreicht. Drei von 26 Differenzen zeigten Abnahmen von weniger als einer Logstufe und einmal stieg der Wert leicht an. Die Quantifizierung der Gesamtkeime aus den Sockentupfern lässt prinzipiell eine relative Bewertung der Flächenbelastung wie z.B. in Böhm (1998)² zu. Demnach hätten relativ zur beprobten Fläche die Keimzahlen bei sachgerecht durchgeführter Reinigung und Desinfektion um zweimal drei Logstufen sinken sollen. Eine Abnahme um drei Logstufen von einem Schritt zum nächsten wurde während der Untersuchungen in 7 Beprobungen (27%) erreicht.

Die Sockentupferprobe: Eine geeignete und standardisierbare Maßnahme zur Überprüfung der Flächendesinfektion im Stall?

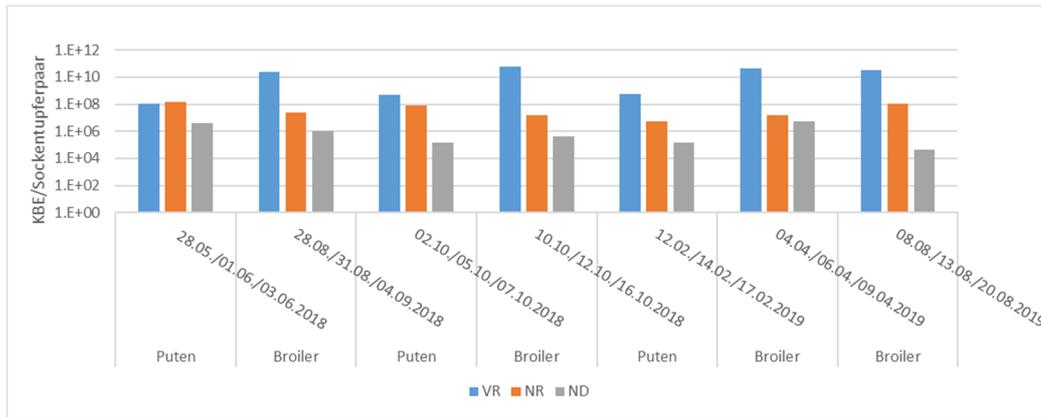


Abbildung 3: Gesamtkeimzahlen in Sockentupferproben vor der Nassreinigung (VR), nach der Nassreinigung (NR) und nach der Desinfektion (ND) in den Abteilen 1 einer Broiler- und Putenhaltung.

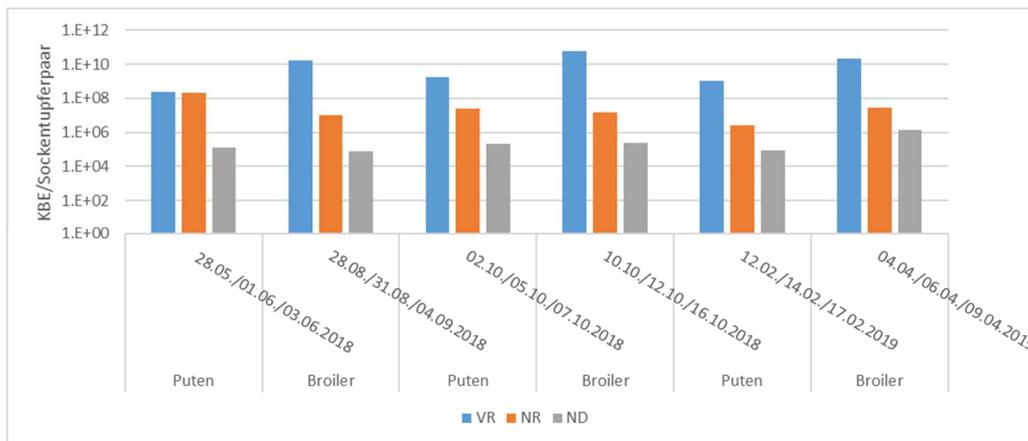


Abbildung 4: Gesamtkeimzahlen in Sockentupferproben vor der Nassreinigung (VR), nach der Nassreinigung (NR) und nach der Desinfektion (ND) in den Abteilen 2 einer Broiler- und Putenhaltung.

Die Konzentrationen der *Enterobacteriaceae* lagen auf denen noch nicht nass gereinigten Böden in Geflügelställen etwa zwischen 10^4 und 10^6 KBE pro Sockentupferpaar (**Abbildungen 5 und 6**). Auch wenn die Abstufungen zur Beurteilung des R&D Erfolges nach Böhm (1998)² schon durch zu geringe Ausgangsbelastungen nicht erreicht werden konnten, ließen sich die *Enterobacteriaceae* zumindest in den meisten Fällen quantifizieren. Dass es sich dabei tatsächlich weitgehend um Enterobakterien handelte, zeigten die MALDI-TOF Ergebnisse. Von vierzig Isolaten aus versch. Proben konnten alle eindeutig der Familie der *Enterobacteriaceae* zugeordnet werden. Neunundzwanzig davon gehörten zur Spezies *E. coli*. In neun von 13 Fällen (69%) waren nach erfolgter R&D keine Enterobakterien mehr nachweisbar. Das bedeutete quantitativ gesehen, dass die Anzahl an KBE unter der Nachweisgrenze von 167 KBE/Sockentupferpaar gelegen haben dürfte. Durch das Anreicherungsverfahren zum Nachweis von *E. coli* konnten aus 6 von 12 untersuchten Proben (50%) nach der Desinfektion *E. coli* kultiviert und mittels MALDI-TOF identifiziert werden. Das bestätigte, dass beim quantitativen

Die Sockentupferprobe: Eine geeignete und standardisierbare Maßnahme zur Überprüfung der Flächendesinfektion im Stall?

Verfahren in Proben kultivierbare Enterobakterien in Form von *E. coli* unterhalb der Nachweisgrenze vorkamen und entspricht der Erwartung, dass ein Anreicherungsverfahren im Nachweis empfindlicher ist als der Direktausstrich. Eine interessante Beobachtung wurde auch hinsichtlich des Vergleiches des Anreicherungsverfahrens zwischen dem Zeitpunkt nach der Reinigung und nach der Desinfektion gemacht. Sechs positiv beprobten Abteile nach der Desinfektion waren zuvor nach der Reinigung negativ. Dieses zunächst nicht plausible Ergebnis könnte mit einem kompetitiven Wachstum in der Anreicherung nach der Reinigung zusammenhängen, da nach der Reinigung noch deutlich mehr Keime in den Tupfern vorhanden waren und das Keimspektrum wahrscheinlich größer gewesen sein dürfte, was dann während der Anreicherung möglicherweise zu einer Unterdrückung von *E. coli* geführt haben könnte. In solchen Fällen würde sich die Bewertung basierend auf einem Anreicherungsverfahren als schwierig gestalten.

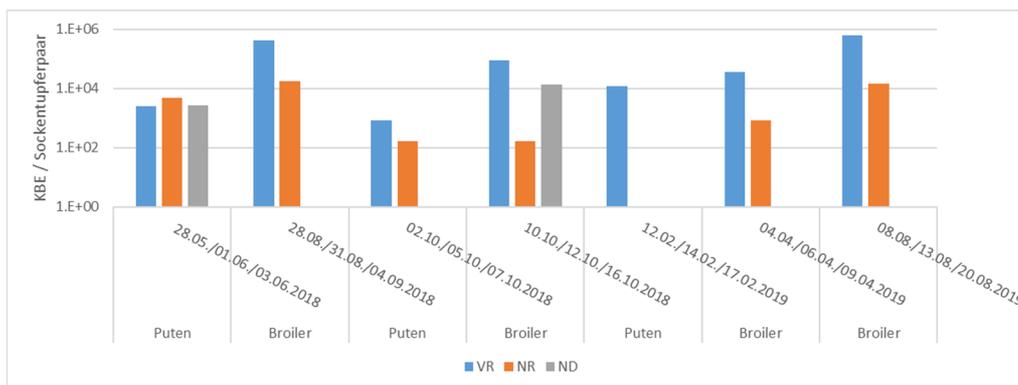


Abbildung 5: Enterobacteriaceae in Sockentupferproben vor der Nassreinigung (VR), nach der Nassreinigung (NR) und nach der Desinfektion (ND) in den Abteilen 1 einer Broiler- und Putenhaltung.

