

**Etablierung eines Testverfahrens zur Prüfung sporizider
Flächendesinfektionsmittel**
mit dem Schwerpunkt
Clostridium difficile Ribotyp 027

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

vorgelegt von

Stefanie Gemein

aus

Meckenheim

Bonn, Juni 2011

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. M. Exner
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. H.-G. Sahl

Tag der Promotion: 18. Oktober 2011

Erscheinungsjahr: 2011

Die Kunst zu heilen kann viele Leiden lindern,
doch schöner ist die Kunst, die es versteht,
die Krankheit am Entstehen schon zu hindern.
Max von Pettenkofen (1818-1901)

... meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
1. EINLEITUNG	1
1.1 EINFÜHRUNG	1
1.2 DESINFEKTION	1
1.2.1 Definition.....	1
1.2.2 Geschichtliche Entwicklung der Desinfektion	3
1.3 DESINFEKTIONSMITTELPRÜFUNG	4
1.3.1 Prüfverfahren.....	4
1.4 LISTUNG VON DESINFEKTIONSMITTELN	5
1.5 EUROPÄISCHES NORMUNGSWESEN	7
1.6 SPORIZIDIEPRÜFUNG: STAND DER FORSCHUNG	8
1.7 BAKTERIELLE SPORENBILDNER	9
1.7.1 Allgemein.....	9
1.7.2 Entdeckung.....	10
1.7.3 Sporulationsprozess	10
1.7.4 Keimung (Germination).....	14
1.7.5 Eigenschaften.....	16
1.8 BACILLUS (<i>BACILLUS SUBTILIS</i>)	17
1.8.1 Allgemeines.....	17
1.8.2 Epidemiologie.....	17
1.9 <i>CLOSTRIDIUM DIFFICILE</i>	19
1.9.1 Allgemeines.....	19
1.9.2 Epidemiestamm Ribotyp 027	20
1.9.3 Epidemiologie	22
1.9.4 Transmissionspfade.....	25
1.9.5 Prävention und Hygienemaßnahmen.....	26
1.9.6 Pathogenese und Symptomatik von CDAD.....	26
1.9.7 Risikofaktoren für eine CDAD	28
1.10 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	29

2. MATERIAL UND METHODEN	30
2.1 MATERIAL.....	30
2.1.1 Laborgeräte	30
2.1.2 Spezielle Laborausrüstung	31
2.1.3 Verbrauchsmaterialien	31
2.1.4 Mikroskope	31
2.1.5 Chemikalien und Substrate	32
2.1.6 Enzyme	34
2.1.7 Wasser	34
2.1.8 Lösungen und Puffer	34
2.1.9 Farbstofflösungen.....	36
2.1.10 Farbstoffe und Substanzen für die Mikroskopie.....	37
2.1.11 Nährmedien/ Nährbouillon.....	38
2.1.12 Desinfektionsmittel	44
2.1.13 Neutralisatoren.....	46
2.1.14 Herstellung der Produktprüflösungen	47
2.1.15 Herstellung der Belastungssubstanzen	47
2.1.16 Bakterienstämme	48
2.2 MIKROSKOPISCHE METHODEN	48
2.2.1 Lebendpräparate	48
2.2.2 Gram-Färbung	48
2.2.3 Sporenfärbung.....	49
2.2.4 Rasterelektronenmikroskopie (REM)	49
2.3 ALLGEMEINE MIKROBIOLOGISCHE METHODEN	50
2.3.1 Stammhaltung, Aufbewahrung von Testorganismen.....	50
2.3.2 Kultivierung.....	50
2.3.3 Bestimmung der koloniebildende Einheiten (KBE)	50
2.3.4 Bestimmung der Gesamtzellzahl (GZZ)	50
2.3.5 Bestimmung des Sporenanteils (Reinheit)	51
2.4 METHODEN ZUR ANREICHERUNG VON SPOREN	51
2.4.1 Anreicherung von <i>B. subtilis</i> -Sporen – SOP 112 Bonn.....	51
2.4.2 Anreicherung von <i>B. subtilis</i> -Sporen – EN 14347	53
2.4.3 Anreicherung von <i>B. subtilis</i> -Sporen – EN 13704	54
2.4.4 Anreicherung von <i>B. subtilis</i> Sporen – OECD	55
2.4.5 Anreicherung von <i>C. difficile</i> -Sporen – SOP 156 Bonn	56
2.4.6 Anreicherung von <i>C. difficile</i> -Sporen – RKI-Methode	57
2.5 ENZYMVERDAU (SPORENREINIGUNG)	59

2.6	QUANTITATIVER SUSPENSIONSVERSUCH (PHASE 2, STUFE 1)	59
2.6.1	DGHM-Standardmethoden modifiziert	60
2.6.2	Phase 2, Stufe 1 (prEN 13727 modifiziert)	61
2.7	PRAXISNAHE VERSUCHE (PHASE 2, STUFE 2)	63
2.7.1	Fächendesinfektion ohne Mechanik	63
2.7.2	Flächendesinfektion mit Mechanik	64
2.7.3	4-Felder Test – patientennahe Flächen	66
3.	ERGEBNISSE	68
3.1	<i>B. SUBTILIS</i> -SPORENSUSPENSIONEN	68
3.1.1	Sporenanreicherung nach SOP 112 Bonn	68
3.1.2	Sporenanreicherung nach EN 14347	69
3.1.3	Sporenanreicherung nach EN 13704	70
3.1.4	Sporenanreicherung nach OECD	71
3.2	<i>C. DIFFICILE</i> -SPORENSUSPENSIONEN	73
3.2.1	Sporenanreicherung nach SOP 156 Bonn	73
3.2.2	Sporenanreicherung nach RKI-Methode	81
3.3	TESTUNG MIT STANDARDSUBSTANZEN	83
3.3.1	<i>B. subtilis</i> -Sporen	83
3.3.2	<i>C. difficile</i> -Sporen	88
3.3.3	Desinfektionsmittel	94
3.4	TESTUNG VON DESINFEKTIONSMITTELN IM 2-STUFEN-MODELL	100
3.4.1	<i>C. difficile</i> -Sporen	100
3.4.2	<i>B. subtilis</i> -Sporen	113
4.	DISKUSSION	115
4.1	AUSWAHL EINES GEEIGNETEN SPOREANREICHERUNGSVERFAHRENS	116
4.1.1	Anforderungen an das Sporulationsverfahren	116
4.1.2	Anreicherungsverfahren für <i>B. subtilis</i> -Sporen	117
4.1.3	Anreicherungsverfahren für <i>C. difficile</i> -Sporen	119
4.1.4	Spezielle Erkenntnisse zu den Anreicherungsverfahren	122
4.2	AUSWAHL DER GEEIGNETEN ENDOSPOREN	124
4.2.1	Chemoresistenzvergleich: <i>B. subtilis</i> - und <i>C. difficile</i> -Sporen	125
4.2.2	<i>C. difficile</i> als Surrogat für Desinfektionsmitteltestungen	126
4.2.3	Sporizidieprüfung: Validierung und Qualitätssicherung	127

4.3	UNTERSUCHUNG VON HANDELSPRODUKTEN.....	129
4.3.1	Praktikabilität der Prüfmodelle für die Sporizidieprüfung	130
4.3.2	Flächendesinfektion ohne Mechanik (Phase 2, Stufe 2 Test).....	132
4.3.3	4-Felder Test (Phase 2, Stufe 2 Test)	134
4.3.4	Wirksame sporizide Flächendesinfektionsmittel.....	136
4.4	VERWERTUNGSPLAN.....	138
5.	ZUSAMMENFASSUNG	140
6.	LITERATURVERZEICHNIS	142
	ANHANG	162
	DANKSAGUNG	164

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AF	Akkumulationsfaktor
ATCC	American Type Culture Collection
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
BAM	Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung
BD	Becton und Dickinson
BHA	Brain-Heart-Agar / Hirn-Herz-Agar
BHI	Brain-Heart-Infusion / Hirn-Herz-Bouillon
BMAS	Bundesministerium für Arbeit und Soziales
BSA	Bovine Serum Albumin Fraction V
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
CDAD	<i>Clostridium-difficile</i> -assoziierten-Diarrhoe
CDI	<i>Clostridium-difficile</i> -Infektion
CEN	Europäisches Komitee für Normung
<i>C. difficile</i>	<i>Clostridium difficile</i>
d	Tag(e)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DGHM	Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie
DIN	Deutsches Institut für Normung e.V.
DPA	Dipicolinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DVG	Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V.
DVV	Deutsche Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten e.V.
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
EN	Europäische Normen
ESCMID	European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases
ESGCD	ESCMID Studiengruppe für <i>Clostridium difficile</i>
et al.	und andere (et alii)
g	Gramm
<i>g</i>	Zentrifugalbeschleunigung
GYA	Glucose Hefeextrakt Agar
GZZ	Gesamtzellzahl
GA	Glutaraldehyd
GC-Gehalt	Guanin-Cystein-Gehalt
GYA	Glucose-Yeast-Agar (Glucose-Hefeextrakt-Agar)
GZZ	Gesamtzellzahl

h	Stunde(n)
H ₂ O	Wasser
HWG	Horizontal Working Group (Harmonisierungs-Arbeitsgruppe)
ID	Infektionsdosis
IfsG	Infektionsschutzgesetz
K	Kontrolle(n)
Ko1/ KoA	Wasserkontrolle (DGHM Methodik/ EN Methodik)
Ko2/ KoC	Neutralisationskontrolle (DGHM Methodik/ EN Methodik)
Ko3/ KoB	Toxizitätskontrolle (DGHM Methodik/ EN Methodik)
KBE	Koloniebildende Einheiten
KISS	Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System
M	Molare Masse
MAK	Maximale Arbeitsplatz-Konzentration
min	Minute(n)
mol/l	Molarität
MYA	Fleischextrakt-Agar
N	Ausgangskeimzahl
NaDCC	Natriumdichlorisocyanurat
NAL	Normausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte
NAMed	Normausschuss Medizin
n.d.	nicht durchgeführt
NAP1	North American Profile 1
NG	Nachweisgrenze
NRZ	Nationales Referenzzentrum
Nv	Validierungssuspension
n.d.	nicht durchgeführt
n.v.	nicht verfügbar
NvB	Validierungssuspension B
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development (Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung)
ÖGHMP	Österreichische Gesellschaft für Hygiene, Mikrobiologie und Präventivmedizin
PAA	Peressigsäure
PaLoc	Pathogenity Locus (Pathogenitätsinsel)
PCR	Polymerase-Chain-Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
pH	negative dekadische Logarithmus der Oxoniumionenkonzentration
prEN	Vornorm
PVC	Polyvinylchlorid
QAV	Quarternäre Ammonium Verbindung(en)
R027	Ribotyp 027

RC	Restkontamination
REA	Restriktions-Endonukleasen-Analyse
RF	Reduktionsfaktor
RKI	Robert Koch-Institut
rpm	Rotation pro Minute
SASPs	small, acid-soluble spore proteins (säurelöslichen Sporenproteine)
SFHH	Société Française d'Hygiène Hospitalière
SOP	Standard Operating Procedure (Standardarbeitsanweisung)
SpoTG	Sporicidal Task Group
TA	Taurocholate (Gallensalz)
TC	Technical Committee
TGB	Trypton-Glucose-Agar
TSA	Trypton-Soja-Agar
TSB	Trypton-Soja-Bouillon
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolettstrahlung
V	Volumen
VAH	Verbund für Angewandte Hygiene e.V.
WG	Arbeitsgruppe (Working Group)
WG1	Working Group 1 – Humanmedizin
WG2	Working Group 2 – Veterinärmedizin
WG3	Working Group 3 – Lebensmittelbereich
WSH	Wasser standardisierte Härte

1. EINLEITUNG

1.1 Einführung

Die Erarbeitung von Testverfahren zur standardisierten Wirksamkeitsprüfung chemischer Desinfektionsmittel gegenüber Sporen ist im humanmedizinischen Bereich von enormem Interesse, insbesondere vor dem Hintergrund der steigenden Inzidenz (Anzahl der Neuerkrankungen) der *Clostridium-difficile*-assoziierten-Diarrhoe (CDAD) in Deutschland und den europäischen Nachbarländern [RKI, 2008b]. Verschiedene Studien belegen bei betroffenen Patienten Haut- und Umgebungskontaminationen mit vegetativen Formen oder Sporen von *C. difficile* (siehe Kapitel 1.9.4), die unter anderem den Einsatz von sporizid wirksamen Flächendesinfektionsmitteln dringend erforderlich machen, um eine Verbreitung über beispielsweise patientennahen Flächen zu unterbinden. Die Problematik liegt in der Auswahl geeigneter sporizider Desinfektionsmittel für den klinischen Bereich, da zum einen stets die Patientenzuträglichkeit der Produkte berücksichtigt werden muss und zum anderen abgestimmte Verfahren zur Sporizidieprüfung fehlen, die eine unabhängige qualitätsgesicherte Leistung dieser Desinfektionsmittel zulassen würden.

Während im Bereich der Humanmedizin für die Bakterizidie, Fungizidie, Levurozidie und Mykobakterizidie / Tuberkolozidie bereits Prüfmethode auf nationaler und zum größten Teil auch auf internationaler Ebene etabliert wurden und für die Aufnahme in Desinfektionsmittellisten bereits langjährig herangezogen werden, befindet sich die Harmonisierung der Prüfverfahren von Desinfektionsmitteln gegenüber Sporen weiterhin in der Diskussion.

1.2 Desinfektion

1.2.1 Definition

Unter Desinfektion versteht man die Abtötung oder Inaktivierung von Krankheitserregern auf einem Gegenstand auf ein Maß, um diesen in einen nicht infektiösen Zustand zu versetzen [RKI, 2004; Bodenschatz, W., 2006; Assadian, O. & Kramer, A., 2008b; Müller, M. *et al.*, 2008]. Ziel der Desinfektion ist es, die Übertragung von krankheitserregenden Mikroorganismen zu verhindern und Infektionsketten zu unterbrechen. Je nach Anwendungsgebiet und Zielorganismus handelt es sich um eine Reduktion von 3 bis 5 \log_{10} -Stufen [Müller, M. *et al.*, 2008]. Hervorzuheben ist, dass bei den meisten Desinfektionsmaßnahmen die Inaktivierung vegetativer Zellen angestrebt wird. Die

Inaktivierung von Bakteriensporen hingegen steht dabei - nicht zuletzt wegen der fehlenden praxisnahen Prüfnormen - nicht im Vordergrund.

Die Desinfektion ist von Begriffen wie Antiseptik, Reinigung und Sterilisation klar zu differenzieren. Der Begriff der Antiseptik wird verwendet, wenn die Desinfektion nicht auf einem Gegenstand, sondern als antimikrobielle Maßnahme am oder im lebenden Gewebe stattfindet [Assadian, O. & Kramer, A., 2008a]. Die Hände stellen hierbei jedoch eine Ausnahme dar. Obwohl Hände zu lebenden Gewebe zählen, bezeichnet man die Desinfektion von Händen nicht als Händeantiseptik sondern als Händedesinfektion, da die Hände im Bereich der Desinfektionsmittelprüfung der Humanmedizin als Werkzeuge und damit als Gegenstände angesehen werden.

Die Reinigung bewirkt durch mechanische und chemische Verfahren eine Entfernung von anorganischen und/oder organischen Verunreinigungen. Eine Inaktivierung der Krankheitserreger findet hierbei nicht statt, so dass nach wie vor ein Infektionsrisiko von dem gereinigten Gegenstand ausgeht. Die Reinigung ist jedoch in der Regel Voraussetzung für eine erfolgreiche Desinfektion, da durch eine fehlende Entfernung der anorganischen und organischen Belastung die Wirksamkeit des Desinfektionswirkstoffes beeinflusst werden kann. Die heutigen handelsüblichen Desinfektionsmittel verfügen in der Regel über eine gleichzeitig reinigende Wirkung. Grobe oder massive Verschmutzungen mit organischem Material sollten vorab mit einem Desinfektionsmittel getränktem Tuch entfernt werden. Anschließend kann die Desinfektion mit einem neuen Wischtuch erfolgen [VAH, 2009].

Die Sterilisation bezeichnet eine vollständige "Eliminierung" von vermehrungsfähigen Mikroorganismen inkl. der resistenten bakteriellen Dauerformen. Sie erfordert nicht zwangsläufig eine Entfernung der inaktivierten Mikroorganismen, doch dürfen diese nicht mehr infektiös oder vermehrungsfähig sein [Bodenschatz, W., 2006].

Grundsätzlich werden laufende Desinfektionen von gezielten Desinfektionen unterschieden. Laufende Desinfektionen werden auch als routinemäßige oder prophylaktische Desinfektionen bezeichnet und zielen darauf ab, Infektionsketten zu verhindern [RKI, 2004]. Fällt indes eine konkrete Kontamination auf Gegenständen oder Händen auf, so wird eine anlassbezogene, gezielte Desinfektion durchgeführt. Unter die gezielte Desinfektion fällt auch die so genannte Schlussdesinfektion [RKI, 2004].

In der Humanmedizin werden die folgenden Anwendungsgebiete berücksichtigt:

- Händedesinfektion und Hautantiseptik
- Flächendesinfektion
- Instrumentendesinfektion
- Wäschedesinfektion

Die Flächendesinfektion, die Schwerpunkt dieser Arbeit ist, zählt zu den wohl am häufigsten kontrovers diskutierten Präventionsmaßnahmen in der Krankenhaushygiene. Einige

Wissenschaftler sprechen sich immer wieder gegen die routinemäßige Flächendesinfektion aus und stützen sich dabei auf fehlende epidemiologische Daten, die den direkten Zusammenhang von Desinfektionsmaßnahmen und dem Rückgang nosokomialer Infektionen deutlich aufzeigen könnten [Allerberger, F. *et al.*, 2002; Rüden, H. & Daschner, F., 2002; Dettenkofer, M. & Spencer, R. C., 2007; Lemmen, S., 2009]. Andere Wissenschaftler postulieren hingegen nachdrücklich eine Flächendesinfektion im Sinne des Patientenschutzes und berufen sich dabei auf zahlreiche Untersuchungen, die belegen, dass die unbelebte Umgebung zur Vermeidung des Infektionsrisikos und der Verbreitung nosokomialer Krankheitserreger eine nicht zu vernachlässigende Rolle spielt [Engelhart, S. *et al.*, 2002; Cozad, A. & Jones, R. D., 2003; Kramer, A. *et al.*, 2006]. M. Exner [2007, S. 2] vertritt die Ansicht, „dass die Diskussion um die Sinnhaftigkeit der Flächendesinfektion neben einer Verunsicherung der Anwender zu einer fehlenden Akzeptanz der Hygiene geführt und das Risiko für das Auftreten nosokomialer Infektionen wie die Zunahme antibiotikaresistenter Mikroorganismen erhöht hat“.

1.2.2 Geschichtliche Entwicklung der Desinfektion

Im Jahre 1847 erkannte Ignac Semmelweis den Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Krankheiten (z.B. Kindbettfieber) und mangelnder Hygiene. Mit entsprechenden Hygienemaßnahmen (Händedesinfektion mit Chlorkalk) konnte Semmelweis die Rate der Erkrankungen deutlich senken und prägte so das Thema Desinfektion. Joseph Lister führte etwa 20 Jahre später die Antiseptik in der Chirurgie ein und empfahl eine großflächige routinemäßige Desinfektion von Operationsräumen (Chirurgie) mit Karbol/Karbolsäure [Bodenschatz, W., 2006].

Robert Koch erkannte schon kurze Zeit später, dass das damals gängige Desinfektionsmittel Karbolsäure auf bakterielle Sporen keine desinfizierende Wirkung hat. Er forderte, dass Desinfektionsmittel ein Wirkspektrum haben sollten, welches auch bakterielle Sporen umfasst. Da keines der zur Verfügung stehenden Desinfektionsmittel diesen Anforderungen genügte, forschte er nach alternativen Verfahren und ermöglichte letztlich die Entwicklung der Sterilisationsverfahren [Assadian, O. & Kramer, A., 2008b].

Heute wird das Wirkspektrum von Desinfektionsmitteln durch die Unterteilung in eine bakterizide, levurozide, fungizide, tuberkulozide, mykobakterizide, sporizide und viruzide Wirksamkeit noch wesentlich differenzierter betrachtet [Gebel, J. *et al.*, 2008a]. Die meisten routinemäßigen Desinfektionen streben aufgrund der erforderlichen hohen Wirkstoffkonzentrationen und der damit verbundenen human- und umwelttoxikologischen Probleme derzeit jedoch keine Inaktivierung von bakteriellen Sporen an. Im Falle eines Ausbruchs mit *Clostridium difficile* wird der Einsatz eines sporizid wirksamen Desinfektionsmittels für die laufende Desinfektion allerdings notwendig.

1.3 Desinfektionsmittelprüfung

Die Prüfung der Wirksamkeit chemischer Desinfektionsmittel ist unerlässlich, um sicherzustellen, dass die Produkte den angestrebten Zweck - also eine bestimmte Desinfektionsaufgabe – erfüllen. Eine Wirksamkeit gilt als bestätigt, wenn die speziellen Anforderungen der entsprechenden Prüfungen erfüllt werden [Gebel, J. *et al.*, 2008a]. Auch wenn die diversen Prüfmethode nicht sämtliche Anwendungsfälle der Praxis darstellen können, gewährleisten sie unter standardisierten Bedingungen einen objektiven Vergleich verschiedener Produkte unter möglichst praxisnahen Bedingungen. Die Desinfektionsmittelprüfung kann durch eine Reihe von Faktoren wie beispielsweise Art und Menge der Testorganismen, pH-Wert, Prüftemperatur, organische Belastung etc. beeinflusst werden. Aus diesem Grund ist eine Standardisierung der Prüfverfahren unabdingbar. Grundsätzlich gilt, je praxisnäher eine Prüfmethode ist, umso sicherer kann die Leistungsfähigkeit des Desinfektionsmittels beurteilt werden [Gebel, J. *et al.*, 2008b].

1.3.1 Prüfverfahren

Die Wirksamkeitsprüfung von Desinfektionsmitteln läuft grundsätzlich in zwei Phasen ab: Suspensionsversuche und praxisnahe Versuche.

1.3.1.1 Suspensionsversuche

Suspensionsversuche sind so genannte *In-vitro*-Tests, die eine Aussage über den mikrobiziden Charakter eines Desinfektionsmittels zulassen, jedoch nicht ohne weiteres für die Auslobung eines Desinfektionsverfahrens herangezogen werden dürfen. Die qualitativen und quantitativen Suspensionsversuche entsprechen im Wesentlichen den europäischen Phase 1-Tests und Phase 2, Stufe 1-Tests.

- Die qualitativen Suspensionsversuche (Phase 1-Tests) sind für die Beurteilung der Wirksamkeit eines Produktes nicht verpflichtend, doch können hierdurch wirksame Konzentrationsbereiche sowie erhöhte Resistenzen einzelner Mikroorganismen ermittelt werden [Gebel, J. *et al.*, 2001].
- Die quantitativen Suspensionsversuche (Phase 2, Stufe 1-Tests) sind obligatorisch und werden in die Beurteilung der Desinfektionsmittelprüfung einbezogen. Bei diesen Tests werden die erreichten Reduktionen der Testorganismen für unterschiedliche Konzentrations-Zeit-Relationen unter Berücksichtigung von organischen Belastungen ermittelt. Die organische Belastung hängt von dem entsprechenden Anwendungsgebiet ab und wird in den jeweiligen Prüfmethode vorgegeben [Gebel, J. *et al.*, 2001].

1.3.1.2 Praxisnahe Versuche

Die Versuche unter praxisnahen Bedingungen lassen eine bessere Beurteilung der Wirksamkeit zu, da sie deutlicher die Anwendungsart des Desinfektionsmittels berücksichtigen.

