

<i>Medistri. SA</i>	Titel: Bericht für die mikrobiologische Validierung der Wiederverwendbarkeit des OneMumPumpSet ARDO MEDICAL AG	Bericht-Nr.: 717 - 010910 Rev: 0 Datum: 9. Februar 2011 Kopie: Medistri SA Seite 1 von 14

Bericht für die mikrobiologische Validierung: Wiederverwendbarkeit (mehrmaliger Gebrauch) des OneMumPumpSet

1.0. Dokumentenfreigabe

	Titel	Name	Datum	Unterschrift
Verfasst durch	Labor der MEDISTRI SA	G. Farron	07. Feb. 2011	
Genehmigt durch	Generaldirektion MEDISTRI SA	S. Nilfroushan	07. March 2011	
Genehmigt durch	Qualitätsverantwortlicher der ARDO MEDICAL AG	R. Speck	07. März 2011	

2.0. Dokumentenrevisionen

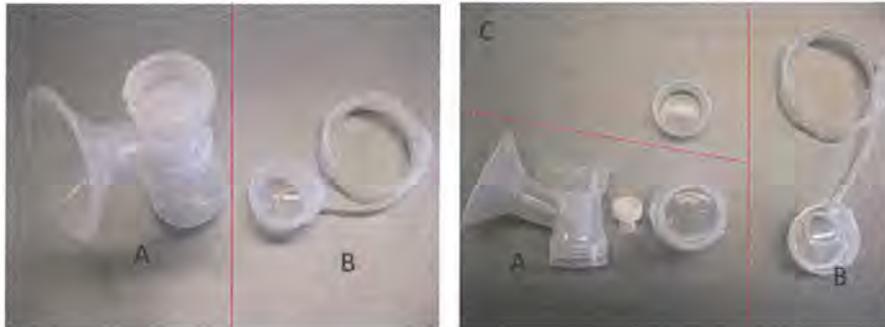
Revision	Datum	Betroffene Seite(n)	Beschreibung der Revision
0	9. Februar 2011	---	Erstellen des Berichtes (Rev. 0)
---	---	---	---

3.0. Allgemeine Angaben

Auftraggeber	Name	ARDO MEDICAL AG
	Adresse	Gewerbestrasse 19, CH-6314 Unterägeri, Schweiz
	Tel / Fax	+41 41 754 70 70 / + 41 41 754 70 71
Durchführung der Studie	Name	MEDISTRI SA
	Adresse	Route de l'Industrie 96, CP 115 CH-1564Domdidier, Schweiz
	Tel / Fax	+ 41 26 676 90 80 / + 41 26 676 90 85
Testprodukt		OneMumPumpSet
Beschreibung der Studie		Das Ziel des im vorliegenden Bericht beschriebenen Testverfahrens war die Validierung - basierend auf mikrobiologische Parameter - der Wiederverwendbarkeit des OneMumPumpSet nach mehrmaliger Reinigung.

4.0. Begründung für die Durchführung der Studie

Das OneMumPumpSet der Ardo Medical AG ist für den einmaligen Gebrauch bestimmt. Liesse sich durch ein geeignetes Reinigungsverfahren eine niedrige mikrobiologische Kontamination sicherstellen, könnte das Produkt, während eines definierten Zeitabschnittes (1, 2 und 3 Tagen), auch für den mehrmaligen Gebrauch geeignet sein (7 x pro Tag, mit einem Intervall von 3 bis 5 Stunden). Das Ziel der Studie war somit die Validierung - basierend auf mikrobiologische Parameter - der Wiederverwendbarkeit des OneMumPumpSet (mit Behältern von 50 bis 150 ml) nach mehrmaliger Kontaminierung und Reinigung (siehe Bild A und C). Das obere Teil des Produktes (siehe Bild B) wurde nicht berücksichtigt, da es keinen Kontakt zur Muttermilch hat.



A. Für die Studie berücksichtigte Teile (da Kontakt zur Muttermilch)
 B. Oberer Teil (kein Kontakt zur Muttermilch; nicht getestet)
 C. Teil mit potentielltem Kontakt zur Muttermilch (in der Studie berücksichtigt)

5.0. Verfahren

Das im Folgenden beschriebene Testverfahren wurde von der Ardo Medical AG freigegeben (siehe Dokument "Protocol for microbiological validation for OneMumPumpSet reusability", Protokoll-Nr.: 717 – 010910). Die Wiederverwendbarkeit des OneMumPumpSet (mit Behältern von 50 bis 150 ml) nach mehrmaligem Gebrauch und mehrmaliger Reinigung wurde mittels künstlich kontaminierter Muttermilch (im Folgenden als ACM: artificially contaminated milk bzw. als NCM: non contaminated milk bezeichnet) beurteilt. Die verwendeten Mikroorganismen stammen aus der Gruppe der Bakterien und Pilze. Im Bericht wurden die unten stehenden Punkte untersucht und anhand von Gesamtkeimzahlbestimmung (Bioburden) und von mikrobiologischen Selektions- und Auswahlverfahren bewertet.

