



Curea Medical GmbH

Zum Eichberg 2

37339 Berlingerode



**Akkreditiertes analytisches
Labor und Beratungsstelle**
Humboldtallee 34A
D-37073 Göttingen

Dr. med. Ulrich Schmelz
Tel.: 05 51 / 39 4973
E-Mail: Ullischmelz@aol.com

Labor:
Telefon: 05 51 / 39-4970
Fax: 05 51 / 39-4957

Datum: 25. Mai 2011

Prüfbericht – Fachgutachten

Mikrobiologische Validierung "curea P2" – Wundverband für die Granulationsphase der Wunde

1. Einführung und Fragestellung:

Das Produkt "curea P2" ist eine Entwicklung der Firma Curea Medical GmbH. Das Produkt besteht aus einer flüssigkeitsdurchlässigen Wundaufлагeschicht in Form einer trichterförmig perforierten (ca. 300µm Porenweite) Polyethylen-Folie (PE), einem Resorptionskern, der einen Gelbildner enthält, sowie einer flüssigkeitsdichten, dampfdurchlässigen Deckschicht (BTBS = breathable textile backsheet; mikroporöses PP -PE-Laminat). Das Produkt ist einzeln in einer Sterilgutverpackung aus Papier verpackt und mittels Ethylenoxid sterilisiert.

Im Rahmen dieses Fachgutachtens soll der Wundverband "curea P2" mikrobiologisch vor dem Hintergrund folgender Fragestellungen validiert werden:

- ? **Bestimmung der mikrobiologischen Retentionsleistung des Produktes nach Resorption einer Keimsuspension:**
 - o Nach Resorption einer Keimsuspension wird die Keimlast im Gel mit der Keimlast der Ausgangssuspension verglichen. Sofern das Produkt eine adäquate Resorptionsleistung zeigt, ist die Keimlast im Gel näherungsweise gleich der Keimlast in der Ausgangssuspension.
- ? **Bestimmung des Sperrvermögens des Produktes**
 - o Ein Resorptionskissen wird maximal mit einer Keimsuspension von der Wundaufлагeseite beaufschlagt. Nach einer Wartezeit von 1 Stunde darf auf der Deckschicht (BTBS) im Abklatschverfahren kein Mikroorganismus nachweisbar sein.

- ? **Bestimmung des logarithmischen Reduktionsfaktors (Reduktionsleistung) der BTBS-Deckschicht des Produktes:**
 - o Die BTBS-Deckschicht des Produktes wird als "Filter" im Rahmen einer Vakuumfiltration eingesetzt. Nach Beaufschlagung mit Keimsuspension und Filtration wird die Keimlast der Ausgangssuspension mit der Keimlast im Filtrat verglichen. Es soll eine Sterilfiltration erreicht werden.
- ? **Bestimmung des Widerverkeimungspotentials des Produktes**
 - o Nach Beaufschlagung mit einer Keimsuspension wird das Produkt über 4 Tage bei 36°C inkubiert. Sofern die Keimzahl im Resorptionskern im Vergleich zur Keimzahl der Ausgangssuspension nicht angestiegen ist, kann davon ausgegangen werden, daß das Produkt keine Stoffe enthält, die von Mikroorganismen als Substrat verwendet werden können.

Als Testkeime werden Escherichia coli und Staphylococcus aureus mit Methicillin -Resistenz (MRSA) eingesetzt.

- ? Escherichia coli wird von der DSMZ in Braunschweig bezogen (DSMZ-Stamm 1058)
- ? Staphylococcus aureus mit Methicillin -Resistenz stammt aus Klinik - Isolaten, die mittels biochemischer Differenzierung und Analyse des Protein -Spektrums (MALDI-TOF) identifiziert werden.

Sämtliche Untersuchungen werden jeweils dreifach parallel durchgeführt. Im vorliegenden Gutachten werden jeweils die Mittelwerte der drei Ansätze als Ergebnis dargestellt.