- Die Flächendesinfektion „ohne Mechanik“ (DGHM-Standardmethoden 2001, Methode 14b) simuliert eine Sprühdesinfektion. Das Desinfektionsmittel wird dabei im Test ohne mechanischen Einfluss auf ein mit Testorganismen kontaminiertes Edelstahlplättchen gebracht [Gebel, J. *et al.*, 2001]. Eine vergleichbare europäische Methode stellt die EN 13697 [CEN, 2001] aus dem Lebensmittelbereich (WG3) dar, wobei für den humanmedizinischen Bereich (WG1) die organische Belastung angepasst werden muss [VAH-Mitteilung, 2007].
- Die Flächendesinfektion „mit Mechanik“ (DGHM-Standardmethoden 2001, Methode 14b) simuliert ein Scheuer-Wisch-Desinfektionsverfahren unter Berücksichtigung eines mechanischen Effektes [Gebel, J. *et al.*, 2001]. Dabei wird im Test das Desinfektionsmittel mit einem Glasspatel auf einer kontaminierten Keramikfliese verteilt.
- Der 4-Felder Test ist ein Testverfahren, bei dem das Desinfektionsmittel mit getränkten Wischutensilien auf einem kontaminierten PVC-Bodenbelag verteilt wird [Gebel, J. *et al.*, 2004]. Mit diesem Verfahren kann sowohl die Reduktion der Testorganismen als auch die mögliche Verbreitung auf vorher sterile Felder beobachtet werden. Auch wenn diese Prüfmethode derzeit nicht standardmäßig zur Wirksamkeitsprüfung auf nationaler oder internationaler Ebene eingesetzt wird, kommt sie den tatsächlichen Anwendungsbedingungen sehr nahe. Das Volumenverhältnis von Fläche und Desinfektionsmittel kann mit dieser Prüfmethode im Labormaßstab sehr gut simuliert werden und wird darum in dieser Arbeit mit berücksichtigt.

1.4 Listung von Desinfektionsmitteln

Die unabhängige qualitätsgesicherte Listung von Desinfektionsmitteln erfolgt auf nationaler Ebene durch bestimmte Institutionen. Diese Fachgesellschaften oder Verbände legen für das Listungsverfahren ihre eigenen Prüfmethode zugrunde, wobei zum Teil auch europäisch entwickelte Normen Anwendung finden. In Deutschland sind die folgenden Fachgesellschaften/Expertengremien verantwortlich:

- Verbund für Angewandte Hygiene (VAH):

Die VAH-Liste, vor dem Jahr 2004 auch als DGHM-Liste bekannt, führt Desinfektionsmittel für die prophylaktische, laufende Desinfektion auf, um Infektionsketten im Krankenhaus, ärztlichen und zahnärztlichen Praxen sowie in öffentlichen Bereichen (Kindertagesstätten, Sonnenstudios, Friseursalons etc.) vorzubeugen. Desinfektionsmittel für gezielte Desinfektionen können ebenfalls der VAH-Liste entnommen werden, nur sollte für derartige Desinfektionszwecke auf Produkte mit entsprechend kurzen Einwirkzeiten zurückgegriffen werden. Die Zertifizierung erfolgt durch eine Konformitätsbewertung von zwei unabhängigen Gutachten, wobei sich die Desinfektionsmittel-Kommission vorbehält Nachprüfungen durchzuführen [VAH, 2009].

- Robert Koch-Institut (RKI):

Das RKI stellt eine Liste mit unterschiedlichen Desinfektionsmitteln und Verfahren zur Verfügung. Diese Liste wird gemäß § 18 Infektionsschutzgesetz (IfSG) für behördlich angeordnete Entseuchungen herangezogen. Bei routinemäßigen, prophylaktischen und gezielten Desinfektionen, die nicht dem § 18 IfSG unterliegen, verweist das RKI auf die VAH-Liste [RKI, 2007d].

- Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (DVG)

Die Desinfektionsmittellisten der DVG haben das Unterbinden von Infektionsketten im Lebensmittelbereich und im veterinärmedizinischen Bereich (Tierhaltung) zum Ziel. Die Anforderungen und Prüfmethode sind hier an den entsprechenden Anwendungsbereich angepasst [DVG, 2003].

- Deutsche Gesellschaft zur Bekämpfung der Viruskrankheiten (DVV)

Die DVV hat die Verbesserung der prophylaktischen, viruswirksamen Desinfektion zum Ziel und stellt dem Anwender mit dem VAH eine entsprechende Liste zur Verfügung. Die Wirksamkeitsprüfung von Desinfektionsmitteln gegenüber Viren erfolgt derzeit im humanmedizinischen Bereich nur mit Suspensionsversuchen. Die Etablierung entsprechender praxisnaher Versuche ist in Bearbeitung [DVV, 1990; DVV/RKI, 2005].

Andere europäische Länder und die USA haben ihre eigenen Prüfsysteme über ihre Fachgesellschaften/Expertengremien etabliert, wie beispielsweise die Société Française d'Hygiène Hospitalière (SFHH), die Österreichische Gesellschaft für Hygiene, Mikrobiologie und Präventivmedizin (ÖGHMP) oder in den USA die Association of Official Analytical Chemists (AOAC).

1.5 Europäisches Normungswesen

Die Entwicklung und Etablierung von Normen erfolgt für den Bereich der chemischen Desinfektionsmittel und Antiseptika im technischen Komitee 216 (TC 216) der europäischen Normierungsinstitution Centre Européen de Normalisation (CEN) in Zusammenarbeit mit Experten nationaler Gremien. Das CEN TC 216 lässt sich in drei Arbeitsgruppen gliedern:

- WG1 (Working Group 1): Humanmedizin – Sekretariat beim Deutschen Institut für Normierung (DIN) in Deutschland
- WG2 (Working Group 2): Veterinärmedizin – Sekretariat beim British Standards Institution (BSI) in Großbritannien
- WG3 (Working Group 3): Lebensmittelhygiene, häuslicher- und institutioneller Bereich – Sekretariat bei der Association Française de Normalisation (AFNOR) in Frankreich

Auf nationaler Ebene werden diese Gremien in Arbeitsausschüssen gespiegelt. In Deutschland ist es der entsprechende Normausschuss beim DIN „NA 063-04-07 AA Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika in der Humanmedizin“. Die folgende Abbildung 1 gibt eine Übersicht:

Desinfektionsmittel-Testung in Europa

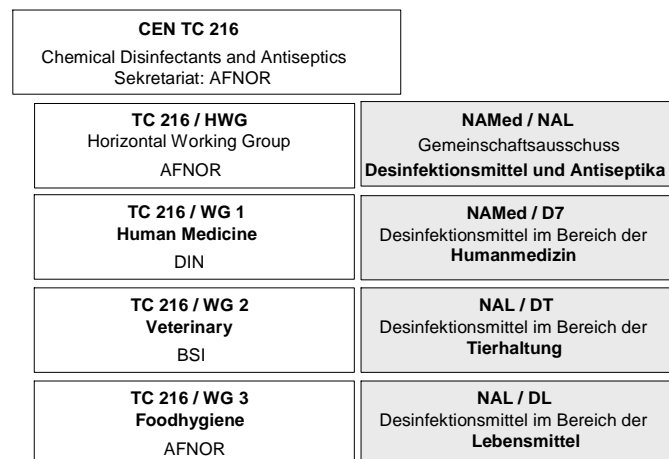


Abbildung 1: Organigramm des CEN TC 216

Aufgeführt sind die Zuständigkeiten der einzelnen Anwendungsgebiete des Arbeitsausschusses für chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika [Gebel, J. et al., 2008a]

Das Hauptziel des CEN TC 216 ist die Entwicklung standardisierter Prüfmethode nach dem folgenden drei Phasen-Modus:

- Phase 1 (Basistest)
- Phase 2, Stufe 1 (quantitative Suspensionsversuche)
- Phase 2, Stufe 2 (quantitative Keimträgertests)
- Phase 3 (Feldstudie)

Die erarbeiteten Normentwürfe innerhalb der Arbeitsgruppen werden nach einem entsprechenden Konsens an das übergeordnete CEN TC 216 geleitet, wo die zentralen Entscheidungen zur Verabschiedung einer Norm getroffen bzw. koordiniert werden.

Zur Optimierung des europäischen Normierungsprozesses wurden für die Arbeitsgruppen (WG1-WG3) bestimmte Unterarbeitsgruppen gebildet (z.B. Surface Task Group, Sporicidal Task Group, Virucidal Task Group, Ring Trial Task Group). Die Ringversuch-Arbeitsgruppen haben die Aufgabe, die Umsetzbarkeit bestimmter Normen zu prüfen und Aussagen über die intra- und interlaboratorielle Reproduzierbarkeit zu treffen.

1.6 Sporizidieprüfung: Stand der Forschung

Die Sporizidieprüfung ist ein großes Anliegen der europäischen Normierung (CEN TC 216), insbesondere weil in diesem Bereich noch ein relativ großer Entwicklungsbedarf vorhanden ist und zugleich die Bedeutung entsprechender europäischer Prüfnormen in den letzten Jahren deutlich gestiegen ist. Im humanmedizinischen Bereich (WG1) ist diese Entwicklung auf die steigende Inzidenz von *Clostridium-difficile*-assoziiertes-Diarrhoe [Graf, K. *et al.*, 2009] zurückzuführen. Aber auch aerobe Sporenbilder führen immer wieder zu klinischen Problemen [Banerjee, C. *et al.*, 1988; Kalpoe, J. S. *et al.*, 2008] und dürfen nicht vernachlässigt werden. Aufgrund der fehlenden Prüfnormen im humanmedizinischen Bereich (WG1) finden derzeit weder in Deutschland noch in anderen europäischen Nachbarländern qualitätsgesicherte Überprüfungen und Listungen von sporiziden Desinfektionsmitteln statt. Die folgende Tabelle 1 gibt eine Übersicht über den derzeitigen Stand der sporiziden Prüfnormen im CEN TC 216:

Tabelle 1: Übersicht der europäischen Prüfnormen zur Sporizidie im CEN TC 216

Arbeitsgruppen des CEN TC 216: Humanmedizin (WG1), Veterinärmedizin (WG2), Lebensmittelhygiene (WG3)

	WG1	WG2	WG3
Basistest (Phase 1)	EN 14347		
Quantitative Suspensionsversuche (Phase 2, Stufe 1)	—	—	EN 13704
Praxisnahe Versuche (Phase 2, Stufe 2)	—	—	—

Wie aus Tabelle 1 ersichtlich, ist im Bereich der Sporizidieprüfung noch erheblicher Entwicklungsbedarf vorhanden. Der derzeitige Stand der Entwicklung hat zur Folge, dass im humanmedizinischen Bereich (WG1) bereits viele Firmen - aufgrund der großen Nachfrage sporizider Desinfektionsmittel - dazu übergegangen sind, die Auslobung „Sporizide“ auf

Grundlage der Basistestungen nach EN 14347 [CEN, 2005] bzw. der EN 13704 [CEN, 2002] aus dem Lebensmittelbereich zu treffen, da Ihnen keine anderen Prüfverfahren zur Verfügung stehen. Wie jedoch in Kapitel 1.3.1 beschrieben, reicht ein Basistest (Phase 1-Test) oder ein quantitativer Suspensionsversuch (Phase 2, Stufe 1-Test) aufgrund der fehlenden Praxisnähe keineswegs aus, um eine sichere Aussage über die Wirksamkeit zu treffen.

Die Sporicidal Task Group (SpoTG) harmonisiert derzeit auf europäischer Ebene die unterschiedlichen Sporenanreicherungen der einzelnen Arbeitsgruppen. Auf der einen Seite sollen in der harmonisierten Normvorlage die entscheidenden Abläufe wie Versuchsablauf und die Anreicherung der bakteriellen Sporen vereinheitlicht und auf der anderen Seite die unterschiedlichen Parameter der Anwendungsgebiete (organische Belastung, Temperatur etc.) berücksichtigt werden.

1.7 Bakterielle Sporenbildner

1.7.1 Allgemein

Bakterielle Sporenbildner sind Bakterien, die in der Lage sind, so genannte Endosporen innerhalb ihrer Zelle zu bilden. Die reifen, differenzierten Endosporen weisen im Vergleich zu vegetativen Zellen eine deutlich höhere Widerstandsfähigkeit gegenüber chemischen und physikalischen Einflüssen auf [Wyant, Z. N. & Normington, R., 1920; Tallentire, A. & Chiori, C. O., 1963; Borick, P. M., 1968; Briggs, A. & Yazdany, S., 1974; Roberts, T. A. & Derrick, C. M., 1975; Molin, G., 1977; Shaker, L. A. *et al.*, 1988; Popham, D. L. *et al.*, 1995; Setlow, P., 2001; 2006; Ghosh, S. *et al.*, 2009]. Nur wenige Bakteriengattungen, wie beispielsweise *Bacillus* [Yudkin, M., 1993], *Clostridium* [Kaplan, I. & Williams, J. W., 1941; Raibaud, P. *et al.*, 1972], *Desulfotomaculum* [Nazina, T. N. & Pivovarova, T. A., 1979; Kaksonen, A. H. *et al.*, 2008], *Sporosarcina* [Magill, N. G. *et al.*, 1990] oder *Heliobacterium* [Ormerod, J. G. *et al.*, 1996] sind in der Lage derartige Sporen zu bilden. Alle Endosporenbildner haben gemein, dass sie den Gram-positiven Bakterien zugeordnet werden. Am Besten untersucht und aus medizinischer Sicht am relevantesten sind die Gattungen *Bacillus* (aerobe Sporenbildner) und *Clostridium* (anaerobe Sporenbildner).

Die Endosporen sind von anderen Dauerstadien wie den Exosporen [Titus, J. A. *et al.*, 1982], Myxosporen [Johnson, R. Y. & White, D., 1972; Bui, N. K. *et al.*, 2009] oder Cysten [Sadoff, H. L., 1975] klar zu differenzieren.

1.7.2 Entdeckung

Ferdinand Cohn entdeckte 1876 die hitzeresistenten Endosporen des *Bacillus subtilis* [Gould, G. W., 2006]. Cohn gilt als Entdecker der Endosporen und Begründer der systematischen Bakteriologie. Seine Systematik zur Klassifizierung legte die Grundlage für alle nachfolgenden Klassifizierungssysteme.

Noch im selben Jahr (1876) gelang es Robert Koch den Milzbranderreger *Bacillus anthracis*, den Aloys Pollender bereits 1849 entdeckt hatte, im Labor anzureichern. Durch die Übertragung der angezüchteten vegetativen Zellen bzw. Sporen von *B. anthracis* auf Versuchstiere gelang der Beweis für die bereits damals seit längerem vertretene Theorie, dass Krankheiten durch "Keime" ausgelöst werden können [Ranghild, M., 2003].

Die Versuche mit dem endosporenbildenden Bakterium *Bacillus anthracis* belegten die Keim-Theorie und waren Voraussetzung für die Formulierung der fortwährend bestehenden Koch-Henlesche Postulate [Marre, R. *et al.*, 2000, S. 20]:

1. Der Krankheitserreger und seine Produkte sollten in allen Patienten mit der Infektionskrankheit und in den Teilen ihres Körpers, die von der Krankheit betroffen sind, nachweisbar sein.
2. Der Mikroorganismus soll aus den Geweben einer infizierten Person isoliert werden können und auf speziellen Nährböden kultivierbar sein.
3. Der isolierte und kultivierte Mikroorganismus sollte, wenn ein empfänglicher Wirt (Mensch oder Tier) damit infiziert wird, wieder ein typisches Krankheitsbild hervorrufen.
4. Der Mikroorganismus sollte aus einem derart experimentell infizierten Wirt wieder isoliert und kultiviert werden können und identisch mit dem ursprünglich isolierten Erreger sein.

Robert Koch gilt aufgrund seiner zahlreichen wissenschaftlichen Leistungen als Begründer der modernen, experimentellen Bakteriologie.

1.7.3 Sporulationsprozess

Der Ablauf der Endosporenbildung, also die Entwicklung der Endosporen innerhalb der vegetativen Zelle bis hin zur Bildung einer reifen, freiliegenden Endospore, wird als Sporulationsprozess bezeichnet. An dem komplexen zellulären Differenzierungsprozess sind laut Madigan *et al.* [2001] bis zu 200 verschiedene, sporenspezifische Gene beteiligt. Publikationen aus den Jahren 2004 bis 2007 belegen, dass während der Sporulation 383 Gene in der Mutterzelle und 143 verschiedene Gene in der Vorspore exprimiert werden [Eichenberger, P. *et al.*, 2004; Wang, S. T. *et al.*, 2006; Guillot, C. & Moran, C. P., Jr., 2007]. Der Differenzierungsprozess zur Ausbildung der Sporen zählt zu den am Besten untersuchten Zelldifferenzierungsprozessen [Errington, J., 2003]. Die Bildung der Endospore wird durch Nährstoffmangel initialisiert und geht mit einer strikten Regulationskaskade einher,

die die morphologische Veränderung der Zelle räumlich und zeitlich koordiniert [Piggot, P. J., 1996; Driks, A., 2002; Phillips, Z. E. & Strauch, M. A., 2002]. Die Endosporenbildung wird in Folge der mikroskopischen und genetischen Erkenntnisse in acht verschiedene Stadien (Stadium 0 – VII) unterteilt (siehe Abbildung 2).

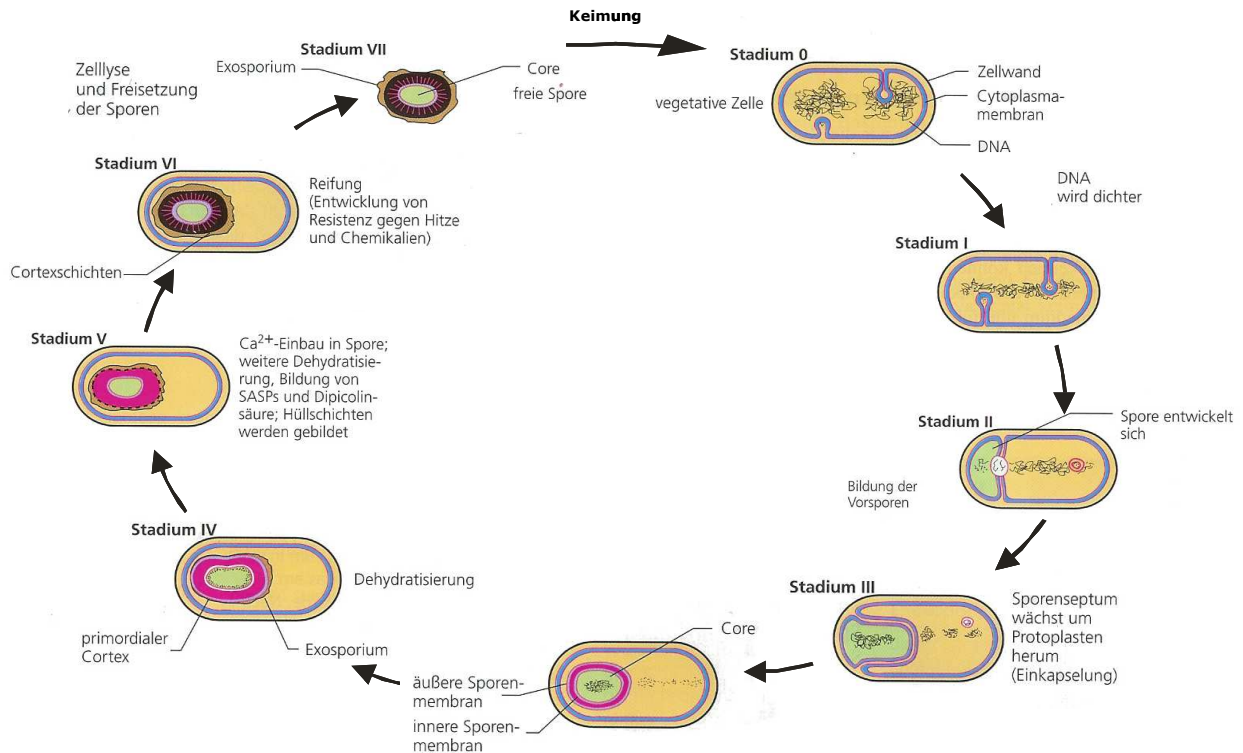


Abbildung 2: Entwicklungszyklus einer Endospore

Modifiziert nach Madigan et al. [2001]

Stadium 0

Im Stadium 0 fällt zunächst die Entscheidung zwischen Wachstum und Sporulation. Gelangt die Zelle beispielsweise durch Nährstoffmangel in die stationäre Phase und schlagen Möglichkeiten alternativer Ressourcenbeschaffung fehl, wie beispielsweise des Aufschlusses weiterer Nährstoffe durch Sekretion hydrolytischer Enzyme, so wird die Regulationskaskade zu Bildung der Endosporen initialisiert [Hoch, J. A., 1993; Phillips, Z. E. & Strauch, M. A., 2002]. Neben den externen Einflussfaktoren wie Nährstoffmangel scheinen auch interne Signale sowie die Kommunikation zwischen den Zellen bei der Auslösung der Sporenbildung eine Rolle zu spielen [Piggot, P. J., 1996]. Die Entscheidung über den Start der Sporulation ist irreversibel („commitment“), das heißt der Sporulationsprozess (Dauer ca. acht Stunden) wird abgeschlossen unabhängig davon, ob sich die Bedingungen für vegetatives Wachstum in dieser Zeit verbessern [Driks, A., 2002; Dworkin, J. & Losick, R., 2005]. Die Entscheidung über das so genannte „commitment“ kontrollieren verschiedene *spo0* Gene, die unter anderem das Schlüsselprotein Spo0A [Chibazakura, T. *et al.*, 1995; Dworkin, J. & Losick, R., 2005; Grenha, R. *et al.*, 2006] aktivieren.

Stadium I

In dieser Phase des Sporulationszyklusses erfolgen die Fertigstellung der Replikation der Chromosomen sowie die Segregation der DNA innerhalb der Zelle. Die DNA wird verdichtet und die asymmetrische, inäquale Teilung beginnt [Ryter, A., 1965; Piggot, P. J. & Hilbert, D. W., 2004].

Errington [1993] führt aus, dass das Stadium I – ursprünglich von Ryter im Jahre 1965 definiert – nicht weiter anerkannt werde, da bis dato keine spezifischen Genmutanten hätten gefunden werden können, die für dieses Stadium charakteristisch seien [Piggot, P. J. & Coote, J. G., 1976]. Aus diesem Grund wird diskutiert, ob die Stadien 0 und I nicht zusammengefasst werden sollten.

Stadium II

Im Stadium II kommt es zur Ausbildung eines asymmetrischen Septums, wodurch Vorspore (Protoplast) und Mutterzelle voneinander differenziert werden. Der Protoplast stellt das kleinere Zellkompartiment dar, besitzt aber dennoch dasselbe Genom wie die Mutterzelle. An der Ausbildung des Septums sind unter anderem die folgenden Gene beteiligt: *spolIA*, *spolIG*, *spolIE* [Errington, J., 1993; Fawcett, P. *et al.*, 1998; Eichenberger, P. *et al.*, 2001].

Stadium III

Nach der Bildung des Septums umwächst die Mutterzelle den Protoplast. Durch diese Einkapselung entsteht die eigentliche Vorspore, die aus zwei Peptidoglykanschichten besteht [Hilbert, D. W. & Piggot, P. J., 2004]. Für diese Regulation sind die Gene *spolID*, *spolIIA* von entscheidender Bedeutung [Eichenberger, P. *et al.*, 2001; Eichenberger, P. *et al.*, 2004; Guillot, C. & Moran, C. P., Jr., 2007].

Stadium IV

In der Phase IV wird zwischen den beiden Membranen der Vorspore eine modifizierte Peptidoglykanschicht synthetisiert [Warth, A. D. & Strominger, J. L., 1972]. Diese Schicht wird als Cortex bezeichnet. Sie besteht aus locker vernetztem Peptidoglycan [Warth, A. D. & Strominger, J. L., 1969; Atrih, A. *et al.*, 1996; Atrih, A. & Foster, S. J., 1999]. An der Synthese des Cortex sind unter anderem folgende Gene involviert: *spolVA*, *spolVH* und *spovR* [Errington, J., 1993; Beall, B. & Moran, C. P., Jr., 1994; Asai, K. *et al.*, 2001; Catalano, F. A. *et al.*, 2001; Imamura, D. *et al.*, 2004; Vasudevan, P. *et al.*, 2007].