- Die natürliche mikrobiologische Belastung und Charakterisierung der Milch (NCM) mit und ohne Inkubation.
- Die mikrobiologische Belastung und Charakterisierung der künstlich kontaminierten Milch (ACM) mit und ohne Inkubation.
- Der Auswirkung des Reinigungsverfahrens auf die mikrobiologische Belastung des OneMumPumpSet (verglichen mit Produkten ohne Reinigung)
- Die zeitliche Auswirkung auf die mikrobiologische Belastung (Kontamination) des OneMumPumpSet

1. Methoden

Abkürzungen: ACM: künstlich kontaminierte Milch (artificially contaminated milk)
 NCM: nicht kontaminierte Milch (non contaminated milk)
 KBE: Kolonie bildende Einheiten
 TAMC: Gesamtanzahl der aeroben Kolonien (total aerobic microbial count)
 Nicht steril: unter nicht sterilen Bedingungen durchgeführte Test
 Steril: unter sterilen Bedingungen durchgeführte Tests (in einer Laminar Flow Box)
 Selektives Medium: Nährmedium, angereichert mit spezifischen Zusätzen, um das Wachstum bestimmter Mikroorganismen zu erlauben
 ‚Auswahlmedium‘: Nährmedium, mit spezifischer Zusammensetzung für definierte metabolische Bedürfnisse der Mikroorganismen

Bestimmung der mikrobiologischen Belastung mittels Bioburden-Test

Historische Daten über die Validierung und die Routineanalysen für die Bestimmung des Bioburden für ArdoOneMumPumpSet waren vorhanden. Medistri SA hat für die Sets Bioburden-Analysen

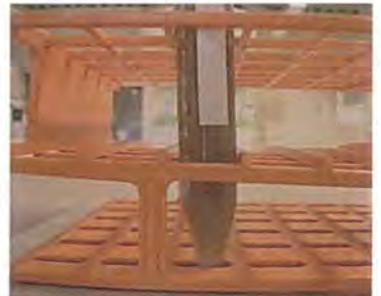
gemäss einer validierten Prozedur durchgeführt. Zusätzlich wurde die Keimbelastung (Kontamination) mittels selektiver und Auswahlmedien charakterisiert. Es wurden mit EtO (Ethylenoxid)-sterilisierte (Medistri batch 236/10, cycle 1) Behälter verwendet.

Arbeitsschritte

- A. Die Muttermilch wurde in gefrorenem Zustand (in Plastikbeuteln: ArdoEASYFreeze) von Ardo Medical AG zur Verfügung gestellt und in diesem Zustand bis zum Beginn der Analysen aufbewahrt. Die Plastikbeutel mit dem gefrorenen Inhalt wurden in einem Wasserbad bei 35°C während 20 Minuten aufgetaut (keine Lagerung mehr möglich für aufgetaute Milch). Pipetten wurden verwendet, um das entsprechende Volumen unter nicht sterilen Bedingungen zu verteilen, um eine ‚worst case‘ Situation (ungünstiger Fall) zu simulieren.



- B. Vorbereitung der Keime: Die Pellets, welche die Bakterien- und die Pilzstämme enthielten, wurden in ein steriles Röhrchen überführt, in steriler physiologischer Salzlösung suspendiert und während 30 Minuten bebrütet (30-38°C). Vor Gebrauch wurde die Suspension gemischt (Vortex), um eine homogene Keimlösung zu erhalten.

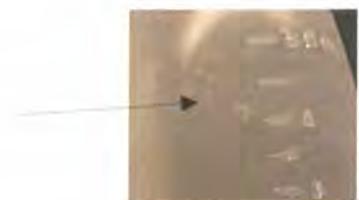


- C. Milchkontamination: die Milch (A) wurde unter nicht sterilen Bedingungen (worst case) kontaminiert, um eine Zielkonzentration der Keime von 6×10^5 cfu/ml Milch zu erhalten. (B). 3.5 ml der kontaminierten Milch wurde in das OneMumPumpSet überführt. Das Produkt wurde während 5 Sekunden so geschüttelt, dass die inneren Teile des Produktes komplett benetzt wurden.



- D. Das kontaminierte PumpSet wurde bei 30°C während 1 Stunde trocknen gelassen. Danach wurden an 3 kontaminierten PumpSets Bioburden-Analysen durchgeführt.

Eingetrocknete Tropfen der kontaminierten Milch (s. Pfeil)



E. Die anderen 6 kontaminierten und abgetrockneten PumpSets wurden gemäss folgender Prozedur gespült.



Mit kaltem Leitungswasser ausspülen (I), dann mit seifigen lauwarmem Wasser ausspülen (II). Auf ein gründliches und komplettes Ausspülen der Seifenreste ist besonders zu achten.