2. Material und Methoden:

2.1 Material:

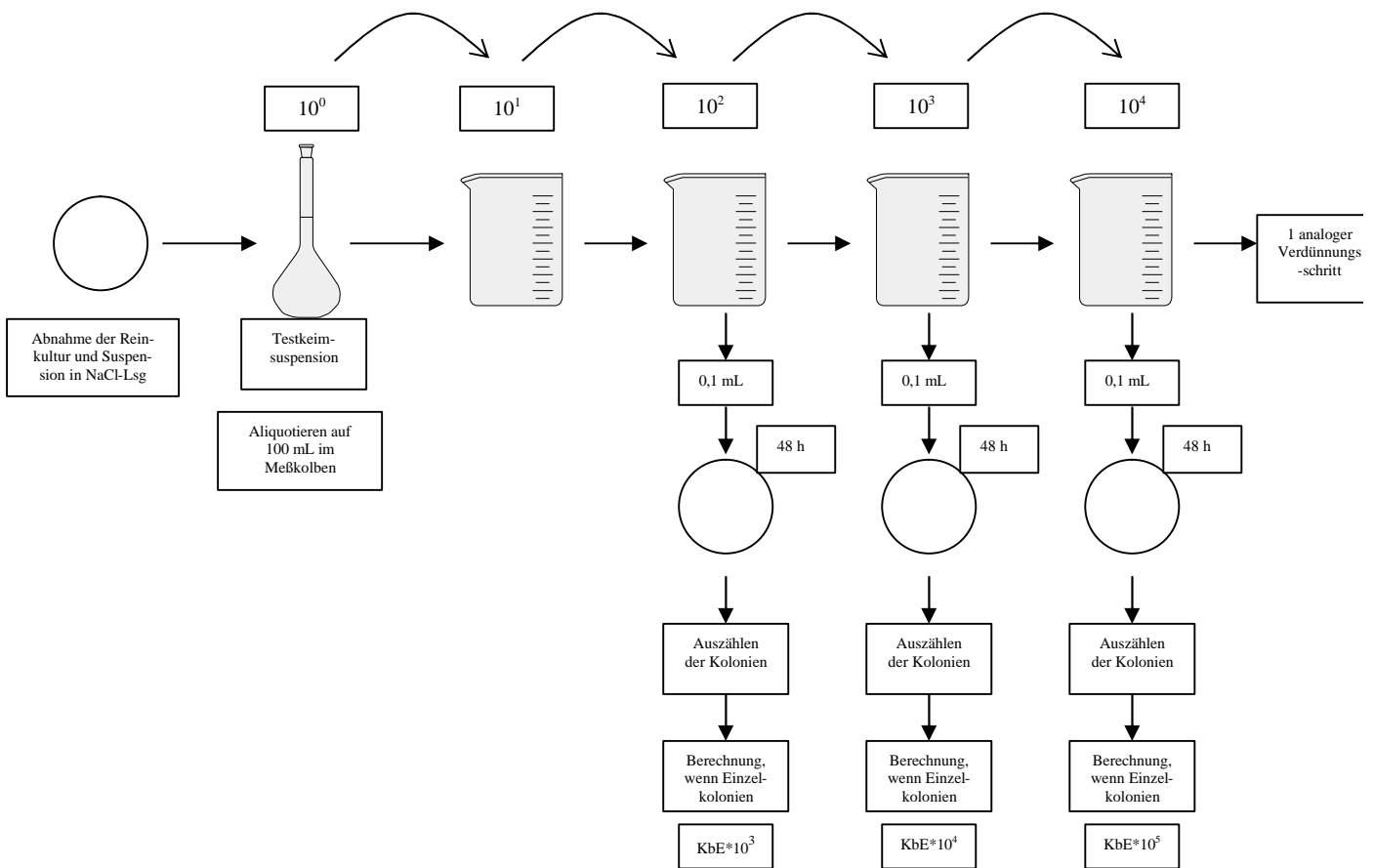
- ? Mikrobiologische Grundausstattung, bestehend aus:
 - o Brutschrank 36°C
 - o Kolbenhubpipetten mit sterilen Spitzen
 - o sterile Reagenzgläser, Pinzetten und Drigalski-Spatel
 - o sterile, physiologische Kochsalzlösung
 - o Impfösen mit Brenner
 - o Material für die Gram-Färbung
 - o Mikroskop
 - o Vortex® - Schüttelgerät
 - o Vakuum-Filtrationsgerät
 - o Colony-Quant® - digitales Koloniezählgerät der Fa. Schütt-Biotec, Göttingen
 - o sterile Kristallisierschalen mit Alu-Deckel, 250mL
- ? Wundauflagen als Prüfkörper
- ? Vollblut-Agar in Petrischalen
- ? Vollblut-Agar in Rodac® - Platten
- ? Testkeime Escherichia coli und Staphylococcus aureus