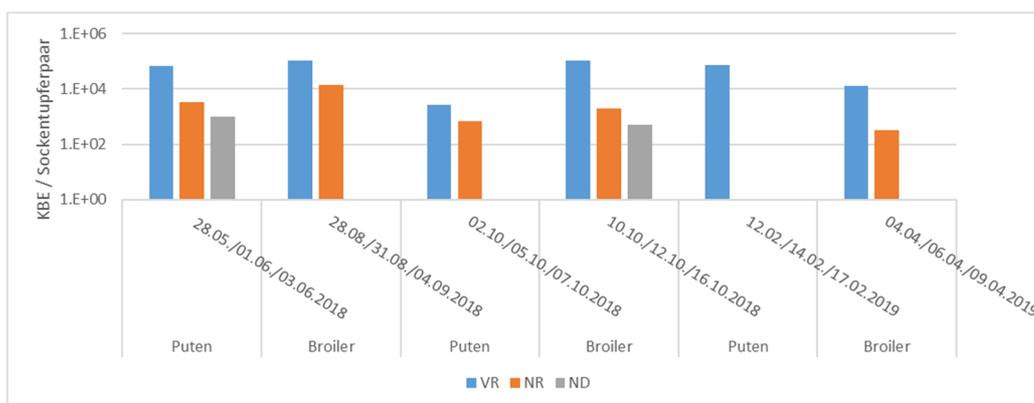


Abbildung 6: Enterobacteriaceae in Sockentupferproben vor der Nassreinigung (VR), nach der Nassreinigung (NR) und nach der Desinfektion (ND) in den Abteilen 2 einer Broiler- und Putenhaltung.

Bemerkenswert ist ferner, dass die quantitativ erhobenen Ergebnisse aus denen an den gleichen Tagen gereinigten und desinfizierten Abteilen 1 und 2 (**Abbildungen 5 und 6**) relativ gut

Die Sockentupferprobe: Eine geeignete und standardisierbare Maßnahme zur Überprüfung der Flächendesinfektion im Stall?

übereinstimmen, obwohl die Reinigung der Abteile von verschiedenen Personen durchgeführt wurde. Die Reinigung erfolgte nach denselben Vorgaben, wodurch Einflüsse durch verschiedene Personen auf die Ergebnisse vermutlich geringgehalten wurden.

Die in den **Abbildungen 7** und **8** dargestellten Keimkonzentrationen gingen aus der Auszählung von Äskulin spaltenden Kolonien vom Bile Äskulin Agar hervor, der z.B. als Selektivmedium für die Anzucht von Enterokokken eingesetzt wird. Aus den 69 ausgewerteten Proben wurden 21 verdächtige *Enterococcus* spp. mittels MALDI-TOF bestätigt. Etwa 70 % der Isolate entstammten nicht der Gattung *Enterococcus* spp. Die identifizierten Bakterien entstammten teilweise verschiedenen Ordnungen, wodurch eine genauere Eingruppierung nicht möglich war. Im Folgenden werden sie daher als grampositive Äskulinspalter bezeichnet.

Die Verläufe und Abstufungen in den **Abbildungen 7** und **8** stimmten mit den Ergebnissen aus der Gesamtkeimanalyse weitgehend überein, wobei die Gesamtkeimzahlen generell höher lagen. Beispielsweise lagen die Gesamtkeimzahlen nach der Desinfektion bei ca. 10^5 bis 10^6 KBE, während die grampositiven Äskulinspalter überwiegend zwischen 10^4 und 10^5 KBE angesiedelt waren. Wie bei den Gesamtkeimzahlen ist eine quantitative Beurteilung des R&D Erfolges über alle Stufen möglich. In insg. acht Fällen (entspricht 30% der Möglichkeiten) wurde durch die Reinigung oder durch die Desinfektion eine Reduktion um drei Logstufen erreicht.

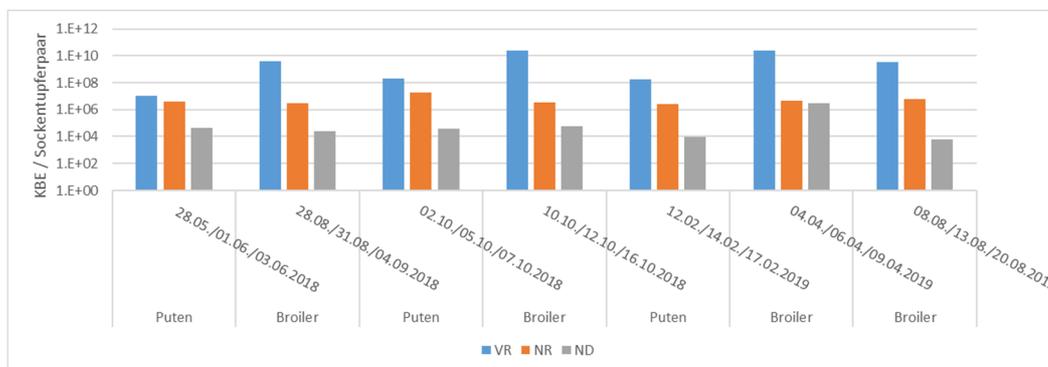


Abbildung 7: Grampositive Äskulinspalter in Sockentupferproben vor der Nassreinigung (VR), nach der Nassreinigung (NR) und nach der Desinfektion (ND) in den Abteilen 1 einer Broiler- und Putenhaltung.

Die Sockentupferprobe: Eine geeignete und standardisierbare Maßnahme zur Überprüfung der Flächendesinfektion im Stall?

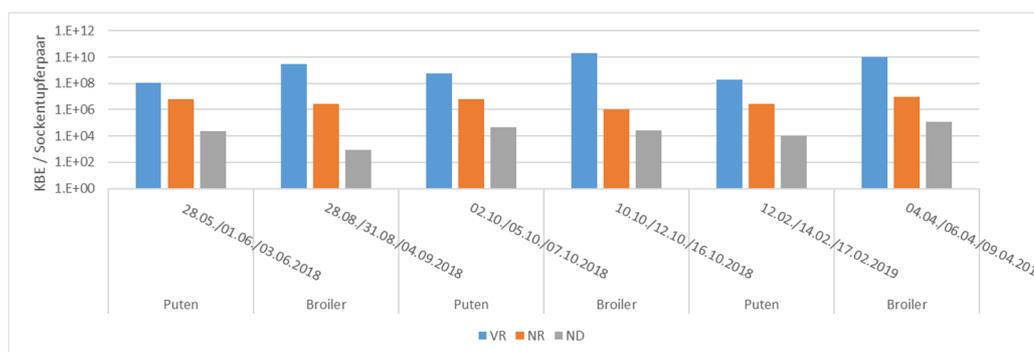


Abbildung 8: Grampositive Äskulinspalter in Sockentupferproben vor der Nassreinigung (VR), nach der Nassreinigung (NR) und nach der Desinfektion (ND) in den Abteilen 1 einer Broiler- und Putenhaltung.

Sockentupferproben aus Schweineställen

Die Belastungen der Sockentupferpaare mit Gesamtkeimen vor der Nassreinigung liegen in den Schweinhaltungen (**Abbildung 9**) etwa in den gleichen Größenordnungen wie in den untersuchten Geflügelhaltungen. Bei der Betrachtung der Differenzen wurde nur zweimal von 22 Möglichkeiten eine Reduktion um 3 Logstufen erreicht (entspricht 9% der Möglichkeiten). Es fällt auf, dass beim Schritt von der Nassreinigung zur Desinfektion die Keimzahlen nur einmal mehr um zwei Logstufen reduziert wurden und in einem Fall die Keimzahl wieder leicht anstieg. Ein Kältefehler konnte an diesem Tag (04.07.2019) ausgeschlossen werden (siehe Temperatur in **Abbildung 19**). In diesem Stall wurde mit einem hochalkalischen Schaumreiniger gereinigt und anschließend mit einem sauren Desinfektionsmittel desinfiziert (siehe **Tabelle 1**). Möglicherweise lag ein Neutralisationsfehler vor, verursacht durch eine nicht hinreichende Abspülung des Reinigungsschaumes. Die unzureichende Desinfektion spiegelte sich auch in den zunehmenden Zahlen von *Enterobacteriaceae* und grampositiven Äskulinspaltern (**Abbildungen 10 und 11**) wieder sowie in dem relativ hohen IKB-Score von 2,41 (**Tabelle 3**).