An 3 von den 6 gespülten PumpSets wurden Bioburden-Analysen durchgeführt. Pro Set wurden 50 ml NCM verwendet, welche während 4 Stunden bei 30°C im PumpSet bebrütet und anschliessend auf die mikrobiologische Qualität getestet wurde.

BEMERKUNGEN: Wir haben ein preiswertes handelsübliches Spülmittel verwendet.
Das Innere des Produkts wurde nicht ausgebürstet.

Zusammenfassung der Bedingungen

- i. 3 PumpSets wurden mit ACM kontaminiert und trocken gelassen (kein Spülen). Die Bestimmung der mikrobiologischen Belastung erfolgte mittels Bioburden-Analyse.
- ii. 3 Pump Sets wurden mit ACM kontaminiert, trocken gelassen, ausgespült (und danach trocken gelassen). Anschliessend wurde die Bestimmung der mikrobiologischen Belastung mittels Bioburden-Analyse durchgeführt.
- iii. NCM wurde in den drei restlichen PumpSets während 4 Stunden bei 30°C bebrütet.

Nach Bebrütung:

- für die Bestimmung der mikrobiologischen Belastung (Bioburden) haben wir die Milch in einer Verdünnung von 1:100 (NCM in Peptonwasser) verwendet.
- für die mikrobiologische Identifikation haben wir 0.5 ml der verdünnten Milch in einer Verdünnung von 1:10 verwendet (Ausstrich auf die selektiven und Auswahl-Medien).

2. Keime

Wir haben 6 referenzierte Keime gewählt. Die Keime zeichnen sich aus durch ihr permanentes Vorkommen in der Umgebung des Menschen, durch ihre potentielle Pathogenität, durch ihre potentielle Fähigkeit, in komplexen Medien (wie z.B. Muttermilch) zu wachsen und/oder Biofilme, die schwierig zu entfernen sind, zu produzieren. Es wurden lyophilisierte Pellets zu je 10^6 bis 10^7 Keime verwendet (MicroBioLogics).

Staphylococcus aureus: fakultativ anaerobes Bakterium, gram positive Kokken, Saprophyt auf der menschlichen Haut. Ein grosser Prozentsatz der menschlichen Bevölkerung ist ein langfristiger Träger von *S. aureus*. Er kann Infektionskrankheiten unterschiedlichen Schweregrades verursachen: von leichten Infektionen der Haut bis hin zu potentiell tödlichen Krankheiten. Man findet ihn oft in der Muttermilch (1, 2).

Enterococcus faecalis: fakultativ anaerobes Bakterium, gram positive Kokken, besiedelt den gastrointestinalen Trakt des Menschen sowie anderer Säugetiere. *E. faecalis* kann beim Menschen lebensbedrohende Infektionen verursachen.

Escherichia coli: fakultative anaerobe Bakterium, gram positive nicht sporenbildende Stäbchen, die sich oft in Darm warmblütiger Organismen befinden. In der Regel harmlos, können sie zu ernstern Nahrungsmittelvergiftungen beim Menschen führen.

Pseudomonas aeruginosa: aerobes Bakterium, gram negative nicht sporenbildende Stäbchen, die sich mittels polarer Geisseln aktiv fortbewegen können, kann Biofilme produzieren. *P. aeruginosa* ist ubiquitär verbreitet: im Wasser und im Erdboden, auf der Haut, in geringen Mengen auch im Darm, in zahlreichen Umgebungen der Menschen. Er kann eine breite Palette von organischen Stoffen als Substrat benutzen. Verursacht Krankheiten bei den Tieren wie auch beim Menschen.

Aspergillus niger: Schimmelpilz (fungi imperfecti), eine der häufigsten Arten der Gattung. Ubiquitär vorkommend (Böden, Innenräume,...). Befällt Lebensmittel. Neuere Daten sprechen dafür, dass gewisse Stämme von *A. niger* Toxine produzieren können.

Candida albicans: Hefe (einzellig, rundlich-oval, manchmal faserförmig). Häufig auf den Schleimhäuten von Mund und Rachen, im Genitalbereich sowie im Verdauungstrakt zu finden. *Candida* kann Biofilme auf der Oberfläche von medizinischen Implantaten produzieren. 80% der menschlichen Population sind Träger von *Candida albicans*, ohne dass sich schädliche Wirkungen manifestieren. Bei der Immunsuppression stellt die Kandidose eine wichtige Ursache für die Sterblichkeit dar.