Stadium V

Außerhalb der Cortex-Schicht kommt es zur Bildung der äußeren, proteinhaltigen Sporenhülle, dem sogenannten Coat [Serrano, M. *et al.*, 1999; Henriques, A. O. & Moran, C. P., Jr., 2000]. Sie macht einen Großteil der Spore aus und besteht laut A. D. Russell [1990] hauptsächlich aus Proteinen mit geringeren Mengen an komplexen Kohlenhydraten und Lipiden und möglicherweise größeren Mengen an Phosphor. Russel differenziert weiter

zwischen einer inneren, alkalilöslichen und äußeren, alkaliresistenten Coat-Schicht, die sich in ihrer chemischen Zusammensetzung unterscheiden.

Der Coat stellt in vielen sporenbildenden Spezies die äußerste Sporenstruktur dar. In einigen Spezies, wie bei den pathogenen Mikroorganismen *B. anthracis*, *B. cereus* und *C. difficile* ist der Coat jedoch von einer weiteren Schicht, dem Exosporium, umgeben [Beaman, T. C. *et al.*, 1971; Hachisuka, Y. *et al.*, 1984; Panessa-Warren, B. J. *et al.*, 1997]. Der Coat ist für die Resistenz der Sporen von großer Bedeutung [Henriques, A. O. & Moran, C. P., Jr., 2000]. An der Regulation der äußeren Sporenhülle (Coat) sind unter anderem die Gene *cotA*, *cotB*, *cotC* und *gerE* beteiligt [Donovan, W. *et al.*, 1987; Zheng, L. B. & Losick, R., 1990; Serrano, M. *et al.*, 1999]. Mit den Stadien IV und V geht des Weiteren eine Dehydratisierung der Vospore einher.

Stadium VI

Der letzte Schritt der Endsporenbildung wird als Reifung bezeichnet. In dieser Phase erfolgen nur noch geringfügig sichtbare morphologische Veränderungen.

Die Bildung von kleinen säurelöslichen Sporenproteinen (SASPs) und Dipicolinsäure (DPA) sowie die Einlagerung von Calciumionen (Ca^{2+}) in der Spore sind entscheidende Vorgänge während der Endphase der Sporulation, die maßgeblich zur Resistenz der Endspore beitragen [Setlow, B. & Setlow, P., 1988; Cucchi, A. & Sanchez de Rivas, C., 1998; Magge, A. *et al.*, 2008]. SASPs werden in der späten Sporulationsphase synthetisiert und in der Germinationsphase (Keimphase) wieder sehr früh abgebaut, so dass sie weder in der frühen Sporulationsphase noch in vegetativen Zellen vorkommen. Nach Setlow [1988] erfolgt die Synthese hauptsächlich parallel zur Synthese der Glucose-Dehydrogenase und der *spoVA*-regulierten Proteine. Für die Codierung von SASPs sind die *ssp* Gene verantwortlich. Die säurelöslichen Sporenproteine sind im Kern (Core) der Spore lokalisiert und binden sich an die DNA zum Schutz vor beispielsweise UV-Strahlung oder trockener Hitze (siehe Abbildung 3) [Setlow, B. & Setlow, P., 1988; Errington, J., 1993; Cucchi, A. & Sanchez de Rivas, C., 1995; Setlow, B. & Setlow, P., 1995].

Die Dipicolinsäure wird zeitgleich bzw. kurze Zeit nach der Synthese der SASPs initialisiert [Setlow, P., 1988]. Die Pyridin-2,6-Diacarboxylsäure (DPA) bildet mit Calciumionen (Ca^{2+}) einen Komplex und ist ebenfalls im Kern der Spore (Core) lokalisiert. Der Calcium-Dipicolinsäure-Komplex (Ca^{2+} -DPA-Komplex) (siehe Abbildung 4) führt zur starken Reduzierung des Wassergehaltes im Sporenkern und schützt somit insbesondere vor Hitzeeinwirkung [Magge, A. *et al.*, 2008].

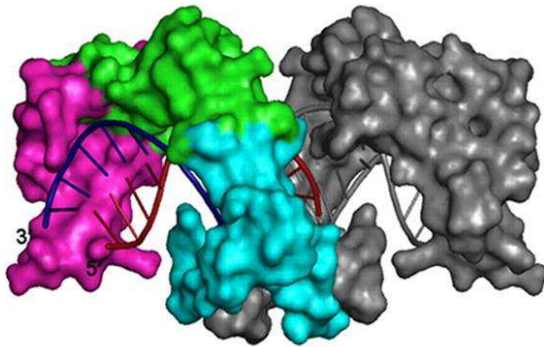


Abbildung 3: SASP-DNA Komplex

Verschiedene säurelösliche Sporenproteine (SASPs) [violett, grün, hellblau, grau] lagern sich um den DNA-Doppelstrang (rot, blau) [Lee, K. S. *et al.*, 2008].

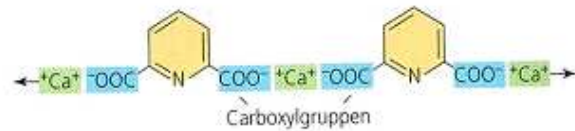


Abbildung 4: Ca²⁺-DPA-Komplex

Die Ca²⁺-Ionen vernetzen jeweils zwei Dippicolinsäure (DPA)-Moleküle und bilden so einen Komplex [Madigan, M. T., Martinko J.M., Parker, P., 2001].

Stadium VII

Dieses Stadium ist definiert als Freisetzung der reifen (*dormant*) Spore durch Lyse der Mutterzelle (siehe Abbildung 5). Die reife Spore zeichnet sich durch eine hohe Widerstandsfähigkeit gegenüber einer Vielzahl von Umwelteinflüssen aus (siehe Kapitel 1.7.5) und kann verschiedenen Publikationen zufolge mehrere Jahrzehnte lang keimfähig bleiben [Braun, M. *et al.*, 1981; Gest, H. & Mandelstam, J., 1987; Cano, R. J. & Borucki, M. K., 1995]

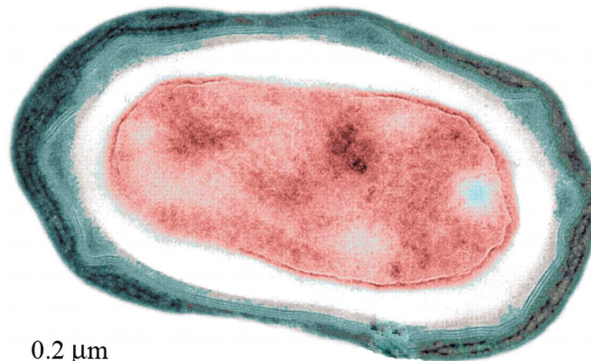


Abbildung 5: Transmissionselektronische Aufnahme einer *B. subtilis*-Spore (Wildtyp)

Rot: Kern, weiß: Cortex, grün: Coat (äußere Sporenhülle) [Sunde, E. P. *et al.*, 2009].

1.7.4 Keimung (Germination)

Die reifen Endosporen können Jahrzehnte lang ruhen [Gest, H. & Mandelstam, J., 1987] und besitzen fortwährend die Möglichkeit unter entsprechend günstigen Umwelteinflüssen, durch Keimung (Germination) in eine vegetative, metabolisch aktive Zelle auszuwachsen. In der Natur scheinen Sporen nur in Gegenwart von Nährstoffen, wie Aminosäuren, Zucker etc. zu keimern. Aber auch andere Stoffe wie beispielsweise Lysozym, Ca²⁺-DPA oder Gallensalz können eine Germination herbeiführen [Wilson, K. H., 1983; Wilcox, M. H. *et al.*, 2000; Setlow, P., 2003]. Neben den Stoffen, die eine Germination herbeiführen, sind auch Stoffe bekannt, wie beispielsweise Chenodeoxycholate, Glutaraldehyd, Phenole etc., die den

Keimungsprozess hemmen [Russell, A. D., 1990; Akoachere, M. *et al.*, 2007; Alvarez Z., A.-S. E., 2007; Sorg, J. A. & Sonenshein, A. L., 2009]. Bei chemischen Wirkstoffen ist in der Regel ihre gegenwärtige Konzentration und die Einwirkzeit für die Germination entscheidend. Werden z.B. zu geringe Konzentrationen eingesetzt, wird die Germination gehemmt. Im Bereich der Desinfektionsmitteltestung wird in diesem Fall häufig von einem sporostatischen Effekt [Russell, A. D., 1990] gesprochen.

Der Prozess der Keimung wird im Wesentlichen in drei Schritte unterteilt [Madigan, M. T., Martinko J.M., Parker, P. , 2001]: Aktivierung, Keimung und Auswachs (siehe Abbildung 6).

1. Aktivierung

Der Vorgang der Aktivierung ist bis zum heutigen Tag noch nicht vollständig geklärt, doch kommt es beispielsweise durch Erhitzen der Sporen auf subletale Temperaturen zur Aktivierung [Setlow, P., 2003]. Stehen sogenannte Germinaten (z.B. Aminosäuren, Zucker, Lysozym, Ca^{2+} -DPA, Gallensalz) zur Verfügung kommt es zur Initialisierung der Keimung.

2. Keimung (Germination)

In dieser Phase verlieren die Sporen ihre Eigenschaft der Lichtbrechung. Überträgt man die drei Schritte des Keimungsprozesses auf eine Publikation von P. Setlow [2003], so unterteilt er den Schritt der Keimung in zwei weitere Phasen. In Phase 1 findet unter anderem die Freisetzung von Kationen (H^+) statt. In Phase 2 ereignet sich die Hydrolyse des Cortex und die Ausbreitung des Kerns (Core) (siehe Abbildung 6).

3. Auswachsen

Das Auswachsen ist die letzte Phase des Prozesses der Germination. Hier kommt es zum Abbau der SASPs, die gleichzeitig als Kohlenstoff- und Energiequelle dienen. Makromoleküle wie RNA, Proteine etc. werden synthetisiert und die so entstandene Zelle tritt schließlich aus der äußeren Sporenhülle (Coat) aus und geht ins vegetative Wachstum über [Setlow, P., 2003; Moir, A., 2006]. An der Regulation der Germination sind verschiedene Gene bzw. Gen-Cluster beteiligt, wie *gerA*, *gerB*, *gerD* oder *gerK* [Errington, J., 1993; Setlow, P., 2003; Keijser, B. J. *et al.*, 2007].

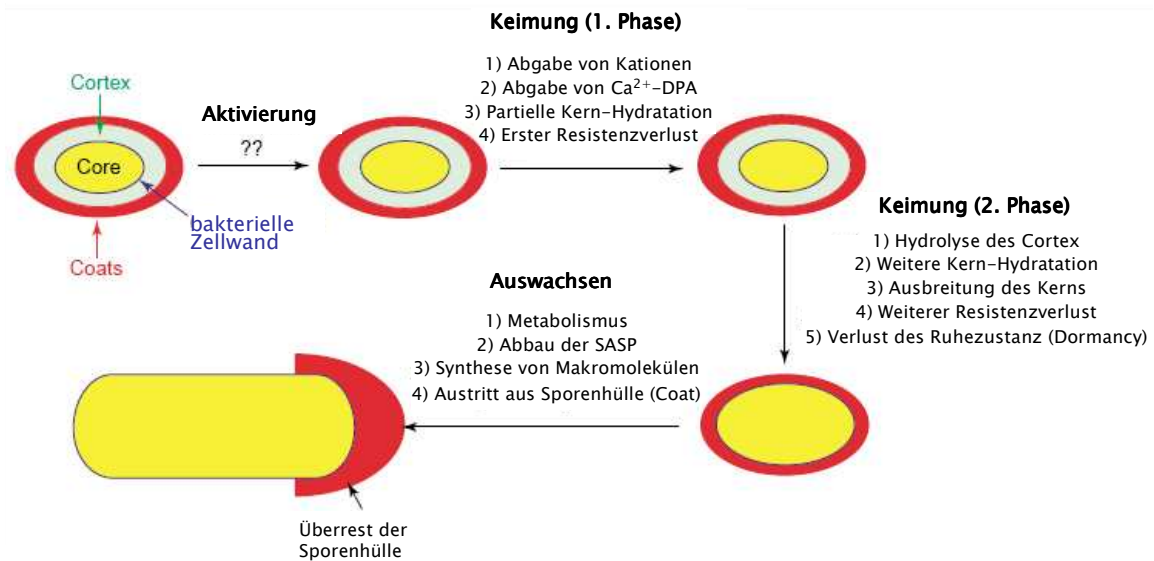


Abbildung 6: Ablaufprozesse während der Germinationsphase

Aktivierung, Keimung (1. und 2. Phase), Auswachsen; modifiziert nach P. Setlow [2003]:

1.7.5 Eigenschaften

Die reife, metabolisch ruhende Endospore zeichnet sich durch verschiedene Resistenz-Eigenschaften aus [Russell, A. D., 1990; Popham, D. L. *et al.*, 1995; Russell, A. D., 1998; Nicholson, W. L. & Galeano, B., 2003; Setlow, P., 2006; Lee, J. K. *et al.*, 2007; Magge, A. *et al.*, 2008; Sunde, E. P. *et al.*, 2009]:

1. Resistenz gegen Hitze
2. Resistenz gegen Strahlen
3. Resistenz gegen hohen Druck
4. Resistenz gegen Chemikalien
5. Resistenz gegen Trockenheit

Im Vergleich zur vegetativen Zelle zeichnet sich die Endospore des Weiteren durch Anwesenheit von kleinen säurelöslichen Sporenpoteine (SASP) und Dipicolinsäure (DPA) aus. Auch der Calciumgehalt ist in der Spore deutlich höher. Charakteristisch ist außerdem der geringe Wassergehalt im Kern der Spore mit 10 – 25%. Vegetative Zellen weisen im Vergleich dazu einen Wassergehalt von 80 - 90% auf. Die Stoffwechselaktivität ist sehr gering oder fehlt ganz und die Synthese von Makromolekülen stagniert. Mikroskopisch sind die Endosporen durch ihre Lichtbrechung eindeutig von vegetativen Zellen zu unterscheiden [Madigan, M. T., Martinko J.M., Parker, P. , 2001].

1.8 Bacillus (*Bacillus subtilis*)

1.8.1 Allgemeines

Die Bacillus-Arten gehören den aerob-sporenbildenden Bakterien an. Sie sind stäbchenförmig mit einer Länge von etwa 0,2 µm. Die Gattung Bacillus ist ubiquitär in der Luft, im Boden und im Wasser vorhanden und ist im Lebensmittelbereich von hoher ökonomischer und hygienischer Relevanz [Porwal, S. *et al.*, 2009]. Gemäß ihrem Zellwandaufbau werden die Bacillus-Arten den Gram-positiven Bakterien mit geringem GC-Gehalt zugeordnet. Der GC-Gehalt innerhalb der Bacillus-Arten variiert über einen Bereich von 40%, was die hohe Heterogenität sowohl phenotypisch als auch genotypisch verdeutlicht [Porwal, S. *et al.*, 2009].

Von den Bacillus-Arten wurde *Bacillus subtilis* erstmals 1835 von C.G. Ehrenberg als *Vibrio subtilis* beschrieben. 1872 ordnete F. Cohn diesen Stamm der Gattung Bacillus zu, wodurch es zur Umbenennung in *Bacillus subtilis* kam [Tindall, B. J. & Garrity, G. M., 2008].

Später wurde diese Spezies auch als Modellsystem zur Untersuchung der Differenzierungsprozesse herangezogen, da die Studien dieses endosporenbildenden Bakteriums am weitreichendsten waren. Vorteilhaft beim Umgang mit *Bacillus subtilis* als Modellsystem ist zudem die geringe Pathogenität (Risikogruppe 1). Andere Bacillus-Arten wie *B. anthracis* oder *B. cereus* führen sehr häufig zu Infektionsgeschehen mit durchaus lebensbedrohlichem Ausmaß.

Auch für den Bereich der Wirksamkeitstestung chemischer Desinfektionsmittel haben sich Bacillus-Arten durchgesetzt. Als aerobe, sporenbildende Mikroorganismen dienen sie als Modell-Organismen für viele andere relevante sporenbildende Bakterien.

1.8.2 Epidemiologie

Bacillus anthracis ist ein obligat humanpathogener Vertreter der Gattung Bacillus und führte insbesondere in der Vergangenheit immer wieder zu Krankheitsausbrüchen, zum Teil mit Todesfolge [Turner, A. J. *et al.*, 1999; Spencer, R. C., 2003]. Die größte Anthrax-Epidemie trat in 1979-1985 in Zimbabwe auf, wo mehr als 10.000 Menschen an der Milzbrandinfektion erkrankten [Cieslak, T. J. & Eitzen, E. M., Jr., 1999]. Der Einsatz von *Bacillus anthracis* als Biowaffe wurde bereits mehrfach beschrieben [Ibrahim, K. H. *et al.*, 1999; Inglesby, T. V. *et al.*, 1999; Turner, A. J. *et al.*, 1999]. So führten z.B. milzbrandverseuchte Briefe im Jahre 2001 in den USA zu Infektionen mit Todesfolge. Für den veterinärmedizinischen Bereich sind diese Sporen ebenfalls von Bedeutung, wie sich an einem aktuellen Anthrax-Ausbruch in einer schwedischen Rinderschlachtherde zeigt [Lewerin, S. S. *et al.*, 2010].

Die fakultativ humanpathogenen Spezies wie *B. cereus* oder *B. circulans* sind ebenfalls nicht zu vernachlässigen, da sie vor allem bei immunsupprimierten Personen immer wieder zu ernsthaften lokalen und systemischen Infektionen führen. Zu den lokalen Infektionen zählen Wund- und Brandinfektionen [Logan, N. A., 1988], sowie Infektionen des Auges (Endophthalmitis) [Miller, J. J. *et al.*, 2008]. Infektionen des Respirationstrakts, des zentralen Nervensystems oder des Herzens (Endokarditis) haben hingegen einen systemischen Verlauf und sind wie die lokalen Infektionen häufig auf mangelnde Desinfektion/Sterilisation der Instrumentarien zurückzuführen [Banerjee, C. *et al.*, 1988; Logan, N. A., 1988; Jacobs, J. A. & Stobberingh, E. E., 1992; Van Der Zwet, W. C. *et al.*, 2000; Dubouix, A. *et al.*, 2005; Kalpoe, J. S. *et al.*, 2008]. Im Bereich der Lebensmittelindustrie stellt sich *B. cereus* – ebenso wie seine verwandten Spezies – aufgrund seines ubiquitären Vorkommens und seiner hohen Hitzeresistenz als “Problemkeim“ dar, der häufig zu selbstlimitierten Lebensmittelvergiftungen führt [Portnoy, B. L. *et al.*, 1976; Logan, N. A., 1988; Andersson, A. *et al.*, 1995]. Die Bereitstellung qualitätsgesicherter sporizider Desinfektionsmittel ist somit für den Bereich der Humanmedizin (WG1), Veterinärmedizin (WG2) und Lebensmittelhygiene (WG3) von großer Bedeutung.

1.9 *Clostridium difficile*

1.9.1 Allgemeines

Clostridium difficile ist ein obligat anaerobes, stäbchenförmiges Bakterium mit der Fähigkeit zur Bildung aerotoleranter Sporen (siehe Abbildung 7). Die Klasse der Clostridia gehört wie die Bacilli dem Stamm der Firmicutes an. Die Clostridien werden somit wie die Bacillen (siehe Kapitel 1.8) taxonomisch den Gram-positiven Bakterien (siehe Abbildung 7 (B)) mit geringem GC-Gehalt zugeordnet. *Clostridium difficile* ist ubiquitär in der Umwelt (Boden, Oberflächenwasser) und im Darmtrakt von Tier und Mensch vertreten [Riley, T. V. *et al.*, 1991; al Saif, N. & Brazier, J. S., 1996]. Im Jahre 1935 wurde *C. difficile* erstmals von Hall und O'Toole bei der Untersuchung der Darmflora von Säuglingen beschrieben. Die Säuglinge zeigten keine Anzeichen einer Erkrankung (asymptomatisch) [Bryant, K. & McDonald, L. C., 2009]. Aufgrund der schwierigen Isolierung und Kultivierung wurde dem Erreger der Name *Clostridium difficile* (lat. *difficile* = schwierig) gegeben [Hall, I. C. & Duffett, N. D., 1935].

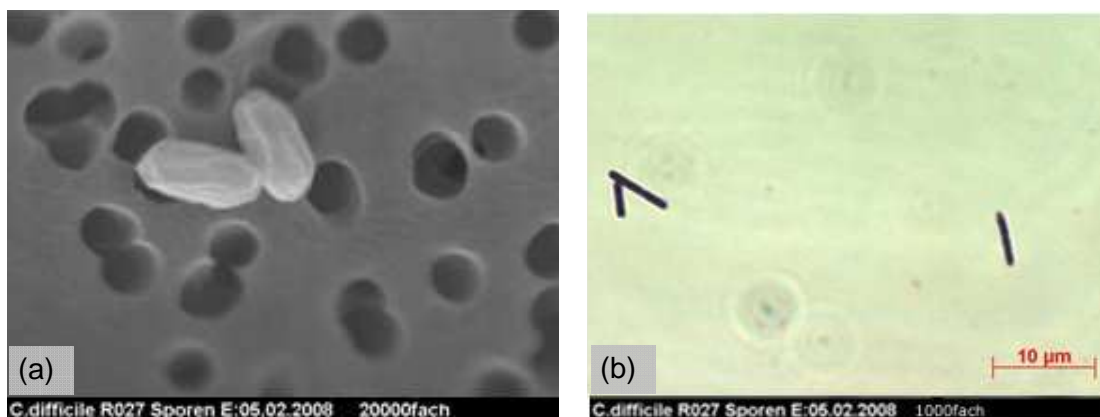


Abbildung 7: Mikroskopische Aufnahmen von *C. difficile* R027

(a) Rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahme von *C. difficile* R027-Sporen (Ernte: 05.02.2008) und (b) Gram-Färbung von vegetativen, Gram-positiven Zellen von *C. difficile*.

In der Zeit von 1974 - 1978 erkannten Tedesco *et al.* [1974a] [1974b] und Bartlett *et al.* [1978] erstmals die Kausalität von *C. difficile* als Erreger der pseudomembranösen Kolitis. Der Erreger ist heute einer der häufigsten Ursachen nosokomialer- und Antibiotika-assoziiertes-Diarrhoe weltweit [Arroyo, L. G. *et al.*, 2005a; Arroyo, L. G. *et al.*, 2005b]. In der Literatur werden etwa 15 - 20% auf Antibiotika-assoziierten-Durchfallerkrankungen und mehr als 95% der Fälle auf *Clostridium-difficile*-assoziiertes-pseudomembranöser-Kolitis zurückgeführt [Bartlett, J. G., 2002; RKI, 2009]. Insbesondere in den letzten Jahren kam es zu einer überregionalen Zunahme an *C. difficile*-Infektionen (CDI) und einer damit einhergehenden Zunahme der Morbidität und Mortalität [Schneider, T. *et al.*, 2007; RKI, 2008c]. Neben einer

Reihe von Virulenzfaktoren wie die Produktion hydrolytischer Enzyme, zählen die Exotoxine Toxin A und B zu den am besten untersuchten und bedeutsamsten Virulenzfaktoren von *C. difficile* [Poutanen, S. M. & Simor, A. E., 2004]. Der hypervirulente Epidemiestamm *C. difficile* Ribotyp 027 [Kuijper, E. J. *et al.*, 2006a; Goorhuis, A. *et al.*, 2008] gelangte in den allgemeinen Focus, da er sich durch eine Deletion im *tcdC*-Gen auszeichnet und so zu einer erhöhten Toxinbildung führt (siehe Kapitel 1.9.2).