2.2 Methode der Bestimmung der mikrobiologischen Retentionsleistung:

Zunächst wird auf Vollblut -Agar aus einer im Drei -Ösen-Ausstrich-Verfahren bestätigten Reinkultur der Testkeime je Testkeim eine Keimsuspension angelegt, deren Trübung McFarland-Standard 3 entspricht. Hierzu werden Einzelkolonien der Reinkultur mit einer Impföse vom Nährboden abgenommen und in 100mL steriler Kochsalzlösung im Meßkolben suspendiert.

Anschließend wird von der erhaltenen Ausgangssuspension eine Verdünnungsreihe in Zehnerpotenz-Schritten zur Bestimmung der initialen Keimzahldichte angelegt. Hierzu wird 1mL Ausgangssuspension zu 9mL steriler Kochsalzlösung gegeben und mittels Vortex® - Schüttelgerät homogenisiert (Verdünnungsstufe 1 = $10^1 = 10$ -fach). Von dieser Suspension wird erneut 1mL mittels Pipette zu 9mL steriler Kochsalzlösung gegeben (Verdünnungsstufe 2 = $10^2 = 100$ -fach). In dieser Weise werden noch drei weitere Verdünnungsstufen angelegt, so daß schließlich die letzte Verdünnungsstufe 5 eine Verdünnung um Faktor $10^5 = 100.000$ aufweist. Von der Suspension jeder Verdünnungsstufe werden 0,1mL auf je einen Vollblutagar Nährboden pipettiert und mittels Drigalski -Spatel homogen auf der Nährbodenoberfläche verteilt. Nach Inkubation im Brutschrank bei 36°C über 48h werden die Kolonien der Nährböden mittels Colony-Quant® gezählt. Valide Zählergebnisse sind bei Befunden < 500 KbE/Nährboden zu erwarten. Beträgt die Anzahldichte auf einem Nährboden einer bestimmten Verdünnungsstufe 100 bis 500 Kolonien, so wird diese Koloniezahl unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufe und des Volumens von 0,1mL pro Nährboden für die Berechnung der initialen Keimzahldichte pro mL herangezogen.

Abb. 1:



Das zu validierende Produkt wird in eine sterile Kristallisierschale gelegt. Von der Testkeimsuspension werden 80mL auf das Produkt von der Wundauflage-seite aufgebracht. Nach erfolgter Resorption und einer Wartezeit von 60 Minuten wird eine Probe des Gelkernes von 1g entnommen. Diese Probe wird in 9 mL steriler Kochsalzlösung suspendiert. Anschließend erfolgt die Keimzahlbestimmung in der aufbereiteten Gelprobe analog des zuvor dargestellten Procederes.

2.3 Methode der Bestimmung des Sperrvermögens des Produktes:

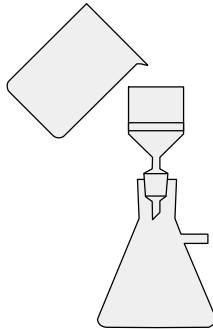
Es wird eine Testkeimsuspension beider Testkeime angelegt, die bezüglich der Keimzahldichte mittels Verdünnungsreihe untersucht wird (Vorgehen analog 2.2).