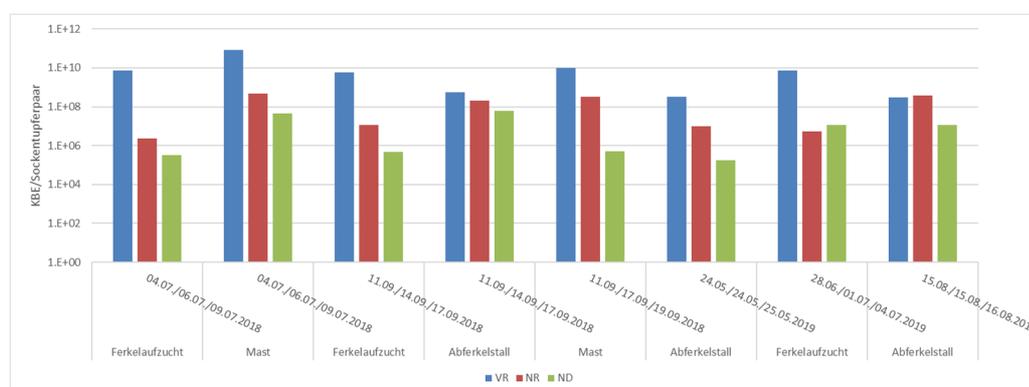


Abbildung 9: Gesamtkeimzahlen in Sockentupferproben vor der Nassreinigung (VR), nach der Nassreinigung (NR) und nach der Desinfektion (ND) in Schweinehaltungen.

Die Sockentupferprobe: Eine geeignete und standardisierbare Maßnahme zur Überprüfung der Flächendesinfektion im Stall?

Die Ergebnisse der *Enterobacteriaceae* aus den Sockentupfern der Schweinehaltungen unterschieden sich von denen aus den Geflügelställen. Auch hier wurde zunächst mittels MALDI-TOF bestätigt, dass es sich bei den ausgezählten Kolonien mit hoher Wahrscheinlichkeit um Enterobakterien handelte. Von 62 Isolaten aus versch. Proben entstammten alle der Familie der *Enterobacteriaceae*. In den Schweinehaltungen waren gegenüber den Geflügelhaltungen die *Enterobacteriaceae* nach der Desinfektion häufiger noch quantifizierbar und überstiegen teilweise die Konzentrationen, die nach der Nassreinigung bestimmt wurden, obwohl Desinfektionsmittel eingesetzt wurden die gegen *E. coli* hätten wirken sollen. Qualitativ wurde *E. coli* in sieben von acht Anreicherungen nach der Reinigung nachgewiesen und war weiter in sechs von acht Anreicherungen nach der Desinfektion gefunden worden. Warum *E. coli* hier immer noch relativ häufig gefunden wurde ist nicht klar. Möglicherweise waren die nach der Desinfektion noch kontaminierte Spalten (Abbildung 13) eine Quelle.

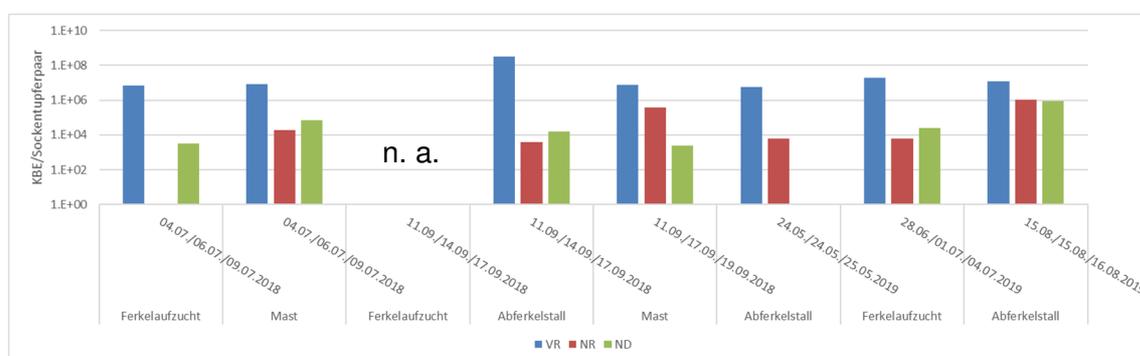


Abbildung 10: *Enterobacteriaceae* in Sockentupferproben vor der Nassreinigung (VR), nach der Nassreinigung (NR) und nach der Desinfektion (ND) in Schweinehaltungen. n. a. = nicht auswertbar.

Die Anzahl der grampositiven Äskulinspalter in den Sockentupfern (**Abbildung 11**) korrespondiert sehr gut mit den Konzentrationen der Gesamtkeime in **Abbildung 9**. Wie schon beim Geflügel, lagen die Konzentrationen deutlich unter denen der Gesamtkeimzahl. Beispielsweis betrug das geometrische Mittel der Gesamtkeimzahlen 3.27×10^9 KBE, während die grampositiven Äskulinspalter ein geometrisches Mittel von 2.52×10^8 KBE aufwiesen. Die Ausgangskonzentrationen und die Konzentrationen nach der Reinigung waren damit immer noch ausreichend hoch, um eine jeweilige Logreduktion von drei Stufen messen zu können. Diese wurde nur einmal durch eine Nassreinigung (01.07.2019, Ferkelaufzucht) erreicht.

Die Sockentupferprobe: Eine geeignete und standardisierbare Maßnahme zur Überprüfung der Flächendesinfektion im Stall?

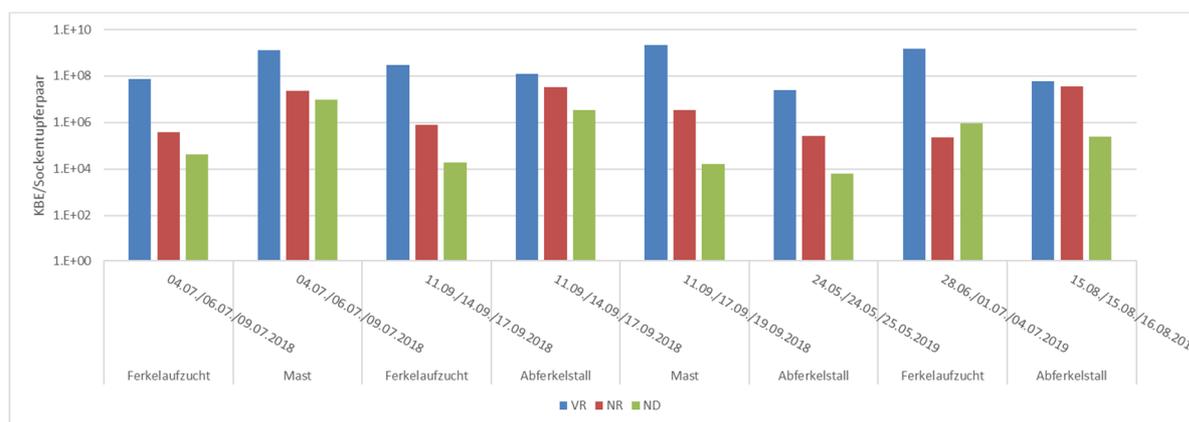


Abbildung 11: Grampositive Äskulinspalter in Sockentupferproben vor der Nassreinigung (VR), nach der Nassreinigung (NR) und nach der Desinfektion (ND) in Schweinehaltungen.