Keim	Anzahl KBE pro Pellet im Zertifikat (IC 95)	gezielte Impfkultur in Milch (KBE / ml)	tatsächliche Keimbelastung der Milch (KBE/ml)
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538, Lot Nr. 485-79-1)	$5.1-5.9 \times 10^7$	10^5	2.2×10^5
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212, Lot Nr. 366852)	$5.9-7.2 \times 10^7$	10^5	8.0×10^4
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 8739, Lot Nr. 483-139-1)	$5.0-6.1 \times 10^7$	10^5	1.4×10^5

Medistri.SA

Titel:
Bericht für die mikrobiologische
Validierung der
Wiederverwendbarkeit des
OneMumPumpSet
ARDO MEDICAL AG

Bericht-Nr.: 717 - 010910
Rev: 0
Datum: 9. Februar 2011
Kopie: Medistri SA
Seite 6 von 14

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 9027, Lot Nr. 484-164-1)	6.3-7.3x10 ⁷	10 ⁵	1.0x10 ⁵
<i>Pilze</i>			
<i>Aspergillus niger</i> (ATCC 16404, Lot Nr. 392-79-1)	6.2-7.4x10 ⁶	10 ⁵	7.0x10 ⁴
<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231, Lot Nr. 443962)	4.6-5.0x10 ⁷	10 ⁵	2.1x10 ⁵
TOTAL	n.a.	6x10 ⁵	8.2x10 ⁵

3. Wachstumsbedingungen (Nährmedium, Temperatur, Zeit)

- a. TAMC (Total aerobic mesophilic count) gesamte Anzahl der aeroben mesophilen Kolonien (Bioburden, Membranfiltration)

Bakterien: TSA, 30-35°C, 1-3 Tage

Pilze: Sabouraud Agar + Antibiotikum, 20-24°C, 5 Tage

- b. Bestimmung

Enterobacteriaceae : Violet Red Bile Glukose Agar, 30-35°C

Staphylococcus aureus : Baird Parker Agar, 30-35°C

Escherichia coli : Mac Conkey Cristal Violet, 30-35°C

Pseudomonas aeruginosa : Cetrimide Agar, 30-35°C

Candida albicans, Aspergillus niger : Sabouraud Agar + Antibiotikum, 20-24°C

Ethylenoxid-sterilisierte OneMumPumSets: Batch number 236/10 (Medistri)

¹C. Quarello-Baldaccioni, A.M. Lacoste-Armynot, J. Benssadoun, J.P. Dauresand M. Simeon De Buochberg. 1999. Bacterial contamination of humanmilk. Medecineet Maladies Infectieuses, Volume 29, Number 9, pp. 587-591(5)

²A. Lucas and C.D. Roberts. 1979. Bacteriological quality control in human milk-banking. British Medical Journal. 1 : 80

6.0 Resultate

6.1 Natürliche mikrobiologische Belastung der NCM (nicht kontaminierte Milch)

Anfangsbelastung : Bestimmung der natürlichen mikrobiellen Belastung

Probe ID	Bakterielle Kontamination (KBE / ml)	Pilzkontamination (KBE /ml)
1	1.1x10 ³	0
2	1.0x10 ³	0
3	1.2x10 ³	0
Mittelwert	1.1x10³	0
TAMC/ml	1.1x10³	

TAMC: Gesamte aerobe Keimzahl

Nach 4 Stunden Bebrütung bei 30°C in sterilen geschlossenen Beuteln: Auswirkung der Zeit auf die natürliche mikrobielle Anfangsbelastung

Probe ID	Bakterielle Kontamination (KBE / ml)	Pilzkontamination (KBE /ml)
1	2.0x10 ³	0
2	2.1x10 ³	0
3	2.1x10 ³	0
Mittelwert	2.1x10³	0
TAMC/ml	2.1x10³	

Schlussfolgerungen

Die Muttermilch war zu Beginn kontaminiert, was eine Standardsituation darstellt und normal ist. Nach einer vierstündigen Inkubation wurde eine erhöhte Keimzahl gemessen: Die Bakterien waren somit in der Lage, in der menschlichen Milch zu wachsen und sich zu vermehren. Es wurden keine Pilze in der NCM (mit und ohne Bebrütung) beobachtet.

6.2. Einmaliger Gebrauch, Kontamination mit ACM (künstlich kontaminierte Milch)

Ohne Ausspülen, gemäss der "Prozedur 5,0, Methode 1, Abschnitt i"
 Die Resultate sind in der folgenden Tabelle dokumentiert.

Probe ID	Bakterielle Kontamination (KBE / sample)	Pilzkontamination (KBE / sample)
1	3.4x10 ⁴	1.9x10 ⁴
2	3.6x10 ⁴	1.6x10 ⁴
3	4.0x10 ⁴	2.2x10 ⁴
Mittelwert	3.7x10⁴	1.9x10⁴
TAMC/Probe	5.5x10⁴	

Mit Ausspülen, gemäss der Prozedur 5,0, 1.Methode 1, Abschnitt ii"

Die Resultate sind in der folgenden Tabelle dokumentiert.