Von je einer Testkeimsuspension werden 80mL auf je ein zu validierendes Produkt gegeben. Nach einer Wartezeit von 60 Minuten wird mit tets einer Rodac® - Stempelplatte (A=23,75cm²) die Deckschicht von außen im Stempelverfahren abgeklatscht. Die Rodac® - Stempelplatten stellen spezielle Petrischalen dar, die randvoll mit Nähragar gefüllt sind. Durch das Andrücken an die Oberfläche werden Mikroorganismen der Oberfläche auf den Nähragar übertragen. Nach Inkubation im Brutschrank bei 36°C über 48 Stunden wird die Koloniezahldichte auf der Stempelplatte mittels Colony-Quant® ausgezählt.

2.4 Methode der Bestimmung des log. Reduktionsfaktors der BTBS-Deckschicht des Produktes:

Die BTBS-Deckschicht wird als Einzelkomponente in eine Vakuumfiltrationsarmatur eingespannt. Es wird je Testkeim eine Keimsuspension erstellt und die Anzahldichte koloniebildender Einheiten ermittelt (analog 2.2).

Die Keimsuspension wird mittels Vakuum durch die Deckschicht gesaugt und in einer Saugflasche aufgefangen.



Abschließend wird die Keimzahldichte des Filtrats analog 2.2 bestimmt.

2.5 Methode der Bestimmung des Wiederverkeimungspotentials des Produktes:

Je Testkeim wird eine Keimsuspension angelegt und analog 2.2 bezüglich der Keimzahldichte untersucht.

Das zu validierende Produkt wird in eine sterile Kristallisierschale gelegt. Von der Testkeimsuspension werden 80mL auf das Produkt von der Wundauflageseite aufgebracht. Nach erfolgter Resorption werden die Kristallisierschalen mit den Wundauflagen abgedeckt und über 4 Tage im Brutschrank bei 36°C inkubiert. Ist dies geschehen, so wird eine Probe des Gelkernes von 1g entnommen. Diese Probe wird in 9 mL steriler Kochsalzlösung suspendiert. Anschließend erfolgt die Keimzahlbestimmung in der aufbereiteten Gelprobe analog des unter Punkt 2.2 dargestellten Procederes.

3. Ergebnisse:

3.1 Ergebnis der Bestimmung der mikrobiologischen Retentionsleistung des Produktes:

Staphylococcus aureus				Escherichia coli			
initiale Keimlast		nach Resorption		initiale Keimlast		nach Resorption	
KbE/Platte	KbE/mL	KbE/Platte	KbE/mL	KbE/Platte	KbE/mL	KbE/Platte	KbE/mL
10 ⁰ > 500	n.b.	10 ⁰ > 500	n.b.	10 ⁰ > 500	n.b.	10 ⁰ > 500	n.b.
10 ¹ > 500	n.b.	10 ¹ > 500	n.b.	10 ¹ > 500	n.b.	10 ¹ > 500	n.b.
10 ² > 500	n.b.	10 ² > 500	n.b.	10 ² > 500	n.b.	10 ² > 500	n.b.
10 ³ > 500	n.b.	10 ³ > 500	n.b.	10 ³ > 500	n.b.	10 ³ > 500	n.b.
10 ⁴ > 500	n.b.	10 ⁴ > 500	n.b.	10 ⁴ > 500	n.b.	10 ⁴ > 500	n.b.
10 ⁵ 490	10 ^{8,69}	10 ⁵ 426	10 ^{8,63}	10 ⁵ 450	10 ^{8,65}	10 ⁵ 410	10 ^{8,61}