1.9.2 Epidemiestamm Ribotyp 027

1.9.2.1 Überblick

Bei *C. difficile* Ribotyp 027 handelt es sich um eine hoch virulente Variante von *C. difficile*, die seit 2002 gehäuft zu endemischen Ausbrüchen von *Clostridium-difficile*-assoziiertes pseudomembranöser-Kolitis in Kanada [Pepin, J. *et al.*, 2005; MacCannell, D. R. *et al.*, 2006] und den USA [McDonald, L. C. *et al.*, 2005; Kuijper, E. J. *et al.*, 2006a; Kuijper, E. J. *et al.*, 2007] führte. Seit dem Jahre 2003 wurde nahezu zeitgleich von CDAD-Ausbrüchen in den europäischen Ländern Belgien [Joseph, R. *et al.*, 2005; Delmee, M. *et al.*, 2006], Holland [van Steenberghe, J. *et al.*, 2005; Kuijper, E. J. *et al.*, 2006b], Frankreich [Coignard, B. *et al.*, 2006; Tachon, M. *et al.*, 2006], Luxemburg [Kuijper, E. J. *et al.*, 2007] und Österreich [Indra, A. *et al.*, 2006; Indra, A. *et al.*, 2008] berichtet. Die europäische Gesellschaft für klinische Mikrobiologie und Infektionskrankheiten (ESCMID) konnte innerhalb der Studiengruppe für *Clostridium difficile* (ESGCD) im Jahre 2005 mit einer zweimonatigen Surveillance-Studie die Prävalenz von *C. difficile* Ribotyp 027 verursachten CDAD in zwölf europäischen Mitgliedsländern aufzeigen [Kuijper, E. J. *et al.*, 2007]. In Deutschland wurden zu diesem Zeitpunkt noch keine Ausbrüche mit dieser Erregervariante verzeichnet. Erst im April 2007 wurde der Subtyp 027 erstmals in Deutschland in der an Luxemburg angrenzenden Stadt Trier nachgewiesen [Kleinkauf, N. *et al.*, 2007; RKI, 2007b]. Aufgrund der Zunahme von *Clostridium-difficile*-Infektionen (CDI) mit einhergehend erhöhter Letalität gab das Robert Koch-Institut am 16.11.2007 eine Meldepflicht gemäß § 6 Abs. I Nr. 5a für schwer verlaufende CDI bekannt [RKI, 2007c].

Im Jahre 2008 berichtete das europäische Zentrum für Prävention und Kontrolle von Krankheiten (ECDC), dass der Ribotyp 027 bereits in 16 europäischen Ländern isoliert werden konnte (siehe Abbildung 11). In neun der sechzehn Länder kam es zu einem *C. difficile*-Ausbruch, in den anderen Ländern trat der Stamm nur sporadisch auf [Suetens, C., 2008].

Die Sensibilisierung für erhöhte Wachsamkeit und Etablierung geeigneter Maßnahmen zur Infektionskontrolle ist bei Endemiestämmen mit derart erhöhter Virulenz und veränderten Resistenzeigenschaften (Antibiotika, Desinfektionsmittel) von entscheidender Bedeutung.

1.9.2.2 Charakteristik

Die Charakterisierung des Ribotyp 027 erfolgt über eine Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR). In der Restriktions-Endonukleasen-Analyse (REA) wird der Stamm als Typ B1 und in der Pulsfeld-Gel-Elektrophorese als North American Profile 1 (NAP1) bezeichnet [McDonald, L. C. *et al.*, 2005; Reichardt, C. *et al.*, 2007]. *Clostridium difficile* Ribotyp 027 entspricht dem Toxintyp III und produziert sowohl das Toxin A (Enterotoxin) als auch das Toxin B (Zytotoxin). Charakteristisch für diesen Subtyp ist eine 18 bp Deletion im *tcdC*-Gen und die Produktion eines zusätzlichen binären Toxins (siehe Abbildung 8). Dieses binäre Toxin, eine Aktin-spezifische ADP-Ribosyltransferase, kann in bis zu 6 % der *C. difficile*-Stämme nachgewiesen werden. Das binäre Toxin wird durch zwei Gene kodiert, *cdtA* (die enzymatische Einheit) und *cdtB* (die Bindungseinheit) [Popoff, M. R. *et al.*, 1988].

Die erhöhte Zytotoxizität mit einer 16-fachen Toxin A und 23-fachen Toxin B Produktion wird auf die Deletion im Gen *tcdC* zurückgeführt. Inwieweit das binäre Toxin für die erhöhte Virulenz der Stämme verantwortlich ist, konnte noch nicht abschließend geklärt werden. Frühere Studien zeigten jedoch, dass *C. difficile*-Stämme mit einem binären Toxin nahezu immer ein Polymorphismus in einem bestimmten Bereich des Bakterienchromosoms (pathogenity locus = PaLoc) aufweisen und dem Toxintyp III zugeordnet werden können. Das Auftreten der CDI mit steigender Schwere der Erkrankung scheint mit dem Vorhandensein des binären Toxins zu korrelieren [McDonald, L. C. *et al.*, 2005].

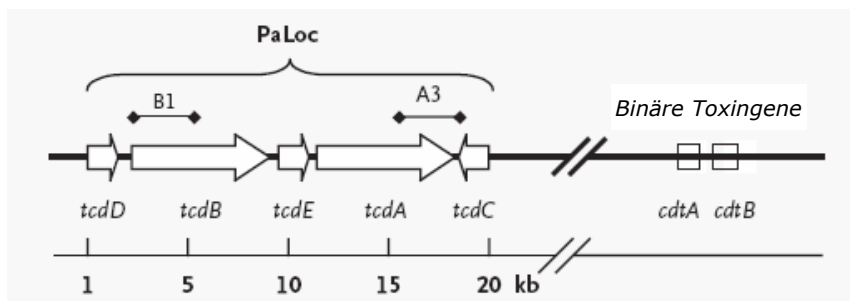


Abbildung 8: Schematische Darstellung der wichtigsten Gene im Pathogenitätsbereich (PaLoc) von *Clostridium difficile*

Die Gene *tcdA* und *tcdB* kodieren Toxin A und B; *tcdD* kodiert für einen Positivregulator der Produktion von Toxin A und B; *tcdC* kodiert für einen Negativregulator und das *tcdE* spielt bei der Freisetzung der Toxine aus der Bakterienzelle eine entscheidende Rolle (Transmembrantransporter). Die binären Toxingene *cdtA* und *cdtB* sind nicht auf dem PaLoc lokalisiert. Modifiziert nach L.C. McDonald [2005].

Kennzeichnend für den *C. difficile* Ribotyp 027 ist darüber hinaus die Resistenz gegenüber den meisten Fluorochinolonen (Gatifloxacin, Moxifloxacin, Levfloxacin) sowie gegenüber Makroliden (Erythromycin) [McDonald, L. C. *et al.*, 2005; Reichardt, C. *et al.*, 2007; RKI, 2009].

1.9.3 Epidemiologie

Clostridium difficile ist der häufigste anaerobe Erreger nosokomialer Infektionen. Während bis 1981 nur sehr wenig über die Epidemiologie der *C. difficile*-Infektion bekannt war [Fekety, R. *et al.*, 1981], hat sich insbesondere in den letzten Jahren - nicht zuletzt wegen der stark zunehmenden Inzidenz – die vorhandene epidemiologische Datenlage deutlich geändert. In den 1990ern blieb die Inzidenz der *C. difficile*-Infektionen in den USA stabil bei 30 bis 40 Fällen pro 100.000 stationär behandelte Patienten [Kelly, C. P. & LaMont, J. T., 2008]. Von 1996 bis 2003 verdoppelte sich die Anzahl der CDAD-Fälle von etwa 31/100.000 auf 61/100.000 stationär behandelte Patienten [McDonald, L. C. *et al.*, 2006]. Neben einer zum Teil fünf- bis zwanzigfachen Zunahme der Inzidenz in den USA und Kanada wurde darüber hinaus eine drei- bis fünffach erhöhte Letalität symptomatischer CDI beobachtet [Loo, V. G. *et al.*, 2005; McDonald, L. C. *et al.*, 2005; Redelings, M. D. *et al.*, 2007; Schneider, T. *et al.*, 2007].

In Deutschland stieg die Anzahl der CDAD-Fälle von gerundet 7/100.000 stationär behandelte Patienten im Jahr 2000 auf 39/100.000 im Jahr 2004 [Reichardt, C. *et al.*, 2007]. Im Jahr 2006 stieg die Anzahl der CDAD-Fälle in Deutschland weiter auf 98/100.000 vollstationäre Patienten an [RKI, 2008b]. Dass das Alter des Patienten bei der Prävalenz einer CDAD einen entscheidenden Einfluss hat, wird in einer Studie von R.-P. Vonberg *et al.* [2007] deutlich. Ältere Personen (> 65 Jahre) sind demnach deutlich häufiger betroffen als jüngere Personen (siehe Abbildung 9). Bei den übermittelten CDI gemäß IfSG von 01/2008 bis 12/2009 lag das Durchschnittsalter in Deutschland bei 76 Jahren, wobei nahezu 90% der Patienten über 65 Jahre waren [RKI, 2010].

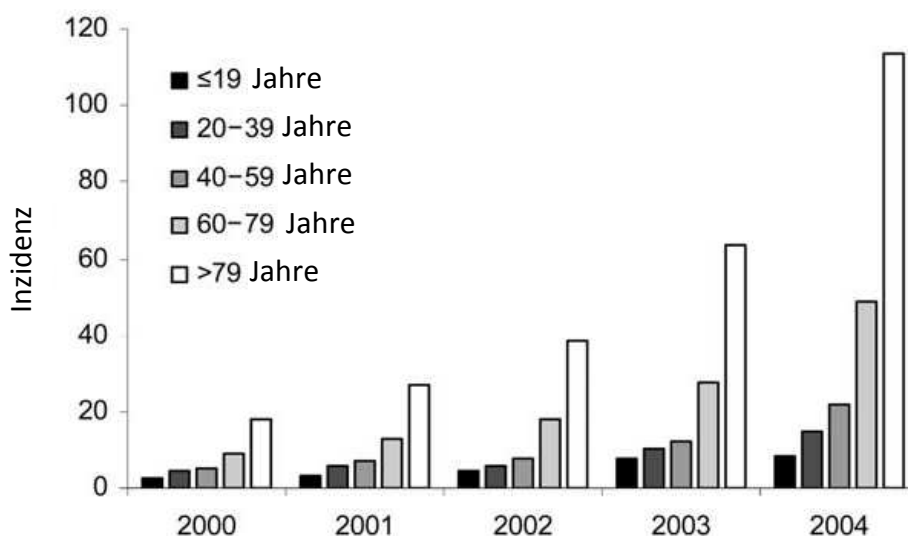


Abbildung 9: Inzidenz der *C. difficile*-assoziierten-Diarrhoe (CDAD) pro 100.000 stationär behandelte Patienten in Deutschland

Modifiziert nach R.-P. Vonberg *et al.* [2007]

Seit 2005 sind in verschiedenen Ländern Surveillance Studien entwickelt worden, um die Verbreitung des hochrelevanten und hypervirulenten *C. difficile* Ribotyp 027 zu dokumentieren und zu analysieren. In den USA wurden in 40 Staaten *C. difficile* Ribotyp-027-Infektionen registriert (siehe Abbildung 10). In Europa wurde der Subtyp 027 in 16 Ländern isoliert, wobei in sieben von sechzehn Ländern der Subtyp nur sporadisch auftrat (siehe Abbildung 11).

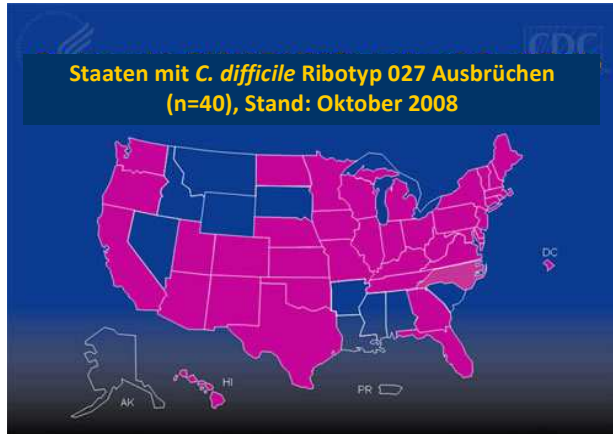


Abbildung 10: Verbreitung des *C. difficile* Ribotyps 027 in den USA (Stand: Oktober 2008)

In 40 Staaten der USA wurden *C. difficile* Ribotyp 027 Ausbrüche registriert. Quelle: Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Division of Healthcare Quality Promotion; National Center for Preparedness, Detection, and Control of Infectious Diseases (NCPDCID).



Abbildung 11: Verbreitung des *C. difficile* Ribotyps 027 in Europa (Stand: Juni 2008)

Sterne: *C. difficile* R027 - Ausbrüche, Punkte: Sporadisches Auftreten vom Subtyp 027; Zu beachten ist, dass nicht alle europäischen Länder ein Surveillance Studie entwickelt haben und Daten zu CDAD mit R027 liefern konnten [Kuijper, E. J. et al., 2008].

In Deutschland werden seit dem ersten Ausbruch von *C. difficile* Ribotyp 027 im Jahr 2007 im CDAD-Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System (CDAD-KISS) des Nationalen Referenzzentrums (NRZ) für Surveillance von nosokomialen Infektionen nosokomiale CDAD-Fälle erfasst. Die Differenzierung von nosokomialen und mitgebrachten Infektionen erfolgt gemäß der Empfehlungen des European Centres for Disease Prevention and Control (ECDC) [Kuijper, E. J. et al., 2006a], nach folgendem Prinzip (siehe Abbildung 12).

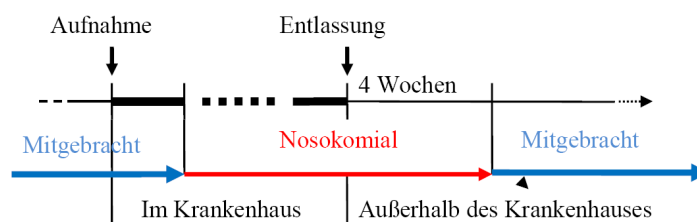


Abbildung 12: Zuordnung mitgebrachter und nosokomialer Infektionen

Mitgebrachter CDAD-Fall: CDAD vor Aufnahme bekannt oder CDAD-Symptome innerhalb 48 Stunden nach Aufnahme. Nosokomialer CDAD-Fall: CDAD-Symptome später drei Tage nach Aufnahme oder innerhalb der ersten drei Tage, wenn Patient innerhalb der letzten vier Wochen stationär im gleichen Krankenhaus behandelt wurde [NRZ, 2010].

Im Erfassungszeitraum von Januar 2008 bis Dezember 2009 wurden insgesamt 7.471 Fälle übermittelt. 817 Fälle erfüllten den Meldetatbestand des Infektionsschutzgesetzes (IfSG). Von diesen 817 Fällen wiesen 733 (89,7%) schwere Krankheitsverläufe auf, die in 441 (54,0%) Fällen zum Tod führten. Insgesamt konnte in 114 von den 817 Fällen (14,0%) ein *C. difficile* Isolat Ribotyp 027 nachgewiesen werden. Von den 114 nachgewiesenen Ribotyp-027-Fällen wiesen 30 (26,3%) einen schweren Krankheitsverlauf auf, von denen letztlich 14 Patienten (46,7%) verstarben [RKI, 2010].

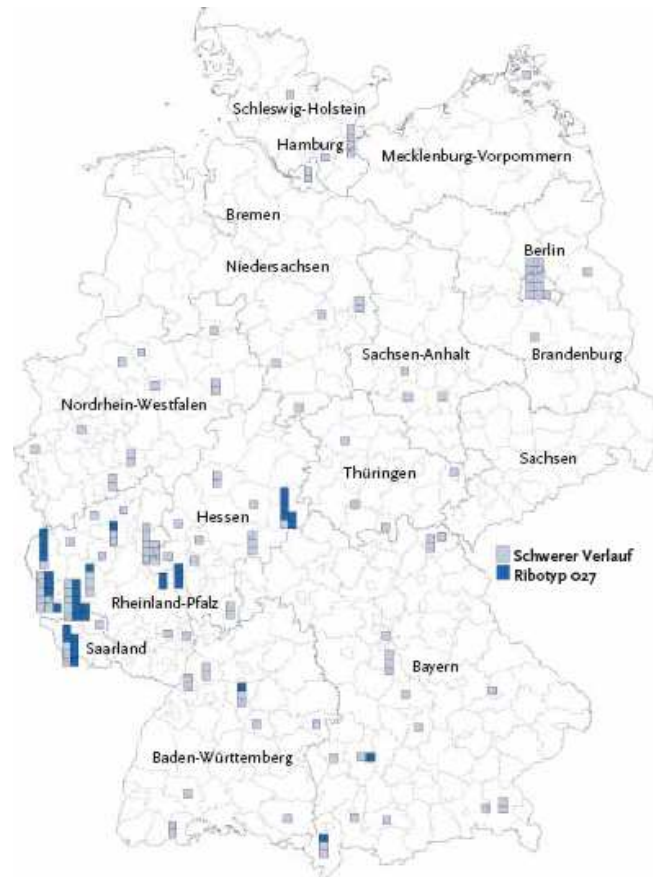


Abbildung 13: Dem RKI übermittelten Fälle schwer verlaufender CDAD von 01.01.2007 bis 31.03.2008 (Deutschland) [RKI, 2008c]

Das Robert Koch-Institut (RKI) stellte fest, dass deutliche Unterschiede in der Anzahl der Ribotyp-027-Meldungen bezogen auf die Bundesländer zu verzeichnen sind. Während im Saarland, in Hessen und in Rheinland-Pfalz mehrere Nachweise des Ribotyps 027 übermittelt wurden, wurde in anderen Bundesländern der Subtyp 027 nur vereinzelt oder gar nicht isoliert. Dies kann auf eine erhöhte Prävalenz von Ribotyp 027 im Südwesten Deutschlands hinweisen, wobei auch verschiedene andere Einflussfaktoren (z.B. Häufigkeit der Genotypisierungen in den einzelnen Bundesländern) eine wichtige Rolle spielen können [RKI, 2010]. Mit der zunehmenden Genotypisierung weltweit wurde deutlich, dass auch andere PCR-Ribotypen für die steigende Inzidenz der CDI verantwortlich sind. In Deutschland spielt neben dem Ribotyp 027 auch der Subtyp 001 eine bedeutende Rolle

[Arvand, M. *et al.*, 2009; RKI, 2010]. Das ECDC berichtet von einem PCR-Ribotyp 078, der Ähnlichkeiten zum Ribotyp 027 aufweisen soll und bereits vermehrt in Belgien, Holland, Nordirland und Schottland isoliert wurde [Suetens, C., 2008].

Aktuelle Studien aus Holland zeigen, dass die Anzahl der Ribotyp-027-Isolate rückläufig sind (3%) und das hingegen andere PCR-Ribotyp-Isolate wie 001 und 078, mit ähnlichen Mechanismen wie Ribotyp 027 (z.B. Hyperproduktion der Toxine), zunehmen [Hensgens, M. P. *et al.*, 2009].

1.9.4 Transmissionspfade

Die Übertragung von *C. difficile* erfolgt fäkal-oral über die unbelebte Umgebung (Handkontaktflächen, medizinische Instrumentarien) und über die Hände des Personals. Insbesondere vor dem Hintergrund der hohen Widerstandsfähigkeit und der Überdauerungsfähigkeit der bakteriellen Sporen auf Flächen ist die Kontamination der Umgebung nicht zu unterschätzen. Während manche vegetative Zellen maximal 15 Minuten auf Flächen überleben, überdauern Sporen hier bis zu fünf bis sechs Monate [Kim, K. H. *et al.*, 1981]. Inwieweit die Umgebung in Krankenhäusern mit *Clostridium difficile* kontaminiert ist und eine Rolle bei der Übertragung spielt, wurde in verschiedenen Studien beispielsweise von R. Fekety *et al.* [1981], K.H. Kim *et al.* [1981], L.V. McFarland [1989] [2002], M.H. Samore *et al.* [1996], P. Verity *et al.* [2001] oder W.N. Fawley *et al.* [2005] überprüft. Ausbruchsuntersuchungen von K.H. Kim [1981] auf einer chirurgischen Intensivstation zeigten, dass 48 der 432 Proben (11%) positiv waren und somit eine Flächenkontamination mit *C. difficile* nachwies. Zu den häufigsten Nachweisorten zählten Toilettenbrillen (33%), Bettpfannen (26%) und Fußböden (15%). Auf der Kontrollstation, ohne bekannten CDAD-Fall, wurden wesentlich geringere Umgebungskontaminationen (2,6%) mit *C. difficile* nachgewiesen. M.H. Samore [1996] legte ebenfalls eine Studie von Ausbruchsuntersuchungen auf 2 geriatrischen Stationen vor. Insgesamt waren hier sogar 841 der 2.550 (33%) Umgebungsuntersuchungen positiv. Die häufigsten Nachweisorte waren Fußböden (46%), Bettgestelle (19%), Heizungen (19%) und Schränke (8%). In einer prospektiven Untersuchung konnte McFarland [1989] zeigen, dass die Kontaminationsrate der Umgebung mit der klinischen Symptomatik korreliert. Da ca. 16 bis 35% der stationären Patienten asymptomatisch mit *C. difficile* kolonisiert sind [Reichardt, C. *et al.*, 2007], ist eine schnelle Akquisition und Ausbreitung des Erregers in Krankenhäusern möglich [Riggs, M. M. *et al.*, 2007]. In einer prospektiven Studie von A. Simon [2007] wird darüber hinaus auf die Relevanz nosokomial assoziierter *C. difficile*-Infektionen auf pädiatrischen Onkologiestationen hingewiesen. Aufgrund der altersbedingt-ungenügenden Handhygiene ist gerade in diesen Bereichen mit einer gehäuften nosokomialen Verbreitung des Erregers zu rechnen. Aufgrund des Tragens von Schutzhandschuhen sind die Hände eher selten mit

C. difficile kontaminiert. Die Kontamination der Hände kann gemäß der Publikation von Kampf et al. [2008] zwischen 1,7% und 17% liegen. Werden keine Schutzhandschuhe getragen, so ist mit einer Kontaminationsrate der Hände von 57% zu rechnen [McFarland, L. V. et al., 1989].

1.9.5 Prävention und Hygienemaßnahmen

Zur Prävention und Kontrolle von CDAD-Ausbrüchen sollten grundsätzlich die folgenden Punkte beachtet werden [Poutanen, S. M. & Simor, A. E., 2004; Plößer, P., 2007; Schneider, T. et al., 2007; RKI, 2009]:

- strikte und sorgfältige Umsetzung der Standardhygienemaßnahmen
- rationaler und restriktiver Einsatz von Antibiotika
- Möglichkeiten und Strategien zu Isolierungsmaßnahmen im Ausbruchfall
- erhöhte klinische Aufmerksamkeit (zwecks Früherkennung)
- Aufbau einer standardisierten mikrobiologischen Diagnostik (*C. difficile* spezifisch)
- Einbeziehung von Experten (Genotypisierung)
- Informationen, Schulung- und Fortbildung des Personals (Thema CDAD, Verbreitung)

Aufgrund der hohen Prävalenz von *C. difficile* in Krankenhäusern und Pflegeheimen und der Widerstandsfähigkeit der Sporen von *C. difficile* ist zur Vermeidung von Infektionsketten eine strikte und sorgfältige Umsetzung der Hygienemaßnahmen unabdingbar (siehe auch Kapitel 1.9.4). Hierfür ist entscheidend, dass zunächst die personellen und organisatorischen Voraussetzungen geschaffen werden [Exner, M. & Just, H.-M., 2009].