Im Vergleich zu den Gesamtkeimzahlen aus den Sockentupferproben, durch die zumindest immer eine klare Keimverringering vom Zeitpunkt vor der Reinigung bis zum Zeitpunkt nach der Desinfektion sichtbar war, war der R&D Erfolg bei der Beprobung der Spalten weniger oder gar nicht erkennbar (**Abbildung 12**). Da kontaminierte Spalten jedoch potentielle Kontaktflächen für die neu eingestellte oder umgestallte Tiere darstellen, kann eine Bewertung des R&D Erfolges der Stallböden mit Spaltenanteil durch die Sockentupferprobenahme in Frage gestellt werden. Obwohl die beprobten Spaltenflächen um ein einiges kleiner waren als die beprobten Stallbodenflächen (z.B. 5 Spalten vers. 30 Fußabdrücke), scheinen die gemessenen Konzentrationen der *Enterobacteriaceae* (**Abbildung 13**) in den Spalten relativ hoch. Daraus könnte auch geschlossen werden, dass die gründliche Spaltenreinigung und Desinfektion bei der Durchführung vernachlässigt wurde.

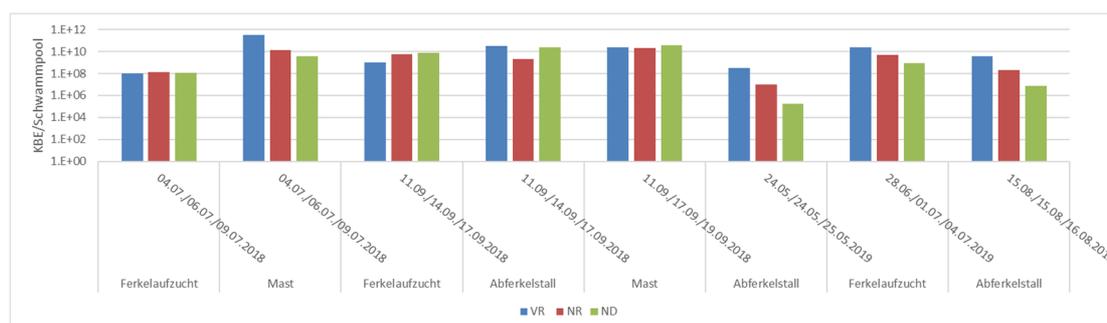


Abbildung 12: Gesamtkeimzahlen in Spaltenschwämmchen vor der Nassreinigung (VR), nach der Nassreinigung (NR) und nach der Desinfektion (ND) in Schweinehaltungen.

Die Sockentupferprobe: Eine geeignete und standardisierbare Maßnahme zur Überprüfung der Flächendesinfektion im Stall?

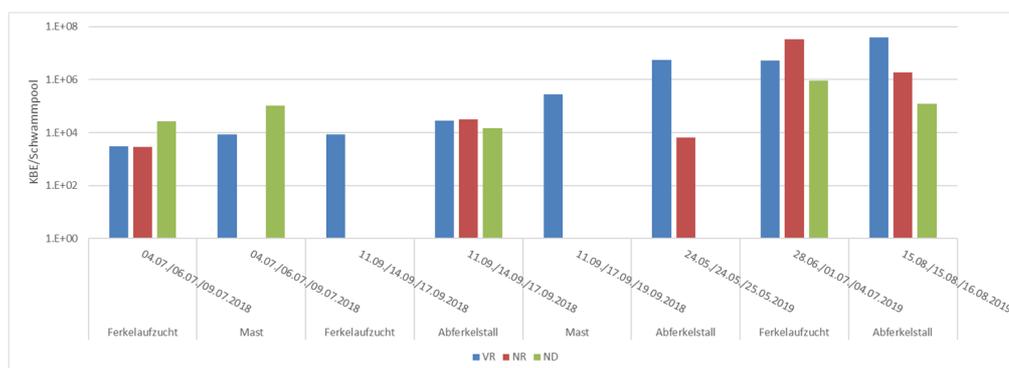


Abbildung 13: Enterobacteriaceae in Spaltenschwämmchen vor der Nassreinigung (VR), nach der Nassreinigung (NR) und nach der Desinfektion (ND) in Schweinehaltungen.

Eine deutlichere Abstufung durch die R&D konnte in den Spalten bei den grampositiven Äskulinspaltern festgestellt werden (**Abbildung 14**). Auch hier schienen die Konzentrationen verglichen mit den beprobten Bodenoberflächen sehr viel höher. Möglicherweise haben auch die benutzten Schwämmchen eine relativ hohe Keimaufnahmekapazität, wodurch der Vergleich rein auf die Fläche bezogen schwierig würde. Die isolierten und differenzierten grampositiven Äskulinspalter aus den Schweineställen gehörten überwiegend den Gattungen *Aerococcus* spp. und *Enterococcus* spp. an. Von 113 untersuchten Isolaten konnten 25% der Gattung *Enterococcus* spp. zugeordnet werden. Auffiel, dass bei den Spaltenuntersuchungen die Konzentrationen der grampositiven Äskulinspalter gemessen an den Gesamtkeimzahlen vor der Reinigung und nach der Reinigung einen relativ hohen Anteil besaßen. Nach der Desinfektion fiel dieser Anteil relativ zur Gesamtkeimzahl gesehen deutlich ab, was möglicherweise auf eine Verschiebung des Keimspektrums in den Spalten durch den Desinfektionsschritt hindeutete.

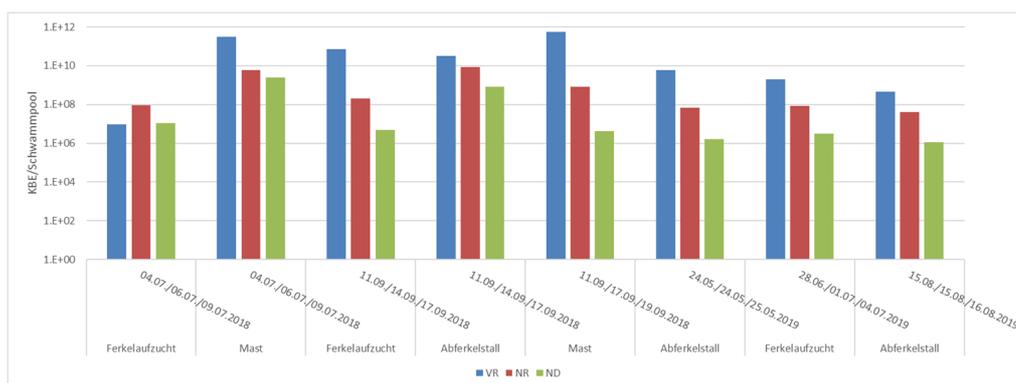


Abbildung 14: Grampositive Äskulinspalter in Spaltenschwämmchen vor der Nassreinigung (VR), nach der Nassreinigung (NR) und nach der Desinfektion (ND) in Schweinehaltungen.

Die Sockentupferprobe: Eine geeignete und standardisierbare Maßnahme zur Überprüfung der Flächendesinfektion im Stall?

Abklatschproben

Die ausgezählten Kontaktplatten haben eine Fläche von 25 cm² und lassen in Abhängigkeit von der Größe einzelner Kolonien eine Zählung von maximal 300 bis 400 KBE zu. Von den insgesamt 154 eingesetzten Kontaktplatten aus den Schweinehaltungen waren 142 (92%) nach der Nassreinigung überwachsen und nicht auswertbar. In den Geflügelhaltungen waren 279 (98%) von 286 Platten nach der Nassreinigung überwachsen und ebenfalls nicht auswertbar. Es ist bekannt, dass die Nassreinigung allein bereits zu signifikanten Keimreduktionen auf Oberflächen führt. Allerdings blieb die Ausgangsbelastung der hier untersuchten Oberflächen in den Abteilen von Schweine- und Geflügelställen offensichtlich so hoch, dass eine quantitative Keimabnahme von Reinigung zur Desinfektion nicht ermittelt werden konnte. Anders sah dies nach dem Schritt der Desinfektion aus. Hier konnten 98% der Kontaktplatten aus Geflügelställen und 85% der Kontaktplatten aus den Schweinehaltungen ausgezählt werden und dadurch für die Bewertung der Desinfektion ein Score nach dem IKB-System für alle untersuchten Abteile berechnet werden. **Tabelle 2** und **Tabelle 3** fassen die Scores aus Geflügel- und Schweinehaltungen zusammen.