Kurzbefund: Die Resorption erfolgt näherungsweise im Verhältnis 1:1

3.2 Ergebnis der Bestimmung des Sperrvermögens des Produktes:

Staphylococcus aureus				Escherichia coli			
initiale Keimlast		Keimlast Oberfläche		initiale Keimlast		Keimlast Oberfläche	
KbE/Platte	KbE/mL	KbE/Platte	KbE/mL	KbE/Platte	KbE/mL	KbE/Platte	KbE/mL
10 ⁰ > 500	n.b.	Es wurden je Produktprüfmuster 3 Stempelplatten angelegt. Alle Platten waren steril, 0 KbE/23,75cm ²		10 ⁰ > 500	n.b.	Es wurden je Produktprüfmuster 3 Stempelplatten angelegt. Alle Platten waren steril, 0 KbE/23,75cm ²	
10 ¹ > 500	n.b.			10 ¹ > 500	n.b.		
10 ² > 500	n.b.			10 ² > 500	n.b.		
10 ³ > 500	n.b.			10 ³ > 500	n.b.		
10 ⁴ > 500	n.b.			10 ⁴ > 500	n.b.		
10 ⁵ 380	10 ^{8,58}			10 ⁵ 440	10 ^{8,64}		

Kurzbefund: Selbst unter Beaufschlagung des Produktes mit einer extrem hohen Keimlast (Staph.aureus 380.000.000 KbE/mL; E.coli 440.000.000 KbE/mL) wurde die Sterilität der BTBS-Deckschicht über > 60 Minuten gewahrt.

3.3 Ergebnis der Bestimmung des log. Reduktionsfaktors der BTBS-Deckschicht des Produktes:

Staphylococcus aureus				Escherichia coli			
initiale Keimlast		nach Filtration		initiale Keimlast		nach Filtration	
KbE/Platte	KbE/mL	KbE/Platte	KbE/mL	KbE/Platte	KbE/mL	KbE/Platte	KbE/mL
10 ⁰ > 500	n.b.	10 ⁰ 2	10 ^{1,30}	10 ⁰ > 500	n.b.	10 ⁰ 0	< 10 ^{1,00}
10 ¹ > 500	n.b.	10 ¹ 0	0	10 ¹ > 500	n.b.	10 ¹ 0	0
10 ² > 500	n.b.	10 ² 0	0	10 ² > 500	n.b.	10 ² 0	0
10 ³ > 500	n.b.	10 ³ 0	0	10 ³ > 500	n.b.	10 ³ 0	0
10 ⁴ > 500	n.b.	10 ⁴ 0	0	10 ⁴ > 500	n.b.	10 ⁴ 0	0
10 ⁵ 426	10 ^{8,63}	10 ⁵ 0	0	10 ⁵ 398	10 ^{8,60}	10 ⁵ 0	0

Berechnung des log. Reduktionsfaktors (LRF):

$$\text{LRF} = \log \text{KbE/mL}_{\text{initial}} - \log \text{KbE/mL}_{\text{nach Filtration}}$$

$\text{LRF}_{\text{Staph.aureus}} = 8,63 - 1,30 = 7,33$, d.h. von $10^{7,33} = 21.379.620$ Keimen in der Wundauflage gelangt maximal ein Keim durch die Deckschicht hindurch.

$\text{LRF}_{\text{Escherichia coli}} = 8,60 - 1,00 = >7,60$, d.h. von mehr als $10^{7,60} = 39.810.717$ Keimen in der Wundauflage gelangt maximal ein Keim durch die Deckschicht hindurch.

Anmerkung: Das BTBS-Deckmaterial ist stark hydrophobisiert. Nach 60 Min. Vakuumfiltration mit einem Unterdruck von 0,5hPa konnte ein Volumen von ca. 10 mL abfiltriert werden.

Kurzbefund: Das BTBS-Deckmaterial wirkt demnach als Sterilbarriere.