1.9.6 Pathogenese und Symptomatik von CDAD

Die Fähigkeit zur Bildung bakterieller Sporen erleichtert nicht nur maßgeblich die Transmission sondern auch die Pathogenese und Persistenz einer *Clostridium-difficile*-assoziierten-Diarrhoe bei Patienten. Nach fäkal-oraler Aufnahme des Krankheitserregers werden etwa 99% der vegetativen Formen im Magen inaktiviert (siehe Abbildung 14) [Wilson, K. H. et al., 1985]. Medikationen, die die Magensäurebildung hemmen (Protonenpumpen-Inhibitoren, H₂-Blocker) können dabei den Anteil der überlebenden Krankheitserreger entscheidend beeinflussen [Donskey, C. J., 2004]. Je nach Medikationen gelangen $\geq 1\%$ der *C. difficile*-Erreger (Sporen) in den Dünndarm, wo sie in Gegenwart von Gallensäure germinieren und sich im Kolon (Grimmdarm) vervielfältigen. Durch eine Reihe von Virulenzfaktoren, voran die Exotoxine Toxin A und B, kommt es letztlich zum Zerfall der Darmeptihelzellen und damit zur Kolitis und wässigen Diarrhoe [Poutanen, S. M. & Simor, A. E., 2004]. Der Anteil von Sporen im Darm und letztlich auch in Stuhlproben der Patienten, kann durch die Gabe von Antibiotika induziert bzw. erhöht werden [Donskey, C. J., 2004].

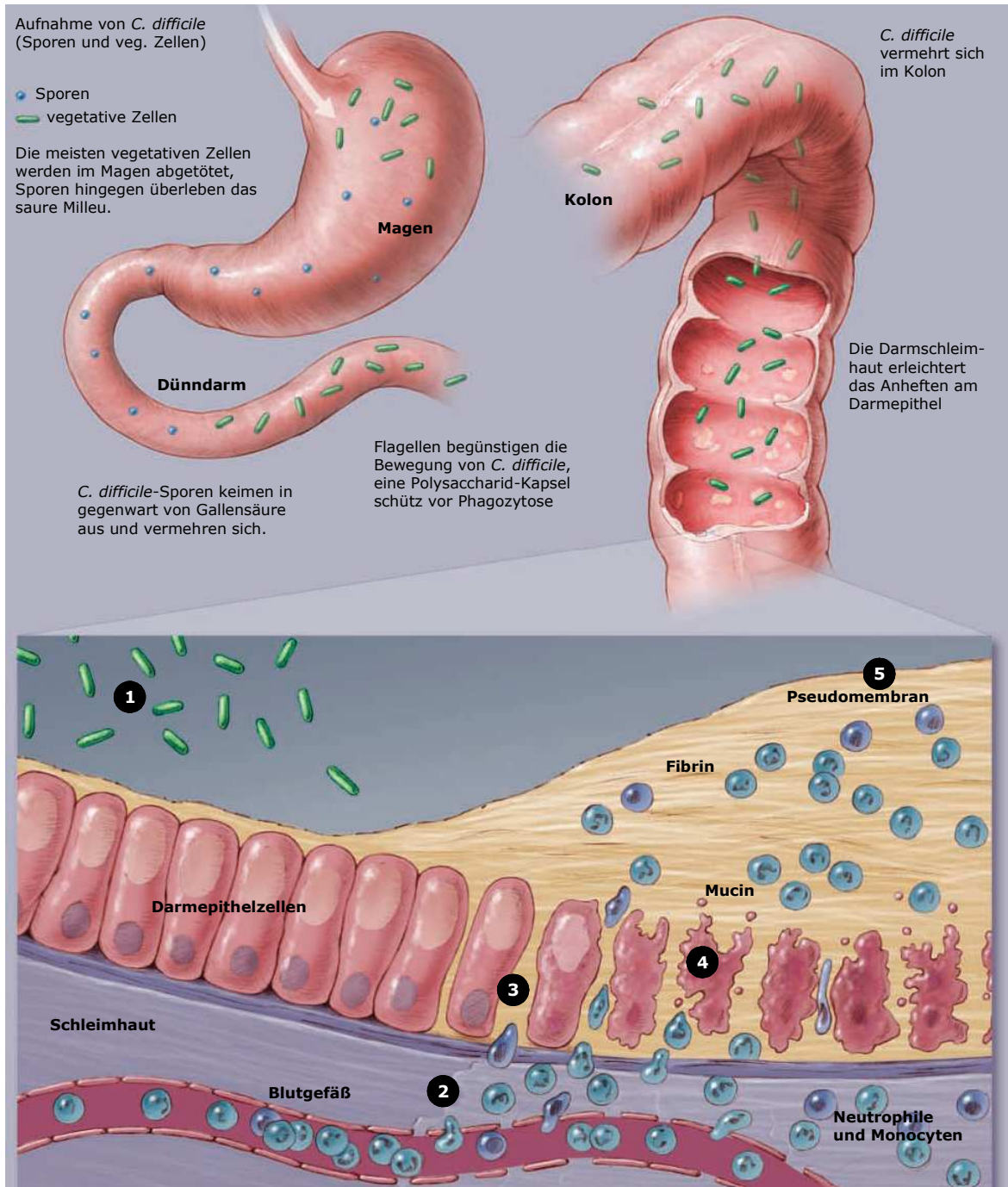


Abbildung 14: Pathogenese der *C. difficile*-assoziierten Diarrhoe (CDAD)

Vegetative Zellen von *C. difficile* produzieren Toxin A und B sowie hydrolytische Enzyme. (1) Die lokale Produktion der Toxine A und B führt zur Entstehung einer erhöhten Gefäßpermeabilität und der Vermehrung von Monocyten und Neutrophilen. (2) Erweiterung und Öffnung der Epithelzellenzwischenräume und (3) Apoptose der epithelialen Zellen. (4) Die lokale Produktion der hydrolytischen Enzyme führt zum Zerfall des Zellverbandes und damit zur Kolitis, pseudomembranen Formationen und (5) wässriger Diarrhoe. Modifiziert nach S.M. Poutanen und E. Simor [2004]

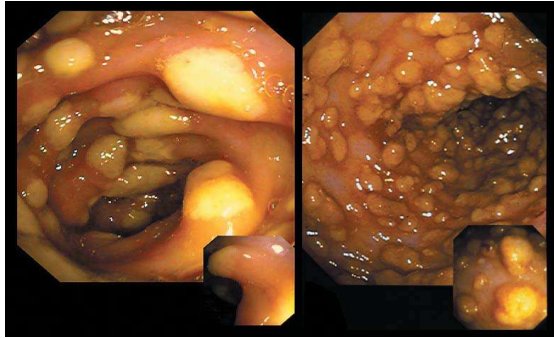


Abbildung 15: Charakteristische Pseudomembranen im Dickdarm eines CDAD-Patienten

Endoskopische Bilder aus dem Sigma (Bereich des Dickdarms) von CDAD-Patienten. Deutlich zu erkennen sind die Pseudomembranen, die unterschiedlich groß sein können [Schneider, T. *et al.*, 2007].

Infektionen mit *C. difficile* weisen ein breites Spektrum klinischer Manifestationen auf. Das Spektrum reicht von asymptomatischen Trägern bis hin zu symptomatischen Trägern mit einem unterschiedlich stark ausgeprägten bzw. fortgeschrittenen klinischen Befund [Poutanen, S. M. & Simor, A. E., 2004; Schlottmann, R. *et al.*, 2007]. Symptomatische Träger können neben der *Clostridium-difficile*-assoziierten-Diarrhoe (CDAD) auch schwerste Erkrankungen wie die pseudomembranöse Kolitis (siehe Abbildung 15) und das oft tödliche Megakolon manifestieren [Schlottmann, R. *et al.*, 2007]. Typischerweise

zeigt sich die CDAD als akute, wässrige Diarrhoe mit zum Teil krampfartigen Unterbauchschmerzen. Weitere Symptome sind Fieber, Appetitlosigkeit und Schwindel. In etwa 10 - 20% der CDAD-Fälle kommt es zur Bildung der charakteristischen Pseudomembranen, die bis zur fulminanten Kolitis oder zum toxischen Megakolon führen kann. Die Mortalitätsrate bei Manifestation eines Megakolons liegt bei 24% bis 38% [Poutanen, S. M. & Simor, A. E., 2004]. Bei der Therapie ist es in erster Linie wichtig, den Elektrolyt- und Flüssigkeitsverlust zu kompensieren. Zusätzlich sollte eine spezifische Therapie gegen *C. difficile* mit Metronidazol und ggf. zusätzlich mit Vancomycin eingeleitet werden [Schneider, T. *et al.*, 2007].

1.9.7 Risikofaktoren für eine CDAD

Zu den Risikofaktoren einer *Clostridium-difficile*-assoziierten-Diarrhoe (CDAD) zählen folgende Faktoren [Poutanen, S. M. & Simor, A. E., 2004; Owens, R. C., Jr. *et al.*, 2008; RKI, 2009]:

- Antibiotikatherapien (in den letzten 3-6 Monaten)
- Erhöhtes Alter der Patienten (> 65 Jahre)
- Krankenhausaufenthalte (> drei Tage)
- Schwere Grunderkrankungen (Immunsuppression)
- gastrointestinale Grunderkrankungen
- Sondenernährung

Neben diesen Faktoren zählen aufgrund der möglichen Verbreitung und Re-Infektionen mit *C. difficile* auch mangelnde Hygienemaßnahmen zu einem entscheidenden Risikofaktor (siehe Kapitel 1.9.4).

1.10 Zielsetzung der Arbeit

In den letzten Jahren wurde ein signifikanter Anstieg von *Clostridium-difficile*-Infektionen (CDI) und damit verbunden eine steigende Morbidität und Mortalität beobachtet [RKI, 2008c; b]. Seit 2007 wurde die schwer verlaufende *Clostridium-difficile*-assoziierte-Diarhoe (CDAD) gemäß § 6 Abs. 1 Nr. 5 a Infektionsschutzgesetz (IfSG) meldepflichtig. Von den übermittelten CDI in Deutschland wurden in dem Zeitraum von Januar 2008 bis Dezember 2009 insgesamt 441 (54%) Todesfälle registriert [RKI, 2010]. Durch die Fähigkeit von *C. difficile* zur Bildung bakterieller Sporen wird unter anderem der Einsatz wirksamer sporizider Desinfektionsmittel zur Umsetzung der Hygienemaßnahmen dringend erforderlich. Es ist jedoch schwierig, geeignete sporizid wirksame Desinfektionsmittel zu finden, da abgestimmte Vorschriften bzw. Normen zur Sporizidieprüfung fehlen.

Im Rahmen dieser Arbeit soll diese Problematik aufgegriffen werden und ein komplettes Testdesign zur Überprüfung der sporiziden Wirksamkeit von Flächendesinfektionsmitteln erarbeitet werden. Dabei sollten sowohl klinisch relevante anaerobe Sporenbildner, wie in diesem Fall der hochpathogene PCR-Ribotyp 027 von *Clostridium difficile*, als auch aerobe Sporenbildner, wie *Bacillus subtilis*, als Indikatororganismen in das Prüfdesign eingebunden werden. Voraussetzung für die Entwicklung des Testdesigns war die Etablierung von Anreicherungsverfahren, die es gewährleisten, dass ruhende ("dormant") Sporen in ausreichend hoher Konzentration und homogen verteilt für die Testungen bereitgestellt werden konnten. Neben der Etablierung eines quantitativen Suspensionsversuches sollte vor allem die Etablierung von belastbaren und aussagekräftigen praxisnahen Versuchen (Phase 2, Stufe 2 – Tests, 4-Felder Test) durchgeführt werden.

Ein Teilziel dieser Arbeit war die Empfehlung sporizid wirksamer Desinfektionsmittel für den Ausbruchsfall.

Kernziel der Arbeit war die Bereitstellung eines umfassenden Untersuchungsdesigns für die Bewertung von sporiziden Flächendesinfektionsmitteln, welches als Entwurf in den europäischen Normierungsprozess im CEN TC 216 (Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika) in die Arbeitsgruppe der Humanmedizin (WG1) einfließen soll.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte

Tabelle 2: Verwendete Laborgeräte (Modell- und Herstellerangaben)

Geräte	Modell	Hersteller
Analysewaage	770-60	Kern
Brutschrank (37 °C)	B 6420	Heraeus
Brutschrank (30 °C)	B 6200	Heraeus
Filtrationstrichter mit Silikonstopfen	Sterifil 250 Filterhalter	Millipore
Magnetrührer/Heizgerät	MR2002	Heidolph
Mehrfachfilterhalter	3-place Manifold, 47 mm, stainless steel	Millipore
Mehrkanalpumpe	PD 5101	Heidolph
Membranpumpe	Ideal, Leistung 150 L/h	Schego
Petrischalen-Drehtisch	Pertritum- E ^{plus}	Schütt
pH-Meter	InoLab pH Level 2	WTW
Photometer	UV-VIS Spectrophotometer Lambda 2	Perkin-Elmer
Reinstwassersystem	MilliQ-plus mit MilliPak 0,2 µm Filter	Millipore
Schüttelwasserbad	SWB 20	Medingen
Sputter Coater	SCD 005	BAL-TEC
Sterile Werkbank	Class II Type A/ B3	SerilGard
Thermostatschrank (20°C)	ET 636-6	Lovibond
Ultraschallbad	Bandolin	Sonorex
Vakuumpumpe	ME 2C , 1,7 m ³ /h	VacuuBrand
Vortex	Vortexer Genie-2	Scientific Industry
Waage	BP21005	Sartorius
Wasserbad	WNB 7-45	Memmert
Zentrifugen	Tischzentrifuge 5415C	Eppendorf
	Tischzentrifuge 5416C	Eppendorf
	Sorvall RC-SB Retrigrerated Superspeed Centrifuge	Du Pont Instruments

2.1.2 Spezielle Laborausrüstung

Die folgende Laborausrüstung wurde im Speziellen benötigt:

Tabelle 3: Spezielle Laborausrüstung

Gegenstand / Material	Firma (Bestell-Nr.) / Details
Glasperlen	Fa. Roth / 3 mm bis 4 mm Durchmesser
Rouxflaschen	Fa. Labomedic / Volumen 1000 ml mit geradem Hals
Glaszylinder	Fa. Labomedic (LABO994485) / Sonderanfertigung
Belüftungsring	Fa. Labomedic (LABO990302) / Sonderanfertigung
Anaerobierbehälter	Fa. BD / verschiedene Größen
Anaerobes Generierungskit	Fa. Oxoid / AnaeroGen (z.B. AN0035)
Mattglasierte OP-Fliesen	Fa. Villeroy & Boch (Nr.3709)/ OP-Fliesen 5x5 cm
Metallplättchen DGHM	Fa. GK Formblech (Stahl 1.4301)/ 2 cm Durchmesser
PVC-freier Bodenbelag	Fa. Armstrong/ DLW-Linolium Marmorette LPX

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Die üblichen mikrobiologischen Verbrauchsmaterialien wie Messkolben, Pipettenspitzen, Petrischalen wurden u.a. von folgenden Firmen bezogen:

Tabelle 4: Hersteller der Verbrauchsmaterialien

Hersteller	Standort
Brand	Gießen
Eppendorf	Wesseling- Berzdorf
Greiner	Frickenhausen
Millipore	Schwalbach
Nunc	Wiesbaden
Oxoid	Wesel
Schleicher & Schuell	Dassel

2.1.4 Mikroskope

2.1.4.1 Lupe

Makroskopische Untersuchungen der Kolonien erfolgten mit einer Lupe (10-fach Vergrößerung).

2.1.4.2 Licht/Fluoreszenzmikroskop

Das Licht/Fluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss Typ Axioplan wurde für Licht-, Phasenkontrast- und differentielle Interferenzkontrast (DIC)- Untersuchungen verwendet. Die digitale Kamera AxioCam MRc, mit einer Basisauflösung von 1,4 Megapixel, ermöglichte die Dokumentation der mikroskopischen Untersuchungen. Die Bildaufnahmen der Phasenkontrastaufnahmen erfolgten mit dem Objektiv Plan Neofluar 40:1/ 0,75. Lichtmikroskopische- und DIC-Aufnahmen erfolgten mit dem Objektiv Plan Neofluar 100:1/ 1,30 Öl und wurden mit Hilfe der Software AxioVision 3.1 dokumentiert und bearbeitet.

Im Hellfeld wurden gefärbte Präparate betrachtet. Ungefärbte, kontrastarme Präparate, wie beispielsweise Lebendpräparate und Endosporen wurden mittels Phasenkontrasteinstellung oder mittels DIC untersucht.

2.1.4.3 Rasterelektronenmikroskop

Das modifizierte Rasterelektronenmikroskop Leitz AMR 1600T (Firma Leitz) mit einer 20 bis 100.000 fachen Vergrößerung, wurde für detaillierte Aufnahmen der Mikroorganismen bzw. Sporen verwendet. Die Dokumentation und Bildbearbeitung erfolgte mit Hilfe der Software Digital Image Processing System. Die Gold-Beschichtung der Präparate erfolgte mittels Sputter Coater (ca. 10 nm Schichtdicke).

2.1.5 Chemikalien und Substrate

Tabelle 5: Verwendete Chemikalien und Substrate

Chemikalie	Summenformel	Hersteller
2-Propanol	C_3H_8O	Merck
β -Cyclodextrin	$C_{42}H_{70}O_{35}$	Fluka
Agar-Agar	–	Merck
Bakteriologische Pepton	–	Oxoid
Calciumnitrat	$Ca(NO_3)_2$	Merck
Calciumchlorid	$CaCl_2$	Merck
Caseinhydrolysat säurehydrol., vitaminfrei	–	Merck
Dextrose	$C_6H_{12}O_6$	Becton Dickinson
Dinatriumhydrogenphosphat	Na_2HPO_4	Merck
Dinatriumhydrogenphosphat Dodecahydrat	$Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$	Merck
Eisensulfat	$FeSO_4$	Merck
Eisensulfat Heptahydrat	$FeSO_4 \cdot 7 H_2O$	Merck
Essigsäure (99,9%)	$C_2H_4O_2$	AppliChem

Chemikalie	Summenformel	Hersteller
Ethanol (absolut)	C_2H_5OH	Merck
Fleischextrakt (Lab Lemco Powder)	–	Oxoid
Fuchsin (C.I. 42510)	–	Merck
Glutardialdehyd (25%)	$C_5H_8O_2$	Merck
Glycin	H_2NCH_2COOH	Merck
Hefeextrakt	–	Becton Dickinson
Kaliumchlorid	KCl	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	KH_2PO_4	Merck
Kristallviolett (C.I. 42555)	–	Merck
L-Cystein Hydrochlorid Monohydrat	$C_3H_7NO_2S \cdot HCl \cdot H_2O$	Sigma
Lezithin	–	ICN Biomedicals
L-Histidin	$C_6H_9N_3O_2$	Merck
Lösliche Stärke	$(C_6H_{10}O_5)_n$	Merck
Magnesiumchlorid	$MgCl_2$	Merck
Magnesiumsulfat Monohydrat	$MgSO_4 \cdot 1 H_2O$	Merck
Malachitgrün (C.I. 42000)	–	Merck
Manganchlorid Tetrahydrat	$MnCl_2 \cdot 4 H_2O$	Merck
Mangansulfat	$MnSO_4$	Merck
Mangansulfat Monohydrat	$MnSO_4 \cdot H_2O$	Merck
Natriumcacodylat	$C_2H_6AsO_2Na \cdot 3 H_2O$	Merck
Natriumchlorid	NaCl	Merck
Natriumdihydrogenphosphat (Monohydrat)	$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	Merck
Natriumdodecylsulfat	$C_{12}H_{25}NaO_4S$	Merck
Natriumhydrogencarbonat	$NaHCO_3$	Merck
Natriumhydroxid	NaOH	Merck
Natriumthiosulfat	$Na_2O_3S_2$	Merck
Taurocholat Natriumsalzhidrat	$C_{26}H_{44}NNaO_7S \cdot H_2O$	Sigma
Osmiumtetroxid (4%)	OsO_4	Merck
Pepton	–	Becton Dickinson
Phenol	C_6H_6O	Merck
Rinderserumalbumin (BSA)	–	Serva
Salzsäure	HCl	Merck
Safranin O (C.I. 50240)	–	Merck
Saponin	–	Roth

Chemikalie	Summenformel	Hersteller
Schaferythrozyten 50% in Alseverlösung	–	Elocin-Lab
Trypton	–	Becton Dickinson
Tween 80 (=Polysorbat 80)	$C_{64}H_{124}O_{26}$	Merck

2.1.6 Enzyme

Tabelle 6: Verwendete Enzyme

Name	Hersteller	Verwendung / Details
Katalase	Sigma	Zur Neutralisation von H_2O_2 -Produkten / Katalase aus der Rinderleber (13.000 units/mg)
Lysozym	Serva	Zur Unterstützung der Germination von <i>C. difficile</i> -Sporen, Zur Aufreinigung der Sporen (Enzymverdau)/ Lysozym aus Hühnerei (100.000 units/mg)
Trypsin	Sigma	Zur Aufreinigung der Sporen (Enzymverdau)

2.1.7 Wasser

Sofern nicht explizit darauf hingewiesen wird, wurde stets demineralisiertes Wasser (H_2O) aus der Reinstwasser-Anlage des Instituts für Hygiene und Öffentliche Gesundheit verwendet.

2.1.8 Lösungen und Puffer

Zur Herstellung der Puffer und Lösungen wurde demineralisiertes Wasser (H_2O) verwendet. Falls erforderlich wurde zur pH-Werteinstellung ($\pm 0,2$) NaOH (1N) bzw. HCl (1N) verwendet.

Eisensulfat-Lösung:

Eisensulfat Heptahydrat	31 mg
H_2O	ad 100 ml

Enzymlösung:

Lysozym	20 μ g
Trypsin	15 μ g
Phosphatpuffer (0,1M)	ad 25 ml

NaCl-Lösung 0,9%ig mit Trypton:

Natriumchlorid	8,5 g
Trypton	1,0 g
H ₂ O	ad 1,0 l
pH 7,0±0,2	

Natriumcacodylat-Puffer:

Natriumcacodylat	21,4 g
Natriumhydroxid	6,5 g
H ₂ O	ad 1,0 l
pH 7,4±0,2	

Osmiumtetroxid-Lösung (0,2%ig):

Osmiumtetroxid (4%ig)	50 ml
H ₂ O	ad 1 l

Phosphatpuffer (M/15)

Kaliumdihydrogenphosphat (9,07 g/l)	390 ml
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat (11,87 g/l)	610 ml
pH 7,0±0,2	

Phosphatpufferlösung (0,25 M):

Kaliumdihydrogenphosphat	34,0 g
H ₂ O	ad 1 l
pH 7,2±0,2	

Phosphatpufferlösung (0,1 M):

Dinatriumhydrogenphosphat	8,19 g
Natriumhydrogenphosphat (Monohydrat)	5,84 g
H ₂ O	ad 1 l
pH 7,0±0,2	

Phosphatgepufferte Salzlösung:

Phosphatpufferlösung (0,25 M)	1,25 ml
NaCl	8,75 g
H ₂ O	ad 1 l
pH 7,2 ± 0,2	

Die Enzymlösung wurde sterilfiltriert und die Phosphatpufferlösungen wurden bei 121 °C für 20 min autoklaviert. Die Phosphatpufferlösung (0,25 M) wurde mit einer Konzentration von 0,0025 mol/l angewandt.

WSH (Wasser standardisierter Härte):

Die Herstellung des WSH erfolgte nach den Standardmethoden der DGHM [Gebel, J. *et al.*, 2001]. Die Lösung wurde nicht länger als fünf Tage verwendet und bei 4-6°C aufbewahrt.

Lösung A:	MgCl ₂	19,84 g
	CaCl ₂	46,24 g
	H ₂ O	ad 1 l

Lösung A wurde für 20 min bei 121 °C autoklaviert und für maximal vier Wochen bei 4-6°C aufbewahrt.

Lösung B:	NaHCO ₃	32,02 g
	H ₂ O	ad 1 l

Lösung B wurde durch einen 0,2 µm Cellulosemischesterfilter filtriert und wöchentlich neu angesetzt.

WSH:

Lösung A	6 ml
Lösung B	8 ml
H ₂ O	ad 1 l
pH 7,0 ± 0,2	

2.1.9 Farbstofflösungen

Zur Herstellung der Farblösungen wurde ebenfalls demineralisiertes Wasser (H₂O) verwendet.