Probe ID	Bakterielle Kontamination (KBE /Probe)	Pilzkontamination (KBE / sample)
1	1	0
2	0	0
3	0	0
Mittelwert	0.3	0
TAMC/Probe	0.3	

Schlussfolgerungen

Die Milch wurde künstlich kontaminiert und wies bereits eine natürliche mikrobielle Belastung auf. In der Bioburdenanalyse wird diese Tatsache klar verdeutlicht (nicht gespülte Behälter). ACM und NCM sind keine kommerziellen Nahrungspräparate, und wir haben diesbezüglich keine mikrobiologischen Grenzwerte finden können (zum Vergleichszweck: Kuhmilch ist i.O. wenn ≤ 80'000 TAMC/ml). Nach der Spülprozedur (siehe Kap. 2.0, E) haben wir nur einen einzigen Keim (KBE) beobachtet. Gemäss Bundesamt für Gesundheit BAG (OHyg 817.024.1) ist das OneMumPumpSet nach Gebrauch somit konform.

6.3 Mikrobiologische Qualität

Mit Ausspülen, gemäss der Prozedur 5,0, 1.Methode 1, Abschnitt iii"

Die Resultate sind in der folgenden Tabelle dokumentiert

Probe ID	Bakterielle Kontamination (KBE /sample)	Pilzkontamination (KBE / sample)
1	1.6x10 ³	0
2	2.2x10 ³	0
3	1.8x10 ³	0
Mittelwert	1.9x10³	0
TAMC/Probe	1.9x10³	

Schlussfolgerungen

Es wurde gezeigt, dass die Muttermilch eine natürliche Kontamination aufwies (siehe 6.0 Resultate, Punkt 1). Die Resultate in den Tabellen auf Seite 7 entsprechen der mikrobiologischen Belastung der Milch nach einer vierstündigen Inkubation.

Es ist bemerkenswert, dass eine grosse Anzahl Keime fähig war, das Austrocknen zu überleben (siehe 6.2, der Vergleich „mit“ und „ohne“ Spülen. Ohne Spülung hätten die Keime der ACM ohne Zweifel wachsen können, oder in die Milch übergehen können und damit die Keimbelastung der Milch zusätzlich belastet (nach der vierstündigen Bebrütung bei 30°C). Ohne diese Annahme analysiert zu haben, gehen wir davon aus, dass in diesem Fall das Resultat vom hygienischen Standpunkt aus gesehen inakzeptabel wäre: die Spülprozedur erlaubt somit das Entfernen einer beachtlichen Anzahl Keime.

6.4. Mehrfacher Gebrauch: 24, 48 und 72 Stunden

Das Ziel des vorliegenden Berichtes war es, die Verwendung des OneMumPumpSet nach wiederholter Kontamination und wiederholter Spülung zu dokumentieren. Dabei wurden folgende Parameter festgelegt: Intervalle zwischen den Anwendungen: 3 bis 5 Stunden (7 x pro 24 Stunden); 1, 2 und 3 Tage

Zusammenfassung der Bedingungen

- i. 3 PumpSets wurden mit ACM kontaminiert; danach wurden die Sets trocken gelassen und wiederum kontaminiert (wiederholt während eines definierten Zeitabschnittes. Nach der letzten Kontamination und Austrocknung OHNE zu spülen wurde die mikrobiologische Belastung bestimmt.
- ii. 3 PumpSets wurden mit ACM kontaminiert; danach wurden die Sets trocken gelassen und wiederum kontaminiert (wiederholt während eines definierten Zeitabschnittes. Nach der letzten Kontamination und Austrocknung MIT Spülen wurde die mikrobiologische Belastung bestimmt.
- iii. NCM wurde in den drei restlichen PumpSets während 4 Stunden bei 30°C bebrütet.

Nach der Bebrütung:

- für die Bestimmung der mikrobiologischen Belastung (Bioburden) haben wir die Milch in einer Verdünnung von 1:100 (NVM in Peptonwasser) verwendet.
- für die mikrobiologische Identifikation haben wir 0.5 ml der verdünnten Milch in einer Verdünnung von 1:10 verwendet (Ausstrich auf die selektiven und Auswahl-Nährmedien).

Im Folgenden sind die Resultate dokumentiert, danach folgen die Schlussfolgerungen:

Medistri.SA

Titel:
Bericht für die mikrobiologische
Validierung der
Wiederverwendbarkeit des
OneMumPumpSet
ARDO MEDICAL AG

Bericht-Nr.: 717 - 010910
Rev: 0
Datum: 9. Februar 2011
Kopie: Medistri SA
Seite 9 von 14