3.4 Ergebnis der Bestimmung des Wiederverkeimungspotentials des Produktes:

Staphylococcus aureus				Escherichia coli			
initiale Keimlast		nach Resorption		initiale Keimlast		nach Resorption	
KbE/Platte	KbE/mL	KbE/Platte	KbE/mL	KbE/Platte	KbE/mL	KbE/Platte	KbE/mL
$10^0 > 500$	n.b.	10^0 141	$10^{3,15}$	$10^0 > 500$	n.b.	$10^0 > 500$	n.b.
$10^1 > 500$	n.b.	10^1 11	n.b.	$10^1 > 500$	n.b.	$10^1 > 500$	n.b.
$10^2 > 500$	n.b.	10^2 4	n.b.	$10^2 > 500$	n.b.	$10^2 > 500$	n.b.
$10^3 > 500$	n.b.	10^3 0	0	$10^3 > 500$	n.b.	$10^3 > 500$	n.b.
$10^4 > 500$	n.b.	10^4 0	0	$10^4 > 500$	n.b.	$10^4 > 500$	n.b.
10^5 422	$10^{8,63}$	10^5 0	0	10^5 450	$10^{8,62}$	10^5 76	$10^{7,88}$

Kurzbefund: Das Produkt enthält keine bakteriell zugänglichen Substrate, es wurde über die Expositionszeit von 4 Tagen kein Anstieg der Keimzahl, sondern vielmehr eine Keimzahlreduktion beobachtet.

4. Interpretation und Diskussion:

Die mikrobiologisch geprüften Wundverbände sind im Rahmen der Validierung im Hinblick auf jeden geprüften Sachverhalt als optimal zu bezeichnen.

Bei Beaufschlagung der Wundverbände mit den Testkeimen Staph. aureus und Escherichia coli wurde ein Resorptionsverhältnis von näherungsweise 1:1 festgestellt. Das bedeutet, daß bei einer keimlastigen, septischen Wunde das Wundsekret einschließlich der darin befindlichen Mikroorganismen resorbiert wird. Es kommt demnach nicht zu einer sekundären Anreicherung von Mikroorganismen in der Wunde, die gegeben wäre, wenn die Wundseite des Wundverbandes nicht durchlässig für Mikroorganismen wäre.

Der Wundverband weist ferner ein vollständiges Sperrverhalten auf. Selbst bei Beaufschlagung des Wundverbandes mit 80mL einer extrem angereicherten Keimsuspension (ca. 10^8 Mikroorganismen pro mL) über 60 Minuten konnte noch immer die Sterilität an der Außenseite (BTBS-Deckschicht) des Wundverbandes bestätigt werden.

In gleicher Weise ist die Filterleistung der BTBS -Deckschicht der Wundverbände zu bewerten. Es wurde für Staph.aureus ein log. Reduktionsfaktor von 7,33 und für Escherichia coli ein log. Reduktionsfaktor von $> 7,60$ festgestellt. Von mehr als 20 Mio. Mikroorganismen pro mL gelangt maximal ein Mikroorganismus durch die BTBS -Deckschicht. Anmerkend dazu ist festzuhalten,

daß die Deckschicht stark hydrophob ausgerüstet ist. Bei einer Filtration mit einem Vakuum von 0,5hPa konnte über 60 Minuten Filtrationszeit lediglich ein Volumen von 10mL filtriert werden. Dieser Befund ist vereinbar mit einer Sterilfiltration. Dies bedeutet, daß weder eine mit dem Wundverband abgedeckte, aseptische Wunde durch Umgebungskeime kontaminiert wird, noch daß es bei Vorliegen einer septischen Wunde zu einer unkontrollierten Kontamination der Umgebung des Patienten kommen kann.

Des weiteren kommt es im Hinblick auf im Wundverband adsorbierte Mikroorganismen nicht zu sekundären Proliferationsphänomenen, da der Wundverband in keiner Weise bakteriell zugängliche Substrate enthält.

Damit kann der Wundverband "curea P2" vor dem Hintergrund der geprüften Aspekte als adäquat bezüglich einer hygienisch einwandfreien Patientenversorgung bezeichnet werden.

Bei Fragen erreichen Sie mich direkt unter 0551/394973 oder unter 0175/9150334.

Mit freundlichen Grüßen



Dr.med. Dipl.-Chem. Ulrich F. Schmelz

Wir danken der Firma Schütt Biotec, Göttingen, für die Unterstützung der mikrobiologischen Arbeiten durch die Bereitstellung der Anlage "Colony Quant®".