Karbofuchsin-Stammlösung:

Fuchsin (C.I. 42510)	120 g
96%ige Ethanol/ H ₂ O-Mischung	1000 ml

Karbofuchsin-Gebrauchslösung:

Karbofuchsin-Stammlösung	90 ml
Phenol	45 ml
H ₂ O	900 ml

Kristallviolett-Stammlösung:

Kristallviolett (C.I. 42555)	20 g
Phenol	20 g
96%iges Ethanol	1000 ml

Kristallviolett-Gebrauchslösung:

Ein Teil der Kristallviolett-Stammlösung wurde vor Gebrauch 1:8 mit H₂O verdünnt.

Malachitgrün-Lösung:

Malachitgrün (C.I. 42000)	5,0 g
H ₂ O	100 ml

Safraninlösung:

Safranin O (C.I. 50240)	0,5 g
H ₂ O	100 ml

2.1.10 Farbstoffe und Substanzen für die Mikroskopie**2.1.10.1 Lichtmikroskopie**

Tabelle 7: Farbstoffe und Substanzen für Differenzialfärbungen

Differenzialfärbungen	Farbstoffe/ Gebrauchslösungen
Gram-Färbung	Kristallviolettlösung Lugol'sche Lösung Karbofuchsinlösung 96%iges Ethanol Fuchsinlösung
Sporenfärbung	Malachitgrünlösung Safraninlösung

2.1.10.2 Rasterelektronenmikroskopie

Tabelle 8: Substanzen für die Rasterelektronenmikroskopie

Puffer und Lösungen
25%iges Glutardialdehyd
0,2%ige Osmiumtetroxid-Lösung
Natriumcacodylat- Puffer
aufsteigende Ethanolreihe in Reinstwasser (10 – 99,9%)

2.1.11 Nährmedien/ Nährbouillon

Zur Kultivierung der Mikroorganismen wurden verschiedene Nährmedien verwendet, die von ihren Inhaltsstoffen auf die jeweiligen Ansprüche der Mikroorganismen abgestimmt sind.

2.1.11.1 BHIS-Agar (-/+TA)

Der BHIS-Agar wurde für vergleichende Untersuchungen zur Kultivierung von *C. difficile*-Sporen verwendet. (*) Der Agar wurde mit und ohne Taurocholsäure Natriumsalzhydrat (Taurocholat) eingesetzt.

<u>Zusammensetzung pro Liter nach Herstellerangaben:</u>	pH 7,2 ± 0,2
Hirn-Herz-Bouillon (BHI)	37,00 g
Hefeextrakt	5,00 g
L-Cystein Hydrochlorid Monohydrat	1,00 g
Taurocholsäure Natriumsalzhydrat (*)	1,00 g
Agar	13,00 g

Vor Gebrauch wurde dem BHIS-Agar (45°C) 10 mg/l Lys ozym (50.000 units/mg) zugeben.

2.1.11.2 Blutagar (Firma Oxoid)

Der Blutagar wurde bei der Methode nach EN 14347 (siehe Kapitel 2.4.2) für die Kultivierung von *B. subtilis*-Sporen verwendet.

<u>Zusammensetzung pro Liter nach Herstellerangaben:</u>	pH 7,4 ± 0,2
Pankreatisch abgebautes Casein	15,00 g
Leberextrakt	2,50 g
Hefeextrakt	5,00 g
Natriumchlorid	5,00 g
Defibriniertes Schafsblut (7%)	70 ml
Agar	12,00 g

2.1.11.3 Columbia-Agar (Firma Becton und Dickinson)

Der Columbia-Agar wurde gebrauchsfertig von der Firma Becton und Dickinson bezogen und vorwiegend zur Reinheitskontrolle und für die Sporenanreicherung der *C. difficile*-Sporen verwendet.

Zusammensetzung pro Liter nach Herstellerangaben:	pH 7,3 ± 0,2
Pankreatisch abgebautes Casein	12,00 g
Peptisch abgebautes Tiergewebe	5,00g
Hefeextrakt	3,50 g
Rindfleischextrakt	3,00 g
Maisstärke	1,00 g
Natriumchlorid	5,00 g
Defibriertes Schafsblut (5%)	50 ml
Agar	13,50 g

2.1.11.4 Columbia-Bouillon (Firma Becton und Dickinson)

Die Columbia-Bouillon wurde gebrauchsfertig von der Firma Becton und Dickinson bezogen und zur Herstellung eines Sporulationsmediums verwendet (siehe 2.1.11.11).

<u>Zusammensetzung pro Liter nach Herstellerangaben:</u>	pH 7,5 ± 0,2
Pankreatisch abgebautes Casein	10,00 g
Hefeextrakt	5,00 g
Proteose Pepton Nr. 3	5,00 g
Tryptisch abgebautes Rinderherz	3,00 g
L-Cystein HCL	0,10 g
Dextrose	2,50 g
Natriumchlorid	5,00 g
Magnesiumsulfat (wasserfrei)	0,10 g
Eisensulfat	0,02 g
Natriumcarbonat	0,60 g
3-(Hydroxymethyl)Aminomethan	0,83 g
3-(Hydroxymethyl)Aminomethan HCL	2,86 g

2.1.11.5 Glucose-Hefeextrakt-Agar

Der Glucose-Hefeextrakt-Agar (GYA) wurde für die Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (KBE) im Rahmen der Anreicherung für *B. subtilis*-Sporen nach prEN 13704 (siehe Kapitel 2.4.3) verwendet.

<u>Zusammensetzung pro Liter:</u>	pH 6,8 ± 0,2
Caseinhydrolysat säurehydrolysiert, vitaminfrei	1,00 g
Lösliche Stärke	1,00 g
Glucose	2,50 g
Hefeextrakt	5,00 g
Eisensulfat	0,10 g
Mangansulfat Monohydrat	0,0001 g
Agar	15,00 g

2.1.11.6 GSBHI-Agar (-/+TA)

Der GSBHI-Agar wurde zur Kultivierung von *C. difficile*-Sporen verwendet und ist Bestandteil der Anreicherungsmethode nach SOP 156 Bonn (siehe Kapitel 2.4.5). (*) Der Agar wurde zu Beginn der Arbeit ohne Taurocholsäure Natriumsalzhydrat (Taurocholat) und später stets mit Taurocholat verwendet.

<u>Zusammensetzung pro Liter:</u>	pH 7,3 ± 0,2
Hirn-Herz Bouillon	37,00 g
Dextrose	8,00 g
Lösliche Stärke	10,00 g
L-Cystein Hydrochlorid Monohydrat	0,05 g
Taurocholsäure Natriumsalzhydrat(*)	1,00 g
Agar	13,00 g

Vor Gebrauch wurde dem GSBHI-Agar (45°C) 10 mg/l Ly sozym (50.000 units/mg) zugeben.

2.1.11.7 Hirn-Herz-Agar (Firma Becton Dickinson)

Der Hirn-Herz-Agar wurde zur Kultivierung von *C. difficile* gemäß der RKI-Vorschrift verwendet. Im Rahmen dieser Arbeit wird dieser Agar auch häufig als Brain Heart Agar (BHA) bezeichnet.

<u>Zusammensetzung pro Liter nach Herstellerangaben:</u>	pH 7,4 ± 0,2
Kalb Hirnextrakt	7,70 g
Rind Hirnextrakt	9,80 g
Protease Pepton	10,00 g
Dextrose	2,00 g
Natriumchlorid	5,00 g
Di-Natriumphosphat	2,50 g
Agar	15,00 g

2.1.11.8 Hirn-Herz-Bouillon (Firma Oxoid)

Die Hirn-Herz Bouillon wird häufig auch als Brain Heart Infusion (BHI) bezeichnet.

<u>Zusammensetzung pro Liter nach Herstellerangaben:</u>	pH 7,4 ± 0,2
Kalb Hirnextrakt	12,50 g
Rind Hirnextrakt	5,00 g
Protease Pepton	10,00 g
Glucose	2,00 g
Natriumchlorid	5,00 g
Di-Natriumphosphat	2,50 g

2.1.11.9 Nutrient-Bouillon (Fa. Oxoid)

<u>Zusammensetzung pro Liter nach Herstellerangaben:</u>	pH 7,5 ± 0,2
Fleischextrakt	10,00 g
Pepton	10,00 g
Natriumchlorid	5,00 g

2.1.11.10 Rinderhackfleisch-Bouillon

<u>Zusammensetzung pro Liter:</u>	pH 7,5 ± 0,2
Magere Rinderhackfleisch-Bouillon	ca. 800 ml
Hefeextrakt	10,00 g
Natriumchlorid	5,00 g
Dinatriumhydrogenphosphat Dodecahydrat	2,00 g
Bakteriologisches Pepton	5,00 g
Glucose	2,00 g
Trypton	10,00 g
Lösliche Stärke	1,00 g
Add H ₂ O	1000 ml

500 g fettarmes Rinderhackfleisch wurde in 1 l H₂O im Dampftopf abgekocht. Das Becherglas wurde mit kaltem Wasser abgekühlt und die Fettschicht abgeschöpft. Der pH-Wert des Mediums wurde bei einer Temperatur von ca. 20°C auf pH 8,0 ± 0,2 eingestellt. Der Vorgang des Abkochens und der pH-Werteinstellung wurde 2-mal wiederholt. Das Hackfleisch wurde in einem Mulltuch ausgedrückt und separat getrocknet. Die Chemikalien und Nährstoffe wurden in 100 ml H₂O gelöst und dem Gesamtvolumen der erhaltenen Hackfleischbouillon (ca. 800 ml) zugeführt. Final wurde das Medium mit H₂O auf ein Volumen von 1000 ml aufgefüllt. Große Reagenzgläser (10 ml) wurden ca. 2 cm hoch mit

Rinderhackfleisch und mit 6 ml Rinderhackfleisch-Bouillon befüllt. Zum Luftabschluß wurden die Reagenzgläser mit Paraffin überschichtet und autoklaviert. Die Lagerung erfolgte bei 2-8°C für maximal ein Jahr.

Anmerkung: Das Rinderhackfleisch sollte von einem Bio-Metzger stammen, um Antibiotikarückstände zu vermeiden.

2.1.11.11 Sporulationsmedium – Columbia-Mn²⁺-Bouillon

Die Columbia-Mn²⁺-Bouillon diente zur Anreicherung der *B. subtilis*-Sporen gemäß dem Normentwurf der OECD (siehe Kapitel 2.4.4).

- (1) 22,3 mg MnSO₄ wurden in 10 ml H₂O gelöst und durch eine Einmalfilter-Einheit (Porengröße 0,2 µm) sterilfiltriert.
- (2) Columbia-Bouillon wurde 1/10 verdünnt mit H₂O angesetzt und autoklaviert.
- (3) 198 ml der 1/10 Columbia-Bouillon wurden mit 2 ml MnSO₄ versetzt.

Die Finale Mangan-Konzentration in der 1/10 verdünnten Columbia-Bouillon betrug 100 µM.

2.1.11.12 Sporulationsmedium – Fleischextrakt-Agar (MYA)

Der Fleischextrakt Agar (MYA) wurde zur Anreicherung der *B. subtilis*-Sporen nach EN 13704 (siehe Kapitel 2.4.3) verwendet.

<u>Zusammensetzung pro Liter:</u>	pH 7,2 ± 0,2
Fleischextrakt	10,00 g
Hefeextrakt	2,00 g
Mangansulfat Monohydrat	0,04 g
Agar	15,00 g

2.1.11.13 Sporulationsmedium – Lösung 1

Die Lösung 1 wurde für die Anreicherung der *B. subtilis*-Sporen - SOP 112 Bonn (siehe Kapitel 2.4.1) verwendet.

<u>Zusammensetzung pro Liter:</u>	pH 7,0 ± 0,2
Magnesiumsulfat Monohydrat	0,28 g
Kaliumchlorid	1,11 g
Nutrient Bouillon	8,90 g
Eisensulfat-Lösung (siehe Kapitel 2.1.8)	1,00 ml

2.1.11.14 Sporulationsmedium – Lösung 2

Die Lösung 2 wurde ebenfalls für die Anreicherung der *B. subtilis*-Sporen – SOP 112 Bonn (siehe Kapitel 2.4.1) verwendet.

<u>Zusammensetzung pro 200 ml:</u>	pH 7,0 ± 0,2
Calciumnitrat	0,47 g
Manganchlorid Tetrahydrat	0,39 g

2.1.11.15 Sporulationsmedium – Mangan-Sulfat-Agar

Der Mangan-Sulfat-Agar fand bei der Anreicherungsverfahren nach EN 14347 (siehe Kapitel 2.4.2) Anwendung.

<u>Zusammensetzung pro Liter:</u>	pH 7,0 ± 0,2
Peptone	10,00 g
Hefeextrakt	2,00 g
Mangansulfat	0,04 g
Agar	15,00 g

2.1.11.16 Trypton-Glucose-Bouillon

Die Trypton-Glucose-Bouillon (TGB) wurde im Rahmen der Anreicherung gemäß EN 13704 (siehe Kapitel 2.4.3) verwendet.

<u>Zusammensetzung pro Liter:</u>	pH 7,2 ± 0,2
Hefeextrakt	2,50 g
Trypton	5,00 g
Glucose	1,00 g

2.1.11.17 Trypton-Soya-Agar (Fa. Merck)

Trypton-Soya-Agar (TSA) ist ein Universalnährboden mit breitem Anwendungsgebiet. Auf diesem Nährmedium wurde *B. subtilis* kultiviert.

<u>Zusammensetzung pro Liter nach Herstellerangaben:</u>	pH 7,3 ± 0,2
Caseinpepton	15,00 g
Sojamehlpepton	5,00 g
Natriumchlorid	5,00 g
Agar	15,00 g

2.1.11.18 Trypton-Soya-Bouillon (Fa. Merck)

<u>Zusammensetzung pro Liter nach Herstellerangaben:</u>	pH 7,3 ± 0,2
Caseinpepton	17,00 g
Sojamehlpepton	3,00 g
Natriumchlorid	5,00 g
Dikaliumphosphat	2,50 g

Alle nicht kommerziell erworbenen Nährmedien wurden nach Herstellerangaben auf einen Liter mit demineralisiertem Wasser (H₂O) aufgefüllt und bei 121 °C für 20 min autoklaviert. Zur Herstellung der Nährböden wurden Petrischalen mit etwa 25 ml Nährmedium befüllt und nach Aushärten bei 4-6°C für maximal vier Wochen gelagert.

2.1.12 Desinfektionsmittel**Tabelle 9: Geprüfte Flächendesinfektionsmittel**

Produkt	Wirkstoffbasis	Wirkstoffe in 100 g
F1	Chlorabspaltende Verbindung	41,4 g Natriumdichloroisocyanurat
F2	Peroxidverbindung	Wirkstoffgehalt einer 2%igen Anwendungslösung: > 1.000 mg/kg (mg/l) Peressigsäure
F3	Aldehyde	14,0 g Glyoxal, 9,0 g Formaldehyd, 2,0 g Glutaraldehyd, 0,5 g 2-Ethylhexanal
F4	Chloramid	100,0 g Chloramin T
F5	Chloramid	100,0 g Tosylchloramidnatrium
F6	Peroxidverbindung, organische Säure	30,0% Pentakalium-bis(peroxymonosulfat)-bis(sulfat), 5,0% Zitronensäure
F7	Peroxidverbindung	80,0 g Magnesium monoperoxyphthalat-Hexahydrat
F8	Chlorabspaltende Verbindung	200 mg/l Natriumhypochlorit
F9	Quaternäre Verbindung, Alkylaminderivat	6,0 g Didecyldimethylammoniumchlorid, 5,5 g N-(3 Aminopropyl)-N-dodecylpropan-1,3-diamin

F10	Peroxidverbindung	Wirkstoffgehalt einer 2%igen Anwendungslösung: > 1.000 mg/kg (mg/l) Peressigsäure
F11	Quaternäre Verbindung, Alkylaminderivat	15,0 g Benzalkoniumchlorid, 12,4 g Glucoprotamin
F12	Aldehyd, quaternäre Verbindung	9,8 g Glutaral, 5,0 g Benzalkoniumchlorid, 5,0 g Didecyldimethylammoniumchlorid
F13	Chlorabspaltende Verbindung	99,0 g Natriumdichloroisocyanurat
F14	Aldehyde, quaternäre Verbindung	7,5 g Didecyldimethylammoniumchlorid, 4,5 g Glutaral, 3,2 g Glyoxal
F15	Chlorabspaltende Verbindung	100,0 g Natriumhypochlorit
F16	Peroxidverbindung	45,0 g Pentakaliumbis(peroxymonosulfat)- bis(sulfat)
F17	Aldehyde, quaternäre Verbindung	9,6 g Glyoxal, 8,0 g Didecyldimethyl- ammoniumchlorid, 3,5 g Formaldehyd, 2,5 g Glutardialdehyd
F18	Aldehyde	7,6% Formaldehyd, 4,5% Glutardialdehyd
F19	Peroxidverbindung	5,0 g Peressigsäure
F20	Peroxidverbindung	80 g Magnesium monoperoxyphthalat- Hexahydrat
F21	Peroxidverbindung	20,0 g Kaliummonopersulfat
F22	Quaternäre Verbindungen	0,26 g Benzyl-C12-C16-alkyldimethyl- ammoniumchlorid, 0,26 g Didecyl-dimethylammoniumchloride, 0,26 g C12-14-Alkyl[(ethylphenyl)methyl]- dimethylchlorid
F23	Quaternäre Verbindungen	0,26 g Benzyl-C12-C16-alkyldimethyl- ammoniumchlorid, 0,36 g Didecyl-dimethylammoniumchloride, 0,26 g C12-14 Alkyl[(ethylphenyl)methyl]- dimethylchlorid

F24	Alkohole, quaternäre Verbindung	25,0 g Ethanol (94 %ig), 35,0 g 1-Propanol, 0,35 g Didecyldimethylammoniumchlorid
F25	Chloramid	80,0 g Tosylchloramidnatrium
F26	Quaternäre Verbindungen, Aldehyde	15,5 g Benzalkoniumchlorid, 6,0 g Glyoxal, 4,5 g Formaldehyd, 1,75 g Glutaraldehyd
F27	Chloramid	100,0 g Tosylchloramidnatrium x 3 H ₂ O
GA	Glutaraldehyd Standard	50,0% Glutaraldehyd
PAA	Peressigsäure Standard	5,0% Peressigsäure, 25% Wasserstoffperoxid

2.1.13 Neutralisatoren

Neutralisator	Zusammensetzung
Glycin	10 g/l Tween, 20 g/l Glycin
Na-Thio	10 g/l Tween, 3 g/l Natriumthiosulfat
Na-Thio+ 0,01% Katalase	10 g/l Tween, 3 g/l Natriumthiosulfat, 100 µl/l Katalase
β-Cyclodextrin	10 g/l Tween, 10 mM β-Cyclodextrin
TLC-Thio	10 g/l Tween, 3 g/l Lezithin, 1 g/l L-Cystein, 3 g/l Natriumthiosulfat
TLH-Glycin	10 g/l Tween, 3 g/l Lezithin, 3 g/l L-Histidin, 20 g/l Glycin
TL-SDS	10 g/l Tween, 3 g/l Lezithin, 4 g/l Natriumdodecylsulfat
TSH-Thio	10 g/l Tween, 30 g/l Saponin, 3 g/l L-Histidin, 3 g/l Natriumthiosulfat

Alle Neutralisatoren wurden in 0,0025 mol/l Phosphatpuffer angesetzt und für 15 min bei 121°C dampfsterilisiert. Der pH-Wert wurde auf $7,2 \pm 0,2$ eingestellt und die Lagerung der Neutralisatoren erfolgte für maximal sechs Wochen bei 2-8°C. Im Anhang A sind die Neutralisatoren den jeweiligen Desinfektionsmittel zugeordnet.

2.1.14 Herstellung der Produktprüflösungen

Die Produktprüflösungen und Standardprüflösungen wurden als Verdünnung der jeweiligen Desinfektionsmittel unmittelbar vor der Prüfung mit WSH (siehe Kapitel 2.1.8) angesetzt und mussten innerhalb von 2 Stunden verwendet werden. Die Herstellung der Produktprüflösung erfolgte ansonsten gemäß der Standardmethoden der DGHM [Gebel, J. *et al.*, 2001].

In quantitativen Suspensionsversuchen (Phase 2, Stufe 1) musste die Produktprüflösung das 1,25-fache der gewünschten Prüfkonzentration betragen, da diese während der Prüfung und Verfahrensvalidierung 80% verdünnt wurde.

In den praxisnahen Versuchen (Phase 2, Stufe 2) entsprach die Produktprüflösung der gewünschten Prüfkonzentration, da während der Prüfmethodik keine Verdünnung der Produktprüflösung erfolgte.

2.1.15 Herstellung der Belastungssubstanzen

2.1.15.1 Geringe organische Belastung (clean conditions)

Rinderserumalbumin (BSA)	0,3 g
NaCl-Lösung 0,9%ig	100 ml

Die 0,3%ige Albuminlösung wurde sterilfiltriert (Porengröße 0,2 µm) bei 2-8°C gelagert und innerhalb eines Monats verbraucht.

Die finale Konzentration im quantitativen Suspensionsversuch (siehe Kapitel 2.5) bzw. praxisnahen Versuch (siehe Kapitel 2.7) entsprach 0,03% Albumin.

2.1.15.2 Hohe organische Belastung (dirty conditions)

Zur Herstellung der hohen organischen Belastung wurde eine Belastungslösung, bestehend aus einer 3,0%ige Albuminlösung und einer 3,0%igen Schaferythrozyten Alsever-Lösung, in 0,9%iger NaCl-Lösung präpariert. Die finale Konzentration im quantitativen Suspensionsversuch (siehe Kapitel 2.5) bzw. praxisnahen Versuch (siehe Kapitel 2.7) entsprach 0,3% Albumin + 0,3% Schaferythrozyten.

2.1.16 Bakterienstämme

Tabelle 10: Verwendete Bakterienstämme

Spezies	Stamm- Nr.	Referenz
<i>B. subtilis</i>	DSM 347 / ATCC 6633	Nakamura et al. [1999]
<i>B. subtilis</i>	DSM n.v. / ATCC 19659	Danielson J. W [1993]
<i>C. difficile</i>	DSM 1296 / ATCC 9689	Hall and O'Toole [1935]
<i>C. difficile</i>	PCR Ribotyp 027 (mittlerweile NCTC 13366)	Patientenstamm 027 I (R20291) Stabler, R. A. et al. [2009], Quelle: Dr. Weil, Labor Centrum Nordhorn
<i>C. difficile</i>	PCR Ribotyp 027 RKI	Patientenstamm vom RKI (E: 09.12.2008) Quelle: Dr. Schwebke, Robert Koch-Institut
<i>C. difficile</i>	PCR Ribotyp 046	Patientenstamm 0607-2174 Quelle: Dr. Weil, Labor Centrum Nordhorn
<i>C. difficile</i>	PCR Ribotyp 001	Patientenstamm 0609-2116 Quelle: Dr. Weil, Labor Centrum Nordhorn

n.v. nicht verfügbar

2.2 Mikroskopische Methoden

2.2.1 Lebendpräparate

Die reifen Endosporen der einzelnen Sporensuspensionen wurden in erster Linie unter dem Phasenkontrastmikroskop als ungefärbte Lebendpräparate betrachtet. Sie setzten sich als hell leuchtende, lichtbrechende Zellen von den dunklen vegetativen Zellen ab. Neben dem Phasenkontrastverfahren wurde auch das differentielle Interferenzkontrastverfahren angewendet, um die Präparate plastischer darstellen zu können. Des Weiteren wurden zum Ausschluß möglicher Kontaminationen von Reinkulturen Nativpräparate angelegt und mit dem Immersionsobjektiv 100:1 unter dem Licht- oder auch Phasenkontrastmikroskop betrachtet.