Mehrfacher Gebrauch: <u>24 Stunden</u>	Beschreibung	KBE/ml (Bakterien)	KBE/ml (Pilze)	Endresultat KBE
i: Bioburden. 7. Kontamination, ohne 7. Ausspülung	Probe 1	3.60x10 ³	2.00x10 ³	5.60x10 ³
	Probe 2	4.10x10 ³	1.60x10 ³	5.70x10 ³
	Probe 3	3.30x10 ³	1.80x10 ³	5.10x10 ³
	Mittelwert	3.66x10³	1.80x10³	5.46x10³
ii: Bioburden. 7. Kontamination mit 7. Ausspülung	Probe 1	0	0	0
	Probe 2	0	0	0
	Probe 3	0	0	0
	Mittelwert	0	0	0
iii: Mikrobiologische Qualität: mesophile aerobe Bakterien (cfu/ml) TSA oder Sabouraud	Probe 1	8.80x10 ²	0	8.80x10 ²
	Probe 2	1.04x10 ³	0	1.04x10 ³
	Probe 3	7.40x10 ²	0	7.40x10 ²
	Mittelwert	8.8x10²	0	8.8x10²
- <i>Enterobacteriaceae</i> VRBG	Probe 1	0	0	0
	Probe 2	0	0	0
	Probe 3	0	0	0
	Mittelwert	0	0	0
- <i>Staphylococcus aureus</i> Baird Parker	Probe 1	7.60x10 ²	0	7.60x10 ²
	Probe 2	9.20x10 ²	0	9.20x10 ²
	Probe 3	8.20x10 ²	0	8.20x10 ²
	Mittelwert	8.33x10²	0	8.33x10²
- <i>Escherichia coli</i> Mac Conkey	Probe 1	0	0	0
	Probe 2	0	0	0
	Probe 3	0	0	0
	Mittelwert	0	0	0
- <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Cetrimide	Probe 1	0	0	0
	Probe 2	0	0	0
	Probe 3	0	0	0
	Mittelwert	0	0	0
-mesophile Pilze (KBE/ml)	Probe 1	0	0	0
	Probe 2	0	0	0
	Probe 3	0	0	0
	Mittelwert	0	0	0
- <i>Candida albicans</i>	Probe 1	0	0	0
	Probe 2	0	0	0
	Probe 3	0	0	0
	Mittelwert	0	0	0
- <i>Aspergillus niger</i>	Probe 1	0	0	0
	Probe 2	0	0	0
	Probe 3	0	0	0
	Mittelwert	0	0	0

Medistri.SA

Titel:
Bericht für die mikrobiologische
Validierung der
Wiederverwendbarkeit des
OneMumPumpSet
ARDO MEDICAL AG

Bericht-Nr.: 717 - 010910
Rev: 0
Datum: 9. Februar 2011
Kopie: Medistri SA
Seite 10 von 14

Mehrfacher Gebrauch: <u>48 Stunden</u>	Beschreibung	KBE/ml (Bakterien)	KBE/ml (Pilze)	Endresultat KBE
i: Bioburden. 13. Kontamination, ohne 13. Ausspülung	Probe 1	4.80x10 ³	2.10x10 ³	6.90x10 ³
	Probe 2	3.00x10 ³	1.60x10 ³	4.60x10 ³
	Probe 3	2.60x10 ³	1.80x10 ³	4.40x10 ³
	Mittelwert	3.46x10³	1.83x10³	5.30x10³
ii: Bioburden. 13. Kontamination mit 13. Ausspülung	Probe 1	0	0	0
	Probe 2	0	0	0
	Probe 3	0	0	0
	Mittelwert	0	0	0
iii: Mikrobiologische Qualität: mesophile aerobe Bakterien (ufc/ml) TSA oder Sabouraud	Probe 1	7.80x10 ²	0	7.80x10 ²
	Probe 2	9.80x10 ²	0	9.80x10 ²
	Probe 3	8.60x10 ²	0	8.60x10 ²
	Mittelwert	8.73x10²	0	8.73x10²
- <i>Enterobacteriaceae</i> VRBG	Probe 1	0	0	0
	Probe 2	0	0	0
	Probe 3	0	0	0
	Mittelwert	0	0	0
- <i>Staphylococcus aureus</i> Baird Parker	Probe 1	8.20x10 ²	0	8.20x10 ²
	Probe 2	8.20x10 ²	0	8.20x10 ²
	Probe 3	7.20x10 ²	0	7.20x10 ²
	Mittelwert	7.86x10²	0	7.86x10²
- <i>Escherichia coli</i> Mac Conkey	Probe 1	0	0	0
	Probe 2	0	0	0
	Probe 3	0	0	0
	Mittelwert	0	0	0
- <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Cetrimide	Probe 1	0	0	0
	Probe 2	0	0	0
	Probe 3	0	0	0
	Mittelwert	0	0	0
-mesophile Pilze (KBE/ml)	Probe 1	0	0	0
	Probe 2	0	0	0
	Probe 3	0	0	0
	Mittelwert	0	0	0
- <i>Candida albicans</i>	Probe 1	0	0	0
	Probe 2	0	0	0
	Probe 3	0	0	0
	Mittelwert	0	0	0
- <i>Aspergillus niger</i>	Probe 1	0	0	0
	Probe 2	0	0	0
	Probe 3	0	0	0
	Mittelwert	0	0	0