Tabelle 2: IKB-Scores nach der Desinfektion in Geflügelhaltungen.

Datum	Haltung	Abteil	IKB-Score
03.06.2018	Putenmast	1	2,18
03.06.2018	Putenmast	2	1,45
04.09.2018	Broilermast	1	1,91
04.09.2018	Broilermast	2	1,32
07.10.2018	Putenmast	1	3,00
07.10.2018	Putenmast	2	2,59
16.10.2018	Broilermast	1	2,55
16.10.2018	Broilermast	2	2,73
17.02.2019	Putenmast	1	2,05
17.02.2019	Putenmast	2	2,59
09.04.2019	Broilermast	1	1,95
09.04.2019	Broilermast	2	1,50
20.08.2019	Broilermast	1	1,18

Tabelle 3: IKB-Scores nach der Desinfektion in Schweinehaltungen.

Datum	Haltung	Abteil	IKB-Score
09.07.2018	Ferkelaufzucht	28	1,09
09.07.2018	Mast	35	2,05
17.09.2018	Ferkelaufzucht	22	1,36

Die Sockentupferprobe: Eine geeignete und standardisierbare Maßnahme zur Überprüfung der Flächendesinfektion im Stall?

17.09.2018	Abferkelstall	11	2,27
19.09.2018	Mast	30	1,14
25.05.2019	Abferkelstall	3	1,68
04.07.2019	Ferkelaufzucht	22	2,41
16.08.2019	Abferkelstall	3	1,91

Anhand der Beurteilung durch den IKB-Score konnten im Geflügelbereich dreimal (Score < 1,5) in 13 Untersuchungen eine zufriedenstellende R&D erreicht werden. Im Schweinebereich ergaben drei von sieben Untersuchungen einen Score von < 1,5. Die höheren Score Werte beim Geflügel zeichnen sich auch bei der Berechnung der geometrischen Mittelwerte der Scores ab. In Geflügelställen ergab sich ein Mittelwert von 1,99 gegenüber einem Mittelwert von 1,67 in Schweineställen. Ob die verschiedenen Scores mit den mittels Tupferproben ermittelte Ausgangsbelastungen nach der Desinfektion in Zusammenhang stehen könnten, wurde anhand des Spearman Korrelationskoeffizienten (r_s) geprüft. Die Scores und Keimkonzentrationen aus den Sockentupferproben korrelierten nicht signifikant in Geflügelställen ($r_s = 0,20358$, $P = 0,50472$) und signifikant in Schweineställen ($r_s = 0,7619$, $P = 0,028$). Die Signifikanz im zweiten Fall ergibt sich allerdings nur aus $n = 8$ Vergleichen. Die Frage welche Methode den Desinfektionserfolg besser widerspiegelt, kann an dieser Stelle nicht beantwortet werden. Allerdings sollte berücksichtigt werden, dass beim Abklatsch im Grunde aus Zellaggregate nur eine Kolonie hervorgehen kann, während bei der Aufarbeitung der Sockentupfer Zellaggregate zerkleinert werden und somit i.d.R. höhere Zahlen an KBE erzeugt werden. Insofern wäre eine Korrelation zwischen den Werten der beiden Methoden nicht zu erwarten gewesen.

ATP Proben

Bei dem hier eingesetzten ATP-Test setzt eine Luciferase unter Verbrauch von ATP und Sauerstoff Luciferin um, wodurch eine messbare Farbreaktion hervorgerufen wird. Desto höher also die ATP Anteile in den untersuchten swabs, desto stärker das Lichtsignal, welches hier in relativen Lichteinheiten (relative light units (RLU)) angegeben wird. Da ATP Konzentrationen in Zusammenhang mit einer mikrobiellen Belastung von Oberflächen durch Mikroorganismen stehen können, hätte erwartet werden können, dass die RLU von Proben vor der Reinigung deutlich höher sein sollten als die RLU von Proben nach der Desinfektion. Bei den Untersuchungen vor Ort zeigte sich, dass die Proben vor der Nassreinigung z.T. stark mit Partikeln verschmutzt waren, was zu einer Störung der Lichtreaktion führte. Die Proben nach der Nassreinigung und nach der Desinfektion waren deutlich klarer und wurden ausgewertet (**Abbildung 15 und Abbildung 16**).

Die Sockentupferprobe: Eine geeignete und standardisierbare Maßnahme zur Überprüfung der Flächendesinfektion im Stall?

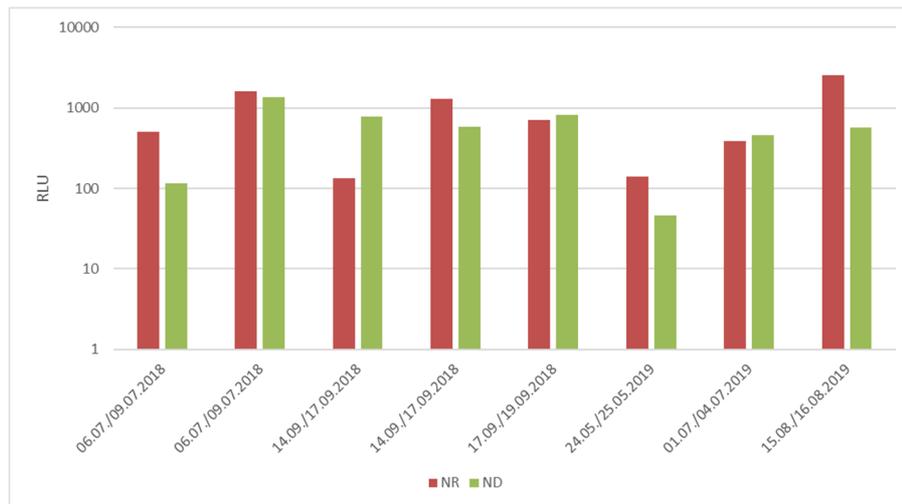


Abbildung 15: Ergebnisse der ATP Gesamtbelastung auf Schweinestallböden nach der Nassreinigung (NR) und nach der Desinfektion (ND).

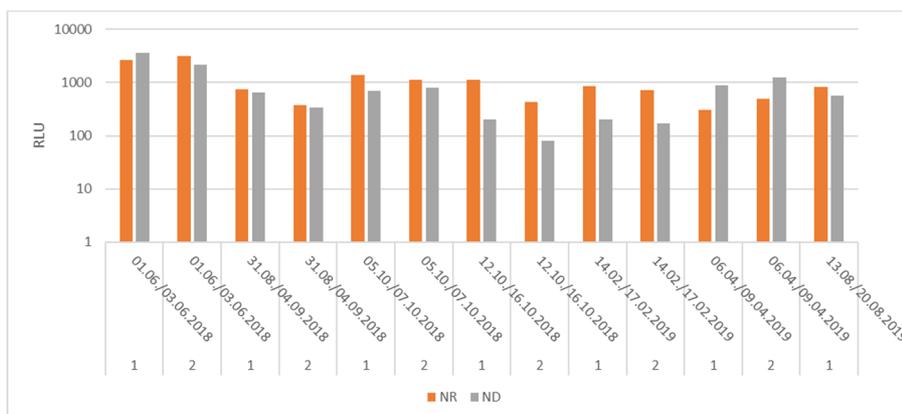


Abbildung 16: Ergebnisse der ATP Gesamtbelastung auf Geflügelstallböden (Abteile 1 und 2) nach der Nassreinigung (NR) und nach der Desinfektion (ND).