2.2.2 Gram-Färbung

Zur besseren Abklärung möglicher Kontaminationen wurden zusätzliche Gram-Präparate angelegt. Bei der Gram-Färbung wurden die fixierten Bakterien mit dem kationischen Farbstoff Kristallviolett angefärbt, der starke Bindungen mit negativ geladenen Zellbestandteilen wie Nukleinsäuren und sauren Polysacchariden eingeht. Durch Beizung mit

einer Lugol'schen-Lösung entsteht in den Zellen ein wasserunlöslicher blau-violetter Komplex, der sich durch anschließende Behandlung mit Ethanol lösen lässt. Da die dicke, mehrschichtige Peptidoglykan der Gram-positiven Bakterien diesen Komplex im Gegensatz zu den Gram-negativen Bakterien mit einer sehr dünnen Peptidoglykanschicht zurückhält, kommt es hier zur Differenzierung. Nur die Gram-negativen Bakterien entfärben sich und können mit Hilfe eines weiteren kationischen Farbstoffs wie Fuchsin gegengefärbt werden. Gram-positive Bakterien erscheinen nach der Färbetechnik blau-violett und die Gram-negativen Bakterien rot.

2.2.3 Sporenfärbung

Die Endosporenfärbung erfolgte nach R. Wirtz [1908]. Durch das Erhitzen während der Färbung wurden die Sporen anfärbbar und ließen sich danach im Gegensatz zu vegetativen Zellen nur schwer wieder entfärben. Die hitzefixierten Bakterien wurden mit Malachitgrünlösung überschichtet und 5 min lang über einer schwachen Bunsenbrennerflamme vorsichtig bis zur Dampfentwicklung erhitzt. Dies gewährleistete, dass der Farbstoff in die widerstandsfähige und kreatinhaltige Sporenhülle eindrang. Der Farbstoff wurde anschließend abgegossen und das Präparat mit H₂O gespült. Die Gegenfärbung der entfärbten, vegetativen Bakterien erfolgte mit Safraninlösung für 30 s. Die Safraninlösung wurde abgegossen und das Präparat mit H₂O gespült. Die Endosporen erscheinen unter dem Lichtmikroskop smaragdgrün bzw. blau und die vegetativen Zellen rotbraun.

2.2.4 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Für die Rasterelektronenmikroskopie wurden die Proben einer Sporensuspension wie folgt vorbereitet:

3-4 Tropfen einer Sporensuspension mit unterschiedlichen Konzentrationen (10⁶-10⁸ KBE/ml) wurden auf einen Polycarbonatfilter pipetiert und bei Raumtemperatur angetrocknet. Die Fixierung der Probe erfolgte mit 25%igem Glutaraldehyd für 2 h und im Folgenden mit 0,2% Osmiumtetroxid-Lösung für mindestens 4 h (ggf. über Nacht). Das Filterpapier mit den fixierten Sporen wurde 30 min in Natriumcacodylat-Puffer eingelegt und in einer dekadisch aufsteigenden Ethanolreihe (10% bis zum absoluten Ethanol) abschließend entwässert. Die Probe wurde luftgetrocknet und mit Gold bestäubt.

Nach der Kathodenbestäubung der Proben mit Gold, konnten diese mit dem REM untersucht werden (siehe Kapitel 2.1.4.3).

2.3 Allgemeine mikrobiologische Methoden

2.3.1 Stammhaltung, Aufbewahrung von Testorganismen

Die Stammhaltung und Aufbewahrung der Testorganismen für die Prüfung der sporiziden Wirkung erfolgte gemäß bzw. für *C. difficile* in Anlehnung an die EN 12353 [CEN, 2007b]. Die Lagerung der Stammkulturen erfolgte bei -78°C.

2.3.2 Kultivierung

2.3.2.1 *B. subtilis*-Sporen

Die Kultivierung von *B. subtilis* erfolgte auf Columbia-Agar zur Überprüfung der Reinheit und auf TSA (siehe 2.1.11.17) zur Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (KBE). Die Inkubation erfolgte aerob für 24 h bei 37 °C.

2.3.2.2 *C. difficile*-Sporen

Die Kultivierung der Reinkultur von *C. difficile* erfolgte auf Columbia-Agar, um Kontaminationen besser sichtbar zu machen. Die Bestimmung der germinationsfähigen Sporen (KBE/ml) erfolgte im Plattengussverfahren in GSBHI-Agar (siehe 2.1.11.6). Vergleichend erfolgten die Kultivierung in Hirn-Herz Agar (siehe 2.1.11.7) und in BHIS-Agar. Die Inkubation erfolgte anaerob für 72 h bei 37°C.

2.3.3 Bestimmung der koloniebildende Einheiten (KBE)

Mit Hilfe der nachstehenden Verfahren wurden die Lebendzellzahlen bzw. germinationsfähigen Sporen bestimmt. Bei den Verfahren wurde davon ausgegangen, dass aus jeder vermehrungsfähigen Zelle eine makroskopisch sichtbare Kolonie entsteht.

Zur Bestimmung der koloniebildenden Einheiten in einer Bakterien- oder Sporensuspension wurde eine dekadische Verdünnungsreihe erstellt. Dazu wurden 0,5 ml der Bakteriensuspension in 4,5 ml H₂O gegeben und vor jedem weiteren Verdünnungsschritt gut durchmischt. Von jeder Verdünnungsstufe wurden 100 - 1.000 µl auf eine geeignete Agarplatte ausplattiert bzw. eingegossen und dem jeweiligen Mikroorganismus entsprechend inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte die Auszählung der gebildeten Kolonien. Die ermittelte KBE wurde in KBE/ml angegeben.

2.3.4 Bestimmung der Gesamtzellzahl (GZZ)

Die Bestimmung der Gesamtzellzahl erfolgte durch mikroskopische Zellzählung in einer Thoma-Zählkammer mit einer Kammertiefe von 0,02 mm. Die zu zählende Zell- bzw.

Sporensuspension wurde auf etwa 2×10^7 bis 3×10^8 Zellen/ml eingestellt und im Volumenverhältnis 1:1 mit 0,1 molarer Salzsäure vermischt. Die Salzsäure führte zu einer positiven Nettoladung der Zelloberfläche und förderte damit die Anlagerung an der Glasoberfläche. Gleichzeitig wirkte dies auch einer Verklumpung entgegen. Die Auszählung der Zellen erfolgte bei Phasenkontrast mit dem 40:1 Objektiv. Ausgezählt wurden mindestens vier Großquadrate. Die Berechnung der Zellzahl/ml erfolgte nach folgender Formel:

$$\frac{\text{Anzahl Zellen}}{\text{ausgezählte Fläche (mm}^2\text{) x Kammertiefe (mm) x Verdünnung}} = \text{Zellen/}\mu\text{l}$$

$$\text{Zellen/}\mu\text{l} \times 1000 = \text{Zellen/ml}$$

2.3.5 Bestimmung des Sporenanteils (Reinheit)

Die Bestimmung des Sporenanteils in Sporensuspensionen erfolgte durch Auszählung von vier mikroskopischen, dokumentierten Gesichtsfeldern. Zur Auszählung dienten Phasenkontrastaufnahmen und/oder Aufnahmen von Sporenfärbungen. Das Verhältnis der ausgezählten vegetativen Zellen und bakteriellen Sporen einer Sporensuspension gab Aufschluss über den prozentualen Anteil der Sporen im mikroskopischen Bild (Reinheit). Mögliche Zellfragmentreste (Zelldebris) in den Sporensuspensionen wurden mit dieser Bestimmung nicht bewertet.

2.4 Methoden zur Anreicherung von Sporen

2.4.1 Anreicherung von *B. subtilis*-Sporen – SOP 112 Bonn

2.4.1.1 Herstellung der Arbeitskultur [IHPH, 2004]

Zur Herstellung der Arbeitskultur wurde eine einzelne Perle einer tiefgefrorenen Probe (siehe Kapitel 2.3.1) von *B. subtilis* auf Columbia-Agar ausgestrichen und für 18 h–24 h bei 37°C inkubiert. Diese erste Subkultur diente zur Überprüfung der Reinheit des Teststamms und zur Anlage einer zweiten Subkultur. Die zweite und dritte Subkultur wurden durch das jeweilige Überimpfen einer Kolonie in gleicher Weise angelegt. Die zweite und dritte Subkultur dienten als Arbeitskultur.

Eine vierte Subkultur durfte nicht angelegt und als Arbeitskultur verwendet werden.

2.4.1.2 Anreicherungsprozess [IHPH, 2004]

Zur Anreicherung diente ein steriler Glaszylinder mit Belüftungsring (siehe Tabelle 3) und einem Magnetrührer. Unter der Laminar Air Flow wurde an den Belüftungsring ein steriler Silikonschlauch mit einem Innendurchmesser von 6 mm befestigt. Dieser wurde am anderen Ende mit einer Einwegfilter-Einheit (Porengröße 0,2 µm) versehen und mit einer Schlauchklemme abgedichtet. Das Sporulationsmedium bestehend aus 900 ml Lösung 1 (siehe 2.1.11.13) und 100 ml Lösung 2 (siehe 2.1.11.14) wurde unter sterilen Bedingungen in den vorbereiteten Glaszylinder gefüllt und mit 5-6 Kolonien der Arbeitskulturer beimpft. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank auf einem Magnetrührer bei 37°C und einer Rührfrequenz von 120 rpm. Alternativ konnte die Inkubation in einem Wasserbad bei einer Schüttelfrequenz von 120 rpm erfolgen (siehe Abbildung 16). Die Inkubation erfolgte zunächst für ca. 5 h bis 7 h, bis zur sichtbaren Trübung des Mediums. Nach Einsatz der Trübung wurde die Belüftung des Mediums gestartet. Hierzu wurde das andere Ende des Silikonschlauchs mit der Membranpumpe verbunden. Nach Aktivierung der Membranpumpe konnte die Silikonschlauchklemme entfernt werden [ACHTUNG: Die Silikonklemme durfte keinesfalls vor Inbetriebnahme der Pumpe entfernt werden]. Die Inkubation des Sporulationsmediums unter Belüftung erfolgte für 67 h–72 h bei 37°C.

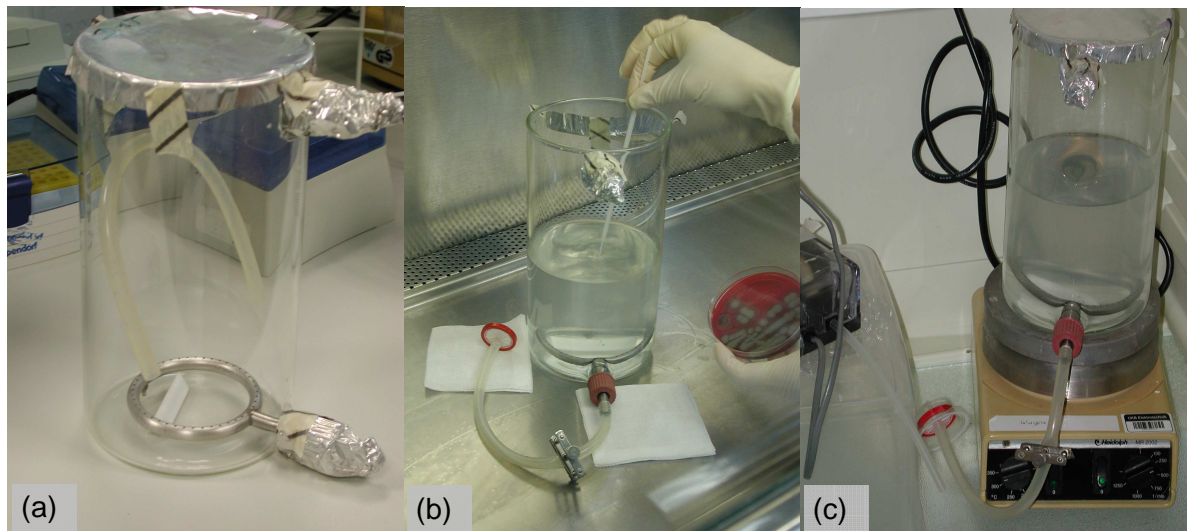


Abbildung 16: Ablauf der Sporenanreicherung *B. subtilis* – SOP 112 Bonn

Ablauf der Sporenanreicherung von *B. subtilis*: (a) Glaszylinder mit speziellem Belüftungsring und Magnetstab, (b) Beimpfung des Sporulationsmediums mit 5-6 Kolonien von *B. subtilis*, (c) Inkubation im Brutschrank mit Magnetrührer und der Vorrichtung für das spätere Zuschalten der Belüftung.

2.4.1.3 Sporenernte [IHPH, 2004]

Zur Sporenernte wurde das Sporulationsmedium für 2 min im Ultraschallbad bei 10°C behandelt und in Portionen von 100 ml bei 5000 g (5-10°C) für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 25 ml sterilem H₂O resuspendiert. Dieser Zentrifugations- und Waschschrift wurde dreimal wiederholt.

Die Sporensuspension wurde durch Aufnahme des Pellets in ca. 70 ml H₂O auf eine Konzentration von $> 10^9$ KBE/ml eingestellt. Zur KBE-Bestimmung wurden ausreichende Verdünnungen in H₂O angelegt und auf Typton-Soja-Agar (TSA) mittels Oberflächen- oder Gussplattenverfahren bestimmt. Die Inkubation erfolgte für 24 h bei 37°C.

2.4.1.4 Reinheitskontrolle, Lagerung [IHPH, 2004]

Zur Reinheitskontrolle wurden von der Sporensuspension Phasenkontrastaufnahmen, und/oder Sporenfärbungen angefertigt. Die Menge der verbliebenen vegetativen Zellen durfte 20% pro Gesichtsfeld nicht überschreiten, anderenfalls wurde die Suspension verworfen. Zur Inaktivierung verbliebener vegetativer Zellen wurde die Sporensuspension in einem Wasserbad auf 80°C erhitzt und für 10 min inkubiert. Die Lagerung der bakteriellen Sporen erfolgte bei 2-8°C in einem sterilen Glasgefäß mit Glasperlen.

2.4.2 Anreicherung von *B. subtilis*-Sporen – EN 14347

2.4.2.1 Herstellung der Arbeitskulturer [CEN, 2005]

Eine tiefgefrorene Probe (siehe Kapitel 2.3.1) von *B. subtilis* wurde bei Raumtemperatur aufgetaut und diente zur Beimpfung der ersten Subkultur auf Blutagar. Die Inkubation erfolgte für 24 h bei 37°C. Die erste Subkultur wurde auf Reinheit kontrolliert und diente zur Herstellung der Sporensuspension.

2.4.2.2 Anreicherungsprozess [CEN, 2005]

In einem 100 ml Kulturkolben wurde 50 ml Trypton-Soja-Bouillon (TSB) mit einer einzelnen Kolonie der Arbeitskulturer beimpft und auf einem Orbital-Schüttelgerät für 24 h bei 37°C inkubiert. Je 10 ml dieser Vorkulturer wurden in 1000 ml Rouxflaschen überführt, die 150 ml Sporulationsagar (siehe 2.1.11.15) enthielten. Die Flüssigkulturer wurde auf der Agaroberfläche mit sterilen Glasperlen verteilt und in der Rouxflasche belassen. Die Inkubation erfolgte zwei Tage bei 37°C und anschließend 21 Tage bei 30°C. Während der Bebrütung wurden die Rouxflaschen mit sterilen Stopfen verschlossen.

2.4.2.3 Sporenernte [CEN, 2005]

Zum Abernten der Sporen wurde je 10 ml steriles H₂O in die Rouxflaschen pipettiert, mit Hilfe der Glasperlen von der Agaroberfläche abgelöst und wieder in Suspension gebracht. Die Suspension wurde von den Glasperlen abgesaugt und in einen 100 ml Kulturkolben überführt. Dieser Prozess wurde wiederholt um zu gewährleisten, dass alle Sporen von der Agaroberfläche abgelöst wurden. Die gesamte Suspension wurde durch Filtration durch zwei Schichten sterile Gaze in einem sterilen Trichter grob gereinigt. Das Filtrat wurde bei 3.000 g für 30 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 65%igem 2-Propanol

resuspendiert (maximales Füllvolumen 50% des Gefäßes). Zur Inaktivierung der verbliebenen vegetativen Zellen wurden diese bei 20°C für 3 h in 2-Propanol inkubiert. Das 2-Propanol wurde durch Zugabe der gleichen Menge Wasser verdünnt und bei 10-15°C für 30 min bei 3.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in H₂O resuspendiert. Die Zentrifugations- und Waschschriffe wurden 5-mal wiederholt. Die Sporensuspension wurde mit H₂O auf > 10⁹ KBE/ml eingestellt. Die KBE-Bestimmung erfolgte auf Blutagar. Die Inkubation erfolgte für 24 h bei 37°C.

2.4.2.4 Reinheitskontrolle, Lagerung [CEN, 2005]

Zur Reinheitskontrolle wurden Sporenfärbungen durchgeführt und mikroskopisch untersucht. Die Menge der verbliebenen vegetativen Zellen sollte nicht 20% des Gesichtsfelds überschreiten, sonst musste die Suspension erneut filtriert und gewaschen oder verworfen werden. Die Sporensuspension wurde bei 2-8°C gelagert und sollte erstmals nach einer Lagerungszeit von vier Wochen für sporizide Desinfektionsmitteltestungen verwendet werden.

2.4.3 Anreicherung von *B. subtilis*-Sporen – EN 13704

2.4.3.1 Herstellung der Arbeitskulturr [CEN, 2002]

In der EN-Vorschrift [CEN, 2002] wird die Anreicherung ausgehend von Sporen beschrieben, so dass die Herstellung einer Arbeitskulturr nicht gefordert wird. Ein Prozedere zur Anreicherung von Sporen ausgehend von vegetativen Formen wird nicht aufgeführt. Für die erste Sporenanreicherung wurde eine tiefgefrorene Stammkulturr (siehe Kapitel 2.3.1) von *B. subtilis* bei Raumtemperatur aufgetaut und zur Beimpfung der ersten Subkulturr auf Blutagar herangezogen. Die Inkubation erfolgte für 24 h bei 37°C. Im Folgenden wurde mittels McFarland-Standard eine Suspension mit 10⁶ KBE/ml eingestellt, die als Arbeitskulturr diente.

2.4.3.2 Anreicherungsprozess [CEN, 2002]

Je 10 ml der vorgefertigte Trypton-Glucose-Bouillon (TGB) wurde mit 1 ml der Arbeitskulturr beimpft und für etwa 24 h bei 30°C inkubiert. Ziel sollte es sein, eine Kulturr im exponentiellen Wachstum mit ca. 10⁷ KBE/ml zu erhalten. Die Rouxflaschen mit Fleischextrakt Agar (siehe 2.1.11.12) wurden mit 2 - 3 ml der inkubierten Arbeitskulturr beimpft und durch Schwenken über der gesamten Agaroberfläche verteilt. Überschüssiges Inokulum wurde entfernt. Die Inkubation der Rouxflaschen erfolgte bei 30°C für elf bis dreizehn Tage. Nach dem dritten Inkubationstag wurde der Status der Kulturr unter einem Phasenkontrastmikroskop überprüft. Sollte die Sporulation nicht gestartet haben, wurde die Anreicherung erneut begonnen, anderenfalls erfolgte die Inkubation für weitere acht bis zehn Tage.

2.4.3.3 Sporenernte [CEN, 2002]

Zum Abernten der Sporen wurde in die Rouxflaschen je 50 ml steriles H₂O und Glasperlen gegeben. Die Sporen wurden mit Hilfe der Glasperlen in Suspension gebracht und aufgefangen. Insgesamt erfolgten vier sukzessive Zentrifugations- und Waschschrirte bei 3.000 g für 10 min. Das Pellet wurde in ca. 50 ml resuspendiert, in ein Schraubgefäß überführt und für 10 min zur Inaktivierung verbliebener vegetativer Zellen auf 75°C erhitzt.

2.4.3.4 Reinheitskontrolle, Lagerung

Die KBE-Bestimmung der Sporen erfolgte auf GYA mit geeigneten Verdünnungen. Inkubiert wurde für 72 h bei 30°C. Die Lichtbrechung der Sporen wurde mit einem Phasenkontrastmikroskop überprüft. Der Anteil der lichtbrechenden Sporen sollte bei etwa 95% liegen. Die Sporensuspension wurde bei 2-8°C gelagert und sollte erstmals nach einer Lagerungszeit von zwei Wochen für sporizide Desinfektionsmitteltestungen verwendet werden.

2.4.4 Anreicherung von *B. subtilis* Sporen – OECD

2.4.4.1 Herstellung der Arbeitskultnr [OECD, 2008]

Die Herstellung einer Arbeitskultnr wurde bei diesem Anreicherungsverfahren nicht gefordert [OECD, 2008]. Der Anreicherungsprozess sollte mit einer bereits vorhandenen Sporensuspension gestartet werden. Für die erste Anreicherung wurde, nach Rücksprache mit der Arbeitsgruppe von S. A. Sattar in Ottawa (Kanada), eine tiefgefrorene Stammkultnr (siehe Kapitel 2.3.1) von *B. subtilis*, ohne vorherige Anlage einer Subkultnr, verwendet.

2.4.4.2 Anreicherungsprozess [OECD, 2008]

Zur Sporenanreicherung wurde 100 ml Sporulationsmedium – Columbia Mn²⁺ Bouillon (siehe 2.1.11.11) mit 100 µl einer vorhandenen Sporensuspension bzw. einer tiefgefrorenen Stammkultnr beimpft. Die Inkubation erfolgte auf einem Orbitalschüttler mit einer Schüttelfrequenz von 150 rpm bei 37°C für 72 h.

2.4.4.3 Sporenernte [OECD, 2008]

Die Sporensuspension wurde bei 4°C und 10.000 g für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in H₂O aufgenommen. Die beschriebenen Zentrifugations- und Waschschrirte wurden 3-mal wiederholt. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in 1/10 Volumen des Sporulationsmedium resuspendiert. Zur Inaktivierung verbliebener vegetativer Zellen wurde die Sporensuspension in einem Wasserbad für 10 min auf 70°C erhitzt. Die KBE-Bestimmung erfolgte auf T SA.

2.4.4.4 Reinheitskontrolle, Lagerung [OECD, 2008]

In der Normvorlage OECD werden keine Angaben zur Reinheitskontrolle und zur Lagerung der Sporensuspension gemacht. Die Reinheitskontrolle erfolgte standardgemäß mittels Phasenkontrastmikroskopie bzw. einem sporengefärbten Präparat. Die Lagerung der Sporensuspension erfolgte bei 2-8°C.

2.4.5 Anreicherung von *C. difficile*-Sporen – SOP 156 Bonn

2.4.5.1 Herstellung der Arbeitskulturer [IHPH, 2010]

Zur Herstellung der Arbeitskulturer wurde eine einzelne Perle einer tiefgefrorenen Probe (siehe Kapitel 2.3.1) von *C. difficile* auf Columbia-Agar ausgestrichen und für 48 h–72 h bei 37°C unter anaeroben Bedingungen inkubiert. Diese erste Subkultur diente als Arbeitskulturer.

2.4.5.2 Anreicherungsprozess [IHPH, 2010]

Fünf Rinderhackfleisch-Bouillon-Röhrchen wurden für 24 h bei Raumtemperatur unter anaeroben Bedingungen vorreduziert und mit je eine Kolonie der Arbeitskulturer beimpft. Die Inkubation erfolgte anaerob für 24 h–48 h bei 37°C. Insgesamt wurden ca. 100 Columbia-Agarplatten für 24 h bei Raumtemperatur vorreduziert und mit je 0,1 ml der beimpften Rinderhackfleisch-Bouillon beimpft. Zu beachten war, dass die inkubierte Rinderhackfleisch-Bouillon nicht gevortext werden durfte. Die Röhrchen sollten lediglich vorsichtig zwischen den Handinnenflächen gedreht werden und die Paraffinschicht durfte erst danach entfernt werden. Der Inokulationsschritt der Columbia-Agarplatten unter aeroben Raumverhältnissen sollte so schnell wie möglich abgeschlossen werden. Die Inkubation der Agarplatten erfolgte ananerob für sieben Tage bei 37°C und im Weiteren für 14 Tage bei Raumtemperatur im Dunkeln.