Medistri.SA

Titel:
Bericht für die mikrobiologische
Validierung der
Wiederverwendbarkeit des
OneMumPumpSet
ARDO MEDICAL AG

Bericht-Nr.: 717 - 010910
Rev: 0
Datum: 9. Februar 2011
Kopie: Medistri SA
Seite 11 von 14

Mehrfacher Gebrauch: <u>72 Stunden</u>	Beschreibung	KBE/ml (Bakterien)	KBE/ml (Pilze)	Endresultat KBE
i: Bioburden. 19.Kontamination, ohne 19. Ausspülung	Probe 1	4.00x10 ³	1.40x10 ³	5.40x10 ³
	Probe 2	5.30x10 ³	1.40x10 ³	6.70x10 ³
	Probe 3	4.20x10 ³	1.60x10 ³	5.80x10 ³
	Mittelwert	4.50x10³	1.46x10³	5.96x10³
ii: Bioburden. 19.Kontamination mit 19. Ausspülung	Probe 1	0	0	0
	Probe 2	0	0	0
	Probe 3	0	0	0
	Mittelwert	0	0	0
iii: Mikrobiologische Qualität: mesophile aerobe Bakterien (ufc/ml) TSA oder Sabouraud	Probe 1	1.88x10 ³	0	1.88x10 ³
	Probe 2	2.04x10 ³	0	2.04x10 ³
	Probe 3	1.76x10 ³	0	1.76x10 ³
	Mittelwert	1.89x10³	0	1.89x10³
- <i>Enterobacteriaceae</i> VRBG	Probe 1	0	0	0
	Probe 2	0	0	0
	Probe 3	0	0	0
	Mittelwert	0	0	0
- <i>Staphylococcus aureus</i> Baird Parker	Probe 1	1.74x10 ³	0	1.74x10 ³
	Probe 2	1.88x10 ³	0	1.88x10 ³
	Probe 3	1.66x10 ³	0	1.66x10 ³
	Mittelwert	1.76x10³	0	1.76x10³
- <i>Escherichia coli</i> Mac Conkey	Probe 1	0	0	0
	Probe 2	0	0	0
	Probe 3	0	0	0
	Mittelwert	0	0	0
- <i>Pseudomonasaeruginosa</i> Cetrimide	Probe 1	0	0	0
	Probe 2	0	0	0
	Probe 3	0	0	0
	Mittelwert	0	0	0
-Mesophile Pilze (KBE/ml)	Probe 1	0	0	0
	Probe 2	0	0	0
	Probe 3	0	0	0
	Mittelwert	0	0	0
- <i>Candida albicans</i>	Probe 1	0	0	0
	Probe 2	0	0	0
	Probe 3	0	0	0
	Mittelwert	0	0	0
- <i>Aspergillus niger</i>	Probe 1	0	0	0
	Probe 2	0	0	0
	Probe 3	0	0	0
	Mittelwert	0	0	0

Schlussfolgerungen

Nach 24, 48 oder 72 Stunden der wiederholten Kontamination konnten wir die gleichen Trends beobachten. Der Anzahl und die Dauer der Benutzungen sind somit keine ausschlaggebenden Faktoren. Hingegen hat sich die Spülprozedur als entscheidender Faktor erwiesen:

i: Die mikrobiologische Belastung in der Prozedur ohne Schlussausspülung: vergleichbare Ergebnisse von 5.30×10^3 bis 5.96×10^3 TAMC/ Probe

ii: Die mikrobielle Belastung nach der letzten Ausspülung: 0 cfu/Probe für alle Zeitpunkte. Zur Erinnerung: die getesteten Sets wurden zuerst mit kaltem Leitungswasser und dann mit seifigen lauwarmen Wasser ausgespült.

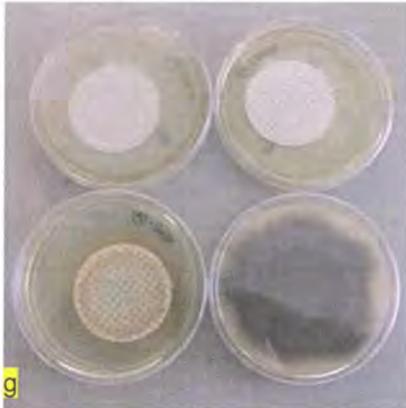


Bild links: die Filtermembranen wurden während 72 Stunden inkubiert, um die Resultate visuell darzustellen.
Oben links: Filtermembran auf TSA nach Spülung.
Unten links: auf TSA ohne letzte Spülung: hohe bakterielle Kontamination
Oben rechts: Filtermembran auf Sabouraudagar nach der Spülung. Keine Pilzkontamination
Unten links: Membranen-Filter auf Sobaraud ohne letzte Spülung: hohe Pilzkontamination

iii: Inkubation von NCM (während 4 Stunden, bei 30°C) nach der letzten Ausspülung
Wir haben einen stabilen Mittelwert von TAMC auf TSA beobachtet (von 8.73×10^2 bis 1.89×10^3) Alle beobachteten KBE stammen von Bakterien, es waren keine Pilze anwesend. Eine identische Anzahl ist auch auf dem Baird Parker-Nährboden gewachsen.