Die RLU-Werte aus den Schweinhaltungen und aus den Geflügelhaltungen zeigen keine eindeutigen Trends. Zwar sanken in den überwiegenden Untersuchungen die ATP Gehalte durch den Desinfektionsschritt, allerdings wurden auch jeweils dreimal in Schweineställen und Geflügelställen höhere RLU Werte gegenüber der Nassreinigung gemessen. Die Zunahme der ATP Werte stand wahrscheinlich nicht im Zusammenhang mit einer höheren Lebendkeimbelastung, da erwartungsgemäß an fünf der genannten Untersuchungstage die mittels Sockentupferproben ermittelten Gesamtkeimzahlen (**Abbildungen 3, 4 und 9**) nach der Desinfektion niedriger ausfielen. Ferner korrelierten die ATP Werte nach der Desinfektion nicht signifikant mit denen zu diesem Zeitpunkt ermittelten Keimzahlen aus den Sockentupferproben. Für die Proben aus Schweineställen ergab $r_s = 0,5476$ mit $P = 0,1600$ und für die Proben aus Geflügelställen ergab $r_s = 0,4121$ mit $P = 0,1618$.

Die Sockentupferprobe: Eine geeignete und standardisierbare Maßnahme zur Überprüfung der Flächendesinfektion im Stall?

Die ATP Belastung durch *Enterobacteriaceae* ergab in 60% (12/20) der Untersuchungen höhere Werte nach der Nassreinigung gegenüber dem Zeitpunkt vor der Reinigung. Da diese Proben im Labor angebrütet wurden, sind neben Einflüssen durch Schmutzpartikel auch kulturbedingte Einflüsse denkbar, die zu diesem nicht erwarteten Ergebnis geführt haben könnten. Danach konnte bis auf eine Ausnahme ein regelmäßiger und teilweise sehr deutlicher Abfall der RLU vom Zeitpunkt nach der Nassreinigung zum Zeitpunkt nach der Desinfektion beobachtet werden (**Abbildungen 17 und 18**). In vier Fällen wurde in Geflügelställen auf den Oberflächen kein ATP mehr gemessen. Interessanterweise gab es an diesen vier Tagen auch keine kulturellen Nachweise von Enterobakterien im Direktausstrich aus den Sockentupferproben. Das deutet auf einen Zusammenhang zwischen Oberflächenkontamination durch kultivierbare Enterobakterien und den ATP Werten von Enterobakterien hin. Eine statistische Bestätigung dieser Zusammenhänge kam nicht in Betracht, da in 50% der Untersuchungen nach der Desinfektion keine kultivierbaren *E. coli* quantitativ nachweisbar waren.

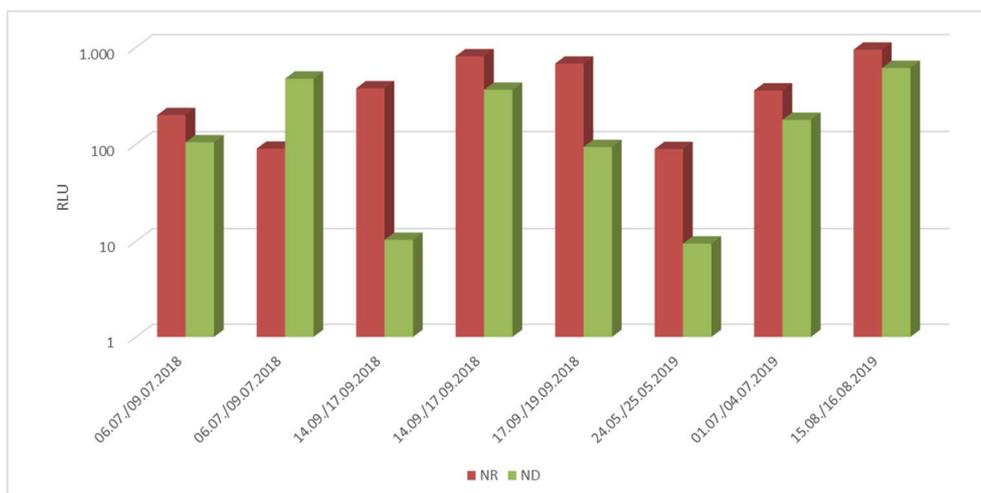


Abbildung 17: Ergebnisse der ATP Belastung durch Enterobakterien auf Schweinestallböden nach der Nassreinigung (NR) und nach der Desinfektion (ND).

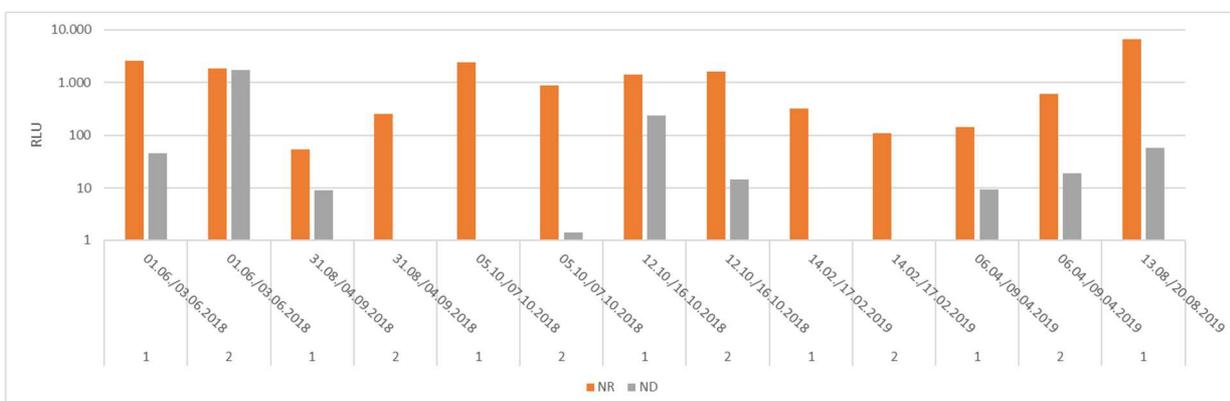


Abbildung 18: Ergebnisse der ATP Belastung durch Enterobakterien auf Geflügelstallböden (Abteile 1 und 2) nach der Nassreinigung (NR) und nach der Desinfektion (ND).

Die Sockentupferprobe: Eine geeignete und standardisierbare Maßnahme zur Überprüfung der Flächendesinfektion im Stall?

Temperaturmessungen

Zu allen Probenahmezeitpunkten wurde die Temperatur in den Schweine- und Geflügelhaltungen gemessen, um auf etwaige Temperaturfehler rückschließen zu können. Die Temperaturmessungen fanden durch die Probenahme versetzt zur jeweiligen Maßnahme statt, ließen aber eine Abschätzung des Temperaturbereiches zu, in dem die Reinigung und Desinfektion erfolgte. Demnach konnten Kältefehler bei den eingesetzten Desinfektionsmitteln während der Untersuchungen in den Schweine- und Geflügelhaltungen weitgehend ausgeschlossen werden, denn die Temperaturbereiche zwischen den Zeitpunkten nach der Reinigung (NR) und nach der Desinfektion (ND) in den **Abbildungen 18** und **19** lagen in allen Fällen über 10 °C lagen.

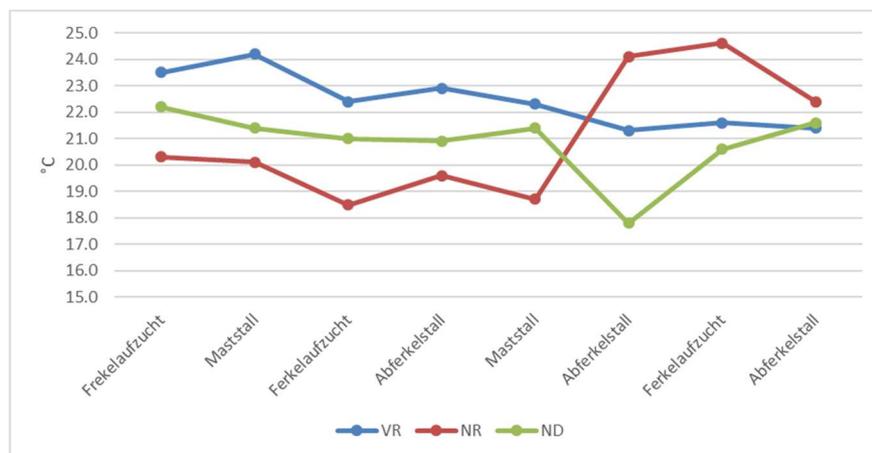


Abbildung 19: Temperaturen in Schweinhalten während der Probenahmen vor der Reinigung (VR), nach der Reinigung (NR) und nach der Desinfektion (ND).