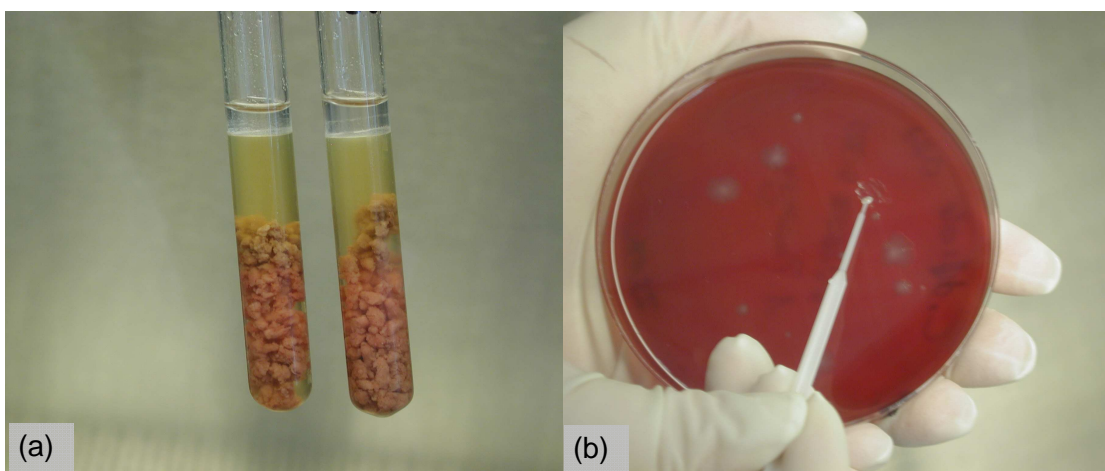


Abbildung 17: Ablauf der Sporenanreicherung *C. difficile* – SOP 156 Bonn

Erste Schritte der Sporenanreicherung von *C. difficile*: (a) Rinderhackfleisch-Bouillon mit Paraffin (b) Beimpfung der Rinderhackfleisch-Bouillon mit eine Kolonie von *C. difficile* (1.Subkultur).

2.4.5.3 Sporenernte [IHPH, 2010]

Die Sporenernte erfolgte durch Abschwemmen der Columbia-Agarplatten mit 2–3 ml H₂O unter Zuhilfenahme eines Drigalski Spatels. Die Zentrifugation der gesammelten Suspension erfolgte in Portionen á 100 ml bei 10°C und 3000 g für 10 min. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 50 ml sterilem H₂O resuspendiert. Die Zentrifugations- und Waschschrirte wurden 3-mal wiederholt. Die Sporensuspension wurde durch Aufnahme des Pellets in ca. 30 ml sterilem H₂O auf eine Konzentration von ca. 10⁷ KBE/ml eingestellt. Zur Inaktivierung verbliebener vegetativer Zellen wurde die Suspension in einem Wasserbad für 10 min auf 80°C erhitzt. Für die KBE-Bestimmung wurden ausreichende Verdünnungen in H₂O angelegt und in GSBHI-Agar eingegossen. Die Inkubation erfolgte anaerob für 72 h bei 37°C.

2.4.5.4 Reinheitskontrolle, Lagerung [IHPH, 2010]

Zur Überprüfung der Reinheit und Homogenität der Sporen wurden phasenkontrastmikroskopische Bilder oder Präparate mit Sporenfärbung angefertigt. Die Anzahl an vegetativen Zellen sollte 20% des Gesichtsfelds nicht überschreiten, anderenfalls wurde die Sporensuspension verworfen. Die Lagerung der Sporen erfolgte in H₂O in einem verschraubbaren Glasgefäß mit sterilen Glasperlen bei 2-8°C. Die Sporen sollten nach Möglichkeit erst nach einer Lagerungszeit von zwei Wochen für sporizide Desinfektionsmitteltestungen verwendet werden.

2.4.6 Anreicherung von *C. difficile*-Sporen – RKI-Methode

Bei der hier beschriebenen Anreicherungs-methode handelt es sich um eine modifizierte Methode nach SOP Bonn (siehe Kapitel 2.4.5). Die Modifikation erfolgte durch I. Schwebke des Robert Koch-Instituts auf Basis der bereits beschriebenen Anreicherungs-methode.

2.4.6.1 Herstellung der Arbeitskultu-r [RKI, 2008a]

Die tiefgeflorene Stammkultu-r (siehe Kapitel 2.3.1) wurde bei diesem Anreicherungsverfahren als Arbeitskultu-r verwendet.

2.4.6.2 Anreicherungsprozess [RKI, 2008a]

Große Reagenzgläser wurden mit 10 ml Brain-Heart-Infusion (BHI) befüllt und vor Gebrauch 30 min in einen Dampftopf gestellt. Nach dem Abkühlen wurden die Reagenzgläser mit 0,1 ml einer Stammkultu-r von *C. difficile* beimpft und mit 1 ml Paraffin abgedichtet. Die Inkubation erfolgte anaerob für 24 h bei 37°C. Im Folgenden wurde mit dieser Suspension etwa 100 vorreduzierte Brain-Heart-Agarplatten (BHA), die ca. eine Woche alt waren und im Kühlschrank gelagert wurden, beimpft. Das Vorreduzieren der Agarplatten erfolgte für 24 h

bei Raumtemperatur. Die Bebrütung der beimpften Agarplatten erfolgte anaerob für sieben Tage bei 37°C und im Weiteren für 14 Tage bei Raumtemperatur im Dunkeln.

2.4.6.3 Sporenernte [RKI, 2008a]

Die Sporenernte erfolgte durch Abschwemmen der Agarplatten mit je 2-mal 5 ml BHI. Die Zentrifugation der gesammelten Suspension erfolgte in Portionen á 50 ml bei 3000 g für 15 min. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets wurden in 1 ml H₂O mit einem Glasspatel homogenisiert und auf 20 ml mit H₂O aufgefüllt. Die Sporensuspension wurde für 1 min gemischt und mit 20 ml sterilfiltriertem, absolutem Ethanol gemischt. Die erste KBE-Bestimmung erfolgte nach 24 h. Vor Gebrauch der Sporenernte mussten jeweils nachfolgende Waschschriffe erfolgen:

Die Sporensuspension wurde für 1 min mit Glasperlen geschüttelt. 0,5 ml dieser Suspension wurden entnommen und bei 12.000 rpm für 1 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 1 ml Phosphatpuffer (M/15) resuspendiert. Diese Waschschriffe wurden 3-mal wiederholt. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in 0,5 ml Phosphatpuffer aufgenommen. Nach der Anlage ausreichender Verdünnungen wurde je 1 ml in BHA mit 10 mg/l Lysozym eingegossen. Die Inkubation erfolgte anaerob für fünf Tage bei 37°C.

2.4.6.4 Reinheitskontrolle, Lagerung [RKI, 2008a]

Die Reinheitskontrolle erfolgte entsprechend der Vorschrift vor Zugabe des Ethanols. Des Weiteren wurde eine mikroskopische Reinheitskontrolle nach den Waschschriffen, das heißt vor Verwendung der Sporensuspension für einen Desinfektionsmitteltest, durchgeführt. Die Lagerung der Sporensuspension erfolgte in einem Schüttelgefäß mit Glasperlen in 50%igem Ethanol bei 2-8°C. Vor Verwendung der Sporensuspension, für eine KBE-Bestimmung oder einen Desinfektionsmitteltest, musste diese den unter Kapitel 2.4.6.3 beschriebenen Waschschriffen unterzogen werden.

2.5 Enzymverdau (Sporenreinigung)

Zur Aufreinigung von *C. difficile*-Sporensuspensionen wurde ein Enzymverdau, der von der Arbeitsgruppe von S. A. Sattar in Ottawa (Kanada) etabliert wurde, verwendet [Perez, J. *et al.*, 2011].

Nach den entsprechenden Waschschritten der Sporenernte wurde das Nassgewicht des Pellets in einem Zentrifugenröhrchen bestimmt. Maximal 1 g des Nassgewichts wurde für den späteren Enzymverdau verwendet und in 10 ml 0,1M Phosphatpuffer (siehe 2.1.8) resuspendiert und durchmischt. Das gelöste Pellet wurde mit 25 ml einer sterilfiltrierten Enzymlösung, besteht aus Lysozym und Trypsin, versetzt (siehe 2.1.8).

Die Suspension wurde für 10 min im Ultraschallbad behandelt und für 6 h bei 45°C im Wasserbad inkubiert. Alle 2 h erfolgte eine 10-minütige Ultraschallbehandlung. Nach der Inkubationszeit wurde die Suspension über Nacht bei 4°C gelagert und durch drei Waschschriffe mit je 35 ml sterilem H₂O gereinigt. Das Pellet wurde in 10 – 30 ml H₂O aufgenommen und bei 4°C gelagert.

2.6 Quantitativer Suspensionsversuch (Phase 2, Stufe 1)

Die quantitativen Suspensionsversuche auf nationaler (Deutschland) und europäischer Ebene unterscheiden sich im Ablauf des Testansatzes und im Bereich der Validierungsansätze. Die Unterschiede werden im Folgenden deutlich gemacht. In den DGHM-Standardmethoden [Gebel, J. *et al.*, 2001] ist das Prozedere des quantitativen Suspensionsversuch auf nationaler Ebene festgelegt und in der Vornorm prEN 13727 [CEN, 2009] (WG1) wird der Versuchsablauf auf europäischer Ebene vorgegeben.

In Anlehnung an die EN 13704 [CEN, 2002] wurde für die sporizide Desinfektionsmitteltestung die KBE in der Prüfsuspension auf 1,5 - 5 x 10⁶ KBE/ml eingestellt und zur Auslobung eines sporiziden Desinfektionsmittel eine Reduktion von 3 log₁₀-Stufen gefordert. Die Herstellung der Produktprüflösung für den quantitativen Suspensionsversuch ist unter Kapitel 2.1.14 aufgeführt.

Bei allen quantitativen Suspensionsversuchen für die Flächendesinfektionsmittel wurden die Testansätze (Na) in einem Wasserbad oder Kühlbrutschrank über die jeweilige Einwirkzeit konstant auf einer Temperatur von 20°C gehalten.

Membranfiltrationen wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht angewendet, da für alle überprüften Desinfektionsmittel geeignete Neutralisationsmittel gefunden werden konnten (siehe Annex A). Der Einsatz von Membranfiltrationen wird nur dann gefordert, wenn keine geeigneten Neutralisatoren gefunden werden können.

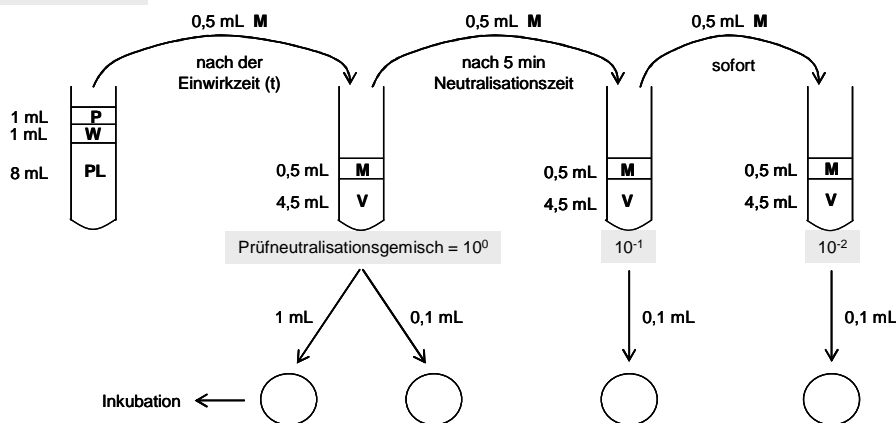
2.6.1 DGHM-Standardmethoden modifiziert

2.6.1.1 Testansatz

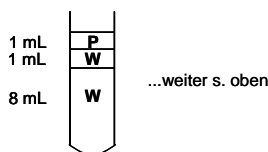
8 ml Produktprüflösung wurden in ein Reagenzglas pipettiert. In direkter Abfolge wurde der Produktprüflösung 1 ml Belastungssubstanz und 1 ml Prüfsuspension zugeführt. Bei Konzentraten wurde 8,9 ml der Produktprüflösung mit 1 ml Belastungssubstanz und 0,1 ml der Prüfsuspension (10-fach höher konzentriert) vermischt. Die Stoppuhr wurde mit der Zugabe der Prüfsuspension gestartet und gleichzeitig der Ansatz gemischt.

Kurz vor Ende der Einwirkzeit (t) wurde der Testansatz erneut durchmischt und am Ende der Einwirkzeit (t) wurde eine 0,5 ml Probe aus dem Ansatz (Na) entnommen und in 4,5 ml Neutralisationsmittel überführt. Weitere Verdünnungen (10^{-1} bis 10^{-2}) erfolgten ebenfalls in Neutralisationsmittel. Die Ansätze wurden durchmischt und nach $5 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ Neutralisationszeit wurde aus dem neutralisierten Testansatz und den Verdünnungen je 1 ml auf das für den Testorganismus geeignete Nährmedium im Doppelansatz eingegossen.

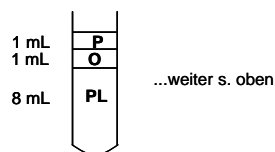
a) ohne Belastung / Test



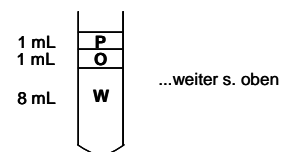
a) ohne Belastung / WSH-Kontrolle



b) bzw. c) mit Belastung / Test



b) bzw. c) mit Belastung / WSH-Kontrolle



A A. bidest.	O organische Belastung	S Spüfflüssigkeit
C* CSL ohne bzw. mit N	P Prüfsuspension	V Verdünnungsmittel, ggf. mit N
M Mischung	PL Produktprüflösung	W WSH
N Neutralisationsmittel	PV Prüfsuspension für die Validierung	

Abbildung 18: Quantitativer Suspensionsversuch (Phase 2, Stufe1) gemäß DGMH

Ablaufschema zum quantitativen Suspensionsversuch gemäß DGHM-Standardmethoden 2001 [Gebel, J. *et al.*, 2001].

2.6.1.2 WSH-Kontrolle (Ko1)

Die WSH-Kontrolle (Ko1) entspricht einer Versuchskontrolle, das heißt die Bestimmung der KBE/ml erfolgte ohne Einwirkung des Prüfproduktes.

Anstelle einer Produktprüflösung wurde bei diesem Testansatz WSH verwendet. Die entsprechende Belastungssubstanz, Prüfsuspension und Einwirkzeit änderten sich nicht, die Durchführung erfolgte in gleicher Weise wie unter Kapitel 2.6.1.1 beschrieben.

2.6.1.3 Neutralisationskontrolle (Ko2)

Zur Kontrolle der Neutralisation (Ko2) wurden 9 ml Neutralisationsmittel mit 1 ml der höchsten im Test eingesetzten Konzentration des Prüfproduktes vermischt und nach $5 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ Neutralisationszeit mit 0,1 ml einer 10^{-2} -Verdünnung der Prüfsuspension, versetzt und gemischt.

Nach der längsten Einwirkzeit wurde sowohl aus diesem Direktansatz als auch aus einer 10^1 -Verdünnung in Neutralisationsmittel je 0,5 ml auf das für den Testorganismus geeignete Nährmedium im Doppelansatz eingegossen.

2.6.1.4 Kontrolle der Nicht-Toxizität des Neutralisationsmittels (Ko3)

Die Kontrolle der Nicht-Toxizität des Neutralisationsmittels (Ko3) wurde parallel zur Neutralisationskontrolle (Ko2) durchgeführt und enthielt anstelle der Produktprüflösung nun WSH (vgl. Kapitel 2.6.1.3).

2.6.2 Phase 2, Stufe 1 (prEN 13727 modifiziert)

2.6.2.1 Testansatz

1 ml Belastungssubstanz wurde in ein Reagenzglas pipettiert. Unmittelbar nach Zugabe von 1 ml Prüfsuspension wurde die Stoppuhr gestartet, der Ansatz durchmischt und für $2 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ kontrolliert auf eine Temperatur von 20°C gehalten.

Am Ende dieser Zeit wurde 8 ml Produktprüflösung zugeführt und die Stoppuhr parallel neu gestartet. Der Testansatz wurde durchmischt und für die entsprechende Einwirkzeit kontrolliert auf einer Temperatur von 20°C gehalten. Kurz vor Ende der Einwirkzeit wurde der Ansatz erneut durchmischt.

Am Ende der Einwirkzeit (t) wurde eine 1 ml Probe aus dem Testansatz (Na) und in ein Reagenzglas mit 8 ml Neutralisationsmittel und 1 ml H_2O überführt. Nach der Neutralisationszeit von $5 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ wurde dieses durchmischt und sofort aus dem neutralisierten Testansatz und den jeweiligen Verdünnungen je 1 ml auf das für den Testorganismus geeignete Nährmedium im Doppelansatz eingegossen.

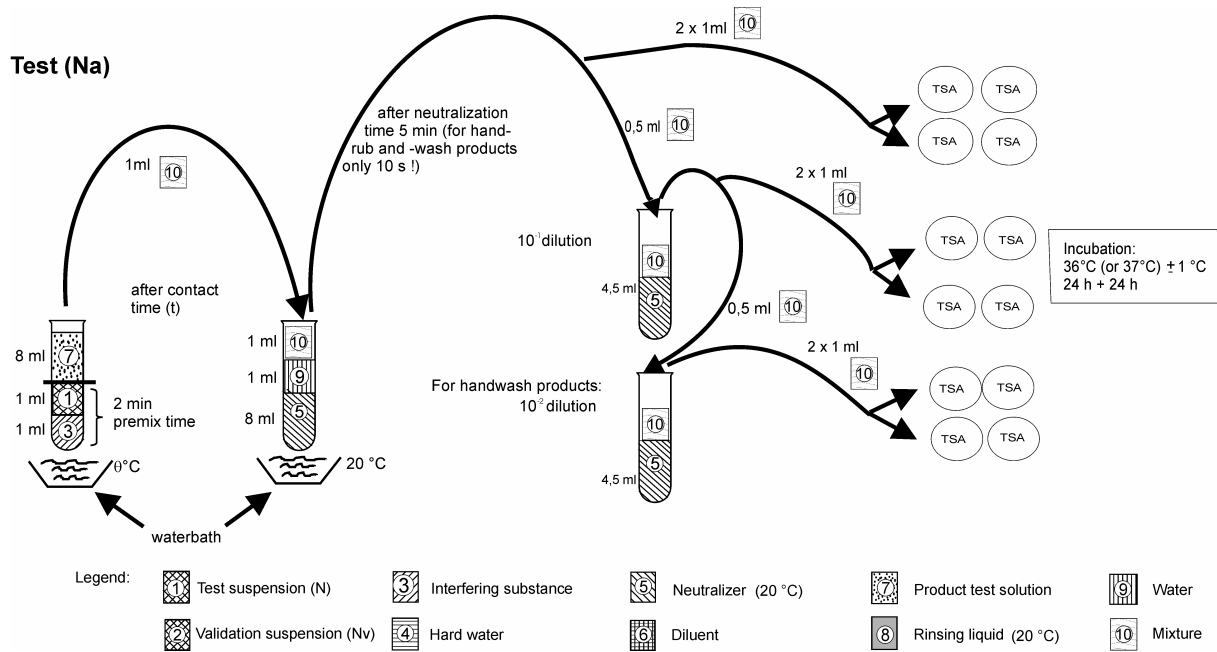


Abbildung 19: Quantitativer Suspensionsversuch (Phase 2, Stufe 1) gemäß Draft WG1

Ablaufschema zum quantitativen Suspensionsversuch gemäß Draft WG1 [CEN, 2009]

2.6.2.2 Versuchskontrolle (KoA)

Die Versuchskontrolle (KoA) erfolgte auf europäischer Ebene mit einer speziellen Prüfsuspension (Nv), die $3,0 \times 10^2 - 1,6 \times 10^3$ KBE/ml enthält. Anstelle des Prüfproduktes wurde auch hier WSH verwendet. Die entsprechende Belastungssubstanz und Einwirkzeit änderte sich nicht. Die Durchführung erfolgte ansonsten nach dem unter Kapitel 2.6.2.1 beschriebenen Ablauf. Das Anlegen von Verdünnungen war auf Grund der geringer konzentrierten Prüfsuspension nicht notwendig.

2.6.2.3 Kontrolle der Nicht-Toxizität des Neutralisationsmittels (KoB)

Die Toxizitätskontrolle (KoB) wurde mit einer Prüfsuspension (NvB) durchgeführt, die auf $3,0 \times 10^4 - 1,6 \times 10^5$ KBE/ml eingestellt wurde.

9 ml Neutralisationsmittel wurden in ein Reagenzglas gefüllt und mit 1 ml NvB versetzt. Gleichzeitig wurde die Stoppuhr gestartet und der Ansatz durchmischt. Durch Überführen von 0,5 ml des Ansatzes in 4,5 ml Neutralisator wurde eine 10^{-1} -Verdünnung von NvB angelegt. Eine weitere Verdünnung in 4,5 ml Neutralisator wurde angelegt, um eine 10^{-2} -Verdünnung von NvB zu erhalten. Kurz vor Ablauf der $5 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ Neutralisationszeit wurde die 10^{-2} -Verdünnung von NvB durchmischt. Am Ende der Neutralisationszeit wurde 1 ml aus dem Ansatz „KoB“ (10^{-2} -Verdünnung NvB) auf das für den Testorganismus geeignete Nährmedium im Doppelansatz eingegossen.

2.6.2.4 Neutralisationskontrolle (KoC)

1 ml der im Test verwendeten Belastungssubstanz (siehe 2.6.2.1) wurde in ein Reagenzglas pipettiert. Unmittelbar nach Zugabe von 1 ml H₂O wurde die Stoppuhr gestartet und 8 ml der höchsten im Test eingesetzten Konzentration des Prüfproduktes dem Ansatz zugeführt und durchmischt. Nach der längsten Einwirkzeit und einem erneuten durchmischen wurde 1 ml des Ansatzes in 8 ml Neutralisationsmittel überführt. Mit dem Überführen wurde die Stoppuhr neu gestartet. Nach einer Neutralisationszeit von 5 min ± 10 s wurde dem Ansatz 1 ml der Nv-Suspension (siehe 2.6.2.2) zugeführt und gemischt. Nach 30 min ± 1 min wurde 1 ml des Ansatzes „KoC“ auf das für den Testorganismus geeignete Nährmedium im Doppelansatz eingegossen.

2.7 Praxisnahe Versuche (Phase 2, Stufe 2)

Bei den praxisnahen Versuchsmodellen erfolgte eine Anpassung der Sporizideprüfung an den Flächentest ohne Mechanik [CEN, 2001; Gebel, J. *et al.*, 2001] und an den Flächentest mit Mechanik [Gebel, J. *et al.*, 2001]. Darüber hinaus erfolgte eine Methodenanpassung an den praxisnahen 4-Felder Test [Gebel, J. *et al.*, 2004].

2.7.1 Fächendesinfektion ohne Mechanik

2.7.1.1 Testansatz

Auf je ein Metallplättchen (Testfläche, siehe Tabelle 3) wurde pro Prüfzeit 0,05 ml der Prüfsuspension (inkl. 0,03% Albumin bzw. 0,3% Albumin und 0,3% Schaferythrozyten für geringe bzw. höhere organische Belastung) mit einer Pipette aufgebracht und bis zur optischen Trockenheit (max. 60 min) unter der Laminar Air Flow aufbewahrt.

Nach Antrocknung der Prüfsuspension wurden die Testflächen mit 0,1 ml Produktprüflösung überschichtet, wobei die getrocknete Prüfsuspension vollständig bedeckt sein musste.

Für den Nachweis rückgewinnbarer KBE wurden die Testflächen mit der Oberseite nach unten in eine Petrischale eingelegt, die 10 ml Neutralisationsmittel und Glasperlen (Ø 3 – 4 mm) enthielt. Das Abschwemmen erfolgte für 2 min auf einer Schüttelmaschine. Im Folgenden wurde eine 10⁻¹-Verdünnung in Neutralisationsmittel angelegt. Nach der Neutralisationszeit von 5 min ± 10 s wurden 0,5 ml und 0,1 ml aus dem Direktansatz und aus der 10⁻¹-Verdünnung 0,1 ml auf das für den Testorganismus geeignete Nährmedium im Doppelansatz ausgespatelt bzw. eingegossen.