Auf den Fotos im oben stehende Bild können wir folgende Kulturen sehen (Beispiel der Kontamination nach 48 Stunden)
Ganz oben: Auszählung der cfu auf der Platte): TryptoneSojaAgar mit bakterieller Kontamination

Von links nach rechts:

Violet Red Bile Glucose: keine Kontamination von Enterobacteriaceae .

Baird Parker: *Staphylococcus aureus* (wahrscheinlich von der Kontamination)

Mac Conkey: keine Kontamination von *Escherichia coli*

Certrimide Agar: keine Kontamination von *Pseudomonas aeruginosa*

Sabouraud Gentamycine Chloramphenicol: keine Pilzkontamination.

Die Anzahl der KBE auf TSA und auf Baird-Parker ist gleich gross und es handelt sich um den gleichen Keim (wahrscheinlich *Staphylococcus aureus*, siehe Bild unten)



Links: Bakterielle Keime der NCM auf dem selektiven Medium Baird Parker, das ein ideale Nährmedium für *Staphylococcus aureus* ist.

Rechts: Gleiche Bedingungen auf TSA.

7.0 Interpretation und Empfehlungen

Die Versuche wurden bei kontrollierten Bedingungen unter Verwendung von relevanten Referenzstämmen und menschlicher Muttermilch durchgeführt, um eine ‚worstcase‘-Situation zu simulieren. Die Veränderung der mikrobiologischen Belastung wurde mittels Bioburden-Analyse sowie quantitativer und qualitativer Auswertung der Agarplatten ermittelt (gemäss der Europäischen Pharmakopöe, Kapitel 2.6.12; der Amerikanischen Pharmakopöe [USP], Kapitel <61>; und der ISO Norm SN ISO 11737-1).

Folgendes lässt sich über die Versuchsprozedur feststellen:

Die Resultate der Bioburden-Analysen zeigen, dass die mikrobiologische Belastung des OneMumPumpSet ohne Spül- und Waschprozedur sehr hohe Werte aufweist. Wir konnten zeigen, dass durch Waschen und Spülen die Keimbelastung sehr stark reduziert wird. Daraus leiten wir folgende Empfehlung ab:

- Wie der Versuch zeigt ist eine Spülprozedur nötig. Die von ARDO vorgeschlagene Prozedur entfernt eine grosse Anzahl von weltweit vorkommenden und potentiell pathogenen Bakterien und Pilzen auf adäquate und sehr wirksame Weise.

Die menschliche Muttermilch weist eine natürliche mikrobiologische Kontamination auf. Unsere Resultate decken sich mit den Beobachtungen aus anderen Studien (Quarello-Baldaccione et al., 1999; Lucas and Roberts, 1979). Nach einer vierstündigen Inkubation lässt sich eine Zunahme der Kolonie bildenden Einheiten (KBE) feststellen: die Keime sind vital und sie gehören zu einem potentiell pathogenen Erreger. Wir schlagen deshalb Folgendes vor:

- Die Bedingungen, unter denen die Milch aufbewahrt wird, sind von höchster Bedeutung (die Aufbewahrung der Milch bei Raumtemperatur während mehrerer Stunden kann inakzeptable Folgen mit sich ziehen). Die Milch muss vor Gebrauch gefroren oder bei tiefen Temperaturen aufbewahrt werden.

Medistri. SA	Titel: Bericht für die mikrobiologische Validierung der Wiederverwendbarkeit des OneMumPumpSet ARDO MEDICAL AG	Bericht-Nr.: 717 - 010910 Rev: 0 Datum: 9. Februar 2011 <i>Kopie: Medistri SA</i> Seite 14 von 14
---------------------	---	--

Wurde die Spülprozedur gemäss Angaben des Herstellers befolgt, so konnte während 24/48 und 72 Stunden keine signifikante Anzahl an Keimen nachgewiesen werden (getestetes maximales Intervall zwischen dem Gebrauch: 4 Stunden).

Literatur

C. Quarello-Baldaccioni, A.M. Lacoste-Armynot, J. Benssadoun, J.P. Dauresand M. Simeon De Buochberg. 1999. *Bacterial contamination of human milk*. Medecineet Maladies Infectieuses, Volume 29, Number 9, pp. 587-591(5)

A. Lucas and C.D. Roberts. 1979. *Bacteriological quality control in human milk-banking*. British Medical Journal. 1 : 80

Ordonnance sur les exigences en matière d'hygiène et de microbiologie relatives aux denrées alimentaires, aux objets usuels, aux locaux, aux installations et au personnel