Abbildung 20: Temperaturen in den Geflügelhaltungen (Abteile 1 und 2) während der Probenahmen vor der Reinigung (VR), nach der Reinigung (NR) und nach der Desinfektion (ND).

Die Sockentupferprobe: Eine geeignete und standardisierbare Maßnahme zur Überprüfung der Flächendesinfektion im Stall?

Vergleich der Probenahmeverfahren

Die folgende Übersicht in der Tabelle vergleicht nur den Desinfektionserfolg, da das Scoring nach dem IKB-System darauf abgestellt ist und die Analysen der ATP-Bestimmungen für vorige Schritte nicht geeignet waren. Hinsichtlich der ATP-Belastung durch Enterobakterien wurde hier festgelegt, dass eine erfolgreiche Desinfektion dann stattgefunden hat, wenn die RLU kleiner 1 betrug. Die Reduktionen der Gesamtkeimzahlen und der grampositiven Äskulinspalter galten als erfolgreich, wenn die Keimzahlen nach der Reinigung und nach der Desinfektion eine Verringerung um drei Logstufen aufwiesen. Bezüglich des Nachweises von Enterobakterien in den Sockentupfern galt kein Wachstum im Direktausstrich als hinreichende Desinfektion. **Tabelle 4** fasst die Ergebnisse der Bewertung von 21 Desinfektionen in Geflügel- und Schweinehaltungen zusammen.

Tabelle 4: Erfolg (+) oder Misserfolg (-) der Desinfektion, beurteilt nach dem IKB Score, nach dem ATP Nachweis von Enterobakterien (Enterob.), nach der Gesamtkeimzahl (GKZ) in Sockentupfern, nach den grampositiven Äskulinspaltern (gpÄ) in Sockentupfern und nach dem Vorkommen von Enterobakterien in Sockentupfern durch den Direktausstrich.

Datum	Haltung	Abteil	IKB-Score	ATP Enterob.	GKZ Socken	Enterob. Socken	gpÄ Socken
03.06.2018	Putenmast	1	-	-	-	-	-
03.06.2018	Putenmast	2	+	-	+	-	-
04.09.2018	Broilermast	1	-	-	-	+	-
04.09.2018	Broilermast	2	+	+	-	+	+
07.10.2018	Putenmast	1	-	+	-	+	-
07.10.2018	Putenmast	2	-	-	-	+	-
16.10.2018	Broilermast	1	-	-	-	-	-
16.10.2018	Broilermast	2	-	-	-	-	-
17.02.2019	Putenmast	1	-	+	-	+	-
17.02.2019	Putenmast	2	-	+	-	+	-
09.04.2019	Broilermast	1	-	-	-	+	-
09.04.2019	Broilermast	2	-	-	-	+	-
20.08.2019	Broilermast	1	+	-	+	+	+
09.07.2018	Ferkelaufzucht	28	+	-	-	-	-
09.07.2018	Mast	35	-	-	-	-	-
17.09.2018	Ferkelaufzucht	22	+	-	-	n. a.	-
17.09.2018	Abferkelstall	11	-	-	-	-	-
19.09.2018	Mast	30	+	-	-	-	-
25.05.2019	Abferkelstall	3	-	-	-	+	-
04.07.2019	Ferkelaufzucht	22	-	-	-	-	-
16.08.2019	Abferkelstall	3	-	-	-	-	-

n. a. = nicht auswertbar

Die Sockentupferprobe: Eine geeignete und standardisierbare Maßnahme zur Überprüfung der Flächendesinfektion im Stall?

Die Übersicht zeigt insgesamt, dass nach der beschriebenen Bewertung überwiegend kein Desinfektionserfolg erreicht werden konnte. Lediglich der quantitative *E. coli* Nachweis in den Sockentupfern ergaben in 50% einen Desinfektionserfolg, gefolgt vom IKB-Score mit einer 29% Erfolgsquote. Die anderen Verfahren blieben noch darunter. Auffällig war, dass beim Erreichen einer Verminderung von drei Logstufen (GKZ und gpÄ) mindestens ein anderes Verfahren ebenfalls zu einer positiven Bewertung kam. Die Tendenz ist jedoch nicht eindeutig und die Übereinstimmungen zwischen den einzelnen Verfahren erscheint insgesamt eher gering. Die höchste Übereinstimmung wurde zwischen dem ATP Nachweis der Enterobakterien und dem Enterobakteriennachweis in den Sockentupfern gefunden, was gewissermaßen logisch erscheint, da in beiden Verfahren die gleiche Gruppe von Bakterien gezielt kultiviert wurde. Die Erstellung einer Vierfeldertafel und die Durchführung von Fisher´s exact Test ergab ein $P > 0,05$. Demnach war der angedeutete Zusammenhang nicht signifikant.

Ziel dieses Vorhabens war die Eignung des Sockentupfers zur Überprüfung der R&D zu prüfen und mit anderen Verfahren zu vergleichen. Ferner sollten Fäkalbakterien als mögliche Indikatorbakterien zur Bewertung der Oberflächenhygiene erfasst werden und es sollten Vor- und Nachteile der verschiedenen in der Praxis eingesetzten Verfahren herausgestellt werden. Der Vergleich der in diesem Vorhaben eingesetzten Verfahren und die Beschreibung der Vor- und Nachteile der Verfahren ist in **Tabelle 5** zusammengefasst.

Tabelle 5: Die zur Überprüfung des R&D Erfolges auf Stallböden eingesetzten Verfahren im Vergleich.

Verfahren	Vorteile des Verfahrens	Nachteile des Verfahrens
Sockentupfer	<ul style="list-style-type: none"> - Einfache und schnelle Durchführung vor Ort - Beprobung großer Flächen möglich - Neutralisation von Wirkstoffrückständen möglich - quantitative und qualitative Analysen möglich - Bewertungskriterien für R&D Erfolg liegen vor - hohe Ausgangsbelastung messbar und Reinigungserfolg überprüfbar - Gesamtkeimzahlen und Indikatororganismen messbar 	<ul style="list-style-type: none"> - möglichst gleiche Person für eine vorher, nachher Untersuchung - Vorbereitung der Probenahme im Labor - Aufarbeitung der Proben und Kultivierung im Labor - Ergebnis nach 48 h. - erfahrenes Personal für die Identifizierung von Indikatorkeimen nötig - mind. zwei Probenahmetermine für eine

Die Sockentupferprobe: Eine geeignete und standardisierbare Maßnahme zur Überprüfung der Flächendesinfektion im Stall?

		<p>Bewertung (Differenzbildung erforderlich)</p> <ul style="list-style-type: none"> - R&D Erfolg in Spalten nicht überprüfbar
Spaltenschwämmchen	<ul style="list-style-type: none"> - Quantitative und qualitative Aussage über den R&D Erfolg in Spalten möglich - hohe Ausgangsbelastungen von Gesamtkeimzahlen und Indikatororganismen messbar 	<ul style="list-style-type: none"> - nur Aussage über Spaltenhygiene - weitere Nachteile wie beim Sockentupfer, abgesehen von Durchführung durch eine Person
Abklatschproben	<ul style="list-style-type: none"> - keine Vorarbeiten im Labor - einfache Durchführung vor Ort - Fehler durch Wirkstoffrückstände durch Inaktivierende Substanzen vermeidbar - einfache Auswertung im Labor - Bewertungskriterien für Desinfektionserfolg vorhanden 	<ul style="list-style-type: none"> - keine hohen Ausgangsbelastungen messbar - hohe Probenzahl für Aussagekräftiges Ergebnis nötig - Reinigungsschritt nicht überprüfbar - Auswertung im Labor nach 48 h
ATP-Gesamt	<ul style="list-style-type: none"> - einfache Durchführung und schnelles Ergebnis vor Ort - kein Labor notwendig 	<ul style="list-style-type: none"> - Beprobung kleiner Flächen - ATP Quellen aus nicht kultivierbaren Zellen oder Pflanzenzellen erschweren Rückschlüsse auf KBE - Störung der Lichtmessung durch Schmutzpartikel - Evaluierung schwierig - Bewertungskriterien für Tierhaltungen nicht vorhanden
ATP-Enterobakterien	<ul style="list-style-type: none"> - einfache Durchführung vor Ort - gezielte ATP-Quelle - einfache Handhabung im Labor 	<ul style="list-style-type: none"> - Beprobung kleiner Flächen - Störung der Lichtmessung durch Schmutzpartikel - Evaluierung notwendig

Die Sockentupferprobe: Eine geeignete und standardisierbare Maßnahme zur Überprüfung der Flächendesinfektion im Stall?

	- Ergebnis nach 8 Stunden im Labor möglich	- Bewertungskriterien für Tierhaltungen nicht vorhanden
--	---	---

Die Ergebnisse des Vorhabens zeigten, dass mit der Sockentupferprobenahme ein Verfahren zur Verfügung steht, dass zur Beurteilung des R&D Erfolges auf unstrukturierten Stallobertflächen geeignet ist. Zur Bewertung der Hygienemaßnahmen bei strukturierten Böden wie Spaltenböden, scheint das Verfahren weniger geeignet, da beispielsweise die mikrobiellen Kontaminationen in den Spalten nicht erfasst werden. Der generell für Stallobertflächen wie z.B. Betonböden oder Holz anspruchsvolle Bewertungsmaßstab (Böhm 1998)², der vorgibt das nach Reinigung und nach Desinfektion die Lebendkeimzahlen jeweils um drei Logstufen gesenkt vorliegen sollten, schien bezüglich der in diesem Projekt erhobenen Ergebnisse hohe Anforderungen an Reiniger und Desinfektoren zu stellen. Es gibt keine Veranlassung anzunehmen, dass das Verfahren, welches die Keimzahlen relativ zueinander maß, den R&D Erfolg unterschätzte. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass eine rasche Kontamination der Oberflächen durch Stallstäube oder Umgebungsstäube nach den Maßnahmen, die Ergebnisse beeinflusste.

Ferner kann die Beurteilung von Indikatororganismen durchaus sinnvoll sein. Beispielsweise wenn Enterobakterien wie Salmonellen oder potentielle Durchfallerreger wie pathogene *E. coli* möglichst nicht nachweisbar sein sollten. Ein Vorteil der Probenahme ist, dass durch die Aufarbeitung der Sockentupfer verschiedene Mikroorganismen gleichzeitig untersucht werden können.

Das Abklatschverfahren mit Anwendung des IKB-Scores scheint ebenfalls für glatte bzw. geschlossenen Ebene Flächen geeignet, wenn die Desinfektionsmaßnahme geprüft werden soll. Die Keimreduktion durch die Desinfektionsmaßnahme kann allerdings nicht gemessen werden, da die Ausgangsbelastungen nach der Nassreinigung auf den Bodenoberflächen in Tierhaltungen für Abklatschmedien zu hoch sind. Leider fehlt es an epidemiologische Daten, die den gemessenen Erfolg der R&D z.B. mit dem Auftreten von Erregern oder Krankheiten in Nutztierbeständen gegenüberstellen. Bezogen auf die Sockentupferprobe, kann derzeit keine Empfehlung darüber gegeben werden, welches der beiden Verfahren zur Überprüfung der Desinfektionsmaßnahme eingesetzt werden sollte. Wie bereits angedeutet, könnte das Abklatschverfahren die Zahlen kultivierbarer Bakterien von Stallböden unterschätzen.

Die Gesamt ATP Bestimmung als Schnelltest vor Ort scheint insgesamt weniger geeignet, um R&D Maßnahmen in Ställen zu prüfen. Möglicherweise könnte eine Methoden Anpassung zu einer Reduktion von Störfaktoren und damit zu besseren Ergebnissen führen. Wird dagegen ATP von einer speziellen Gruppe von Mikroorganismen nach der Probenahme im Labor detektiert, scheint eine Bewertung möglich. Allerdings fehlt es an Bewertungskriterien und weitere Studien wären notwendig, um die Eignung des Testes genauer zu bewerten.

Die Sockentupferprobe: Eine geeignete und standardisierbare Maßnahme zur Überprüfung der Flächendesinfektion im Stall?

Die Anwendung von Spaltenschwämmchen ergeben lediglich Informationen zur Spaltenkontamination, können jedoch quantitativ bewertet werden und könnten zumindest als ergänzende Methode zur Bewertung des R&D Erfolges von Spaltenböden eingesetzt werden.

Als Fazit bleibt, dass nach wie vor kulturelle Methoden die Verfahren der Wahl sind, wenn es um die Beurteilung mikrobieller Kontaminationen auf Flächen in Nutztierställen geht. Es wird allerdings empfohlen, dass weiter an nicht kulturell basierten Verfahren zur Beurteilung der Oberflächenkontamination gearbeitet wird. Aufgrund der häufig eng getakteten Zeitpläne, ist es beispielsweise nachteilhaft, wenn ein Ergebnis erst nach 48 Stunden Bebrütung im Labor erhalten werden kann, weil dann die Zeit knapp werden könnte eine Hygienemaßnahme vor der Ankunft neuer Tiere sachgerecht zu wiederholen. Eine neue Generation von Detektionsverfahren und Geräten zur Detektion von Bakterien und Viren, die auch vor Ort eingesetzt werden können, sind auf den Markt gekommen und in der Weiterentwicklung. Es wird daher vorgeschlagen Probenahmeverfahren zur Beurteilung von Stalloberflächen so anzupassen und weiterzuentwickeln, dass die angesprochenen Verfahren für die Beurteilung im Stall eingesetzt werden können. Ein schnellere vor Ort Überprüfung hätte das Potential, dass Reiniger und Desinfektoren, seien es nun private oder gewerblich Durchführende, ihre Methode evaluieren und die Bewertung noch vor Ort dokumentieren könnten um zu bescheinigen, dass sie sachgerechte Arbeit geleistet haben, was z.B. für Qualitätsnachweise von Bedeutung sein könnte.

5 Verwertung der Ergebnisse und Ausblick

Die Ergebnisse und Erkenntnisse dieses Vorhabens werden zukünftig Bestandteil der Lehre an der Tierärztlichen Hochschule Hannover sein. Ferner sind umfangreich Daten erhoben worden, die für die Erstellung eines Fachartikels in einer wissenschaftlichen Fachzeitschrift (peer reviewed) genutzt werden sollen. Die Idee der Weiterentwicklung eines Schnelldetektionsverfahrens auf molekularbiologischer Basis (Chiptechnik) zur Überprüfung der Hygiene in Tierhaltungen ist von wirtschaftlicher Seite inzwischen an uns herangetragen worden. Derzeit wird nach einer Fördermöglichkeit gesucht, da die Probenahme und Detektion von spezifischen Mikroorganismen an die Anforderungen in Tierhaltungen angepasst werden müssen.

6 Literaturverzeichnis

- 1 Van Hoorebeke, S. *et al.* Determination of the within and between flock prevalence and identification of risk factors for Salmonella infections in laying hen flocks housed in conventional and alternative systems. *Preventive Veterinary Medicine* **94**, 94-100, doi:10.1016/j.prevetmed.2009.11.022 (2010).
- 2 Böhm, R. Disinfection and hygiene in the veterinary field and disinfection of animal houses and transport vehicles. *International Biodeterioration & Biodegradation* **41**, 217-224, doi:[https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(98\)00030-4](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(98)00030-4) (1998).

Die Sockentupferprobe: Eine geeignete und standardisierbare Maßnahme zur Überprüfung der Flächendesinfektion im Stall?

- 3 Luyckx, K. *et al.* Comparison of sampling procedures and microbiological and non-microbiological parameters to evaluate cleaning and disinfection in broiler houses. *Poultry science* **94**, 740-749, doi:10.3382/ps/pev019 (2015).
- 4 Schulz, J. *et al.* Longitudinal Study of the Contamination of Air and of Soil Surfaces in the Vicinity of Pig Barns by Livestock-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Applied and Environmental Microbiology* **78**, 5666-5671 (2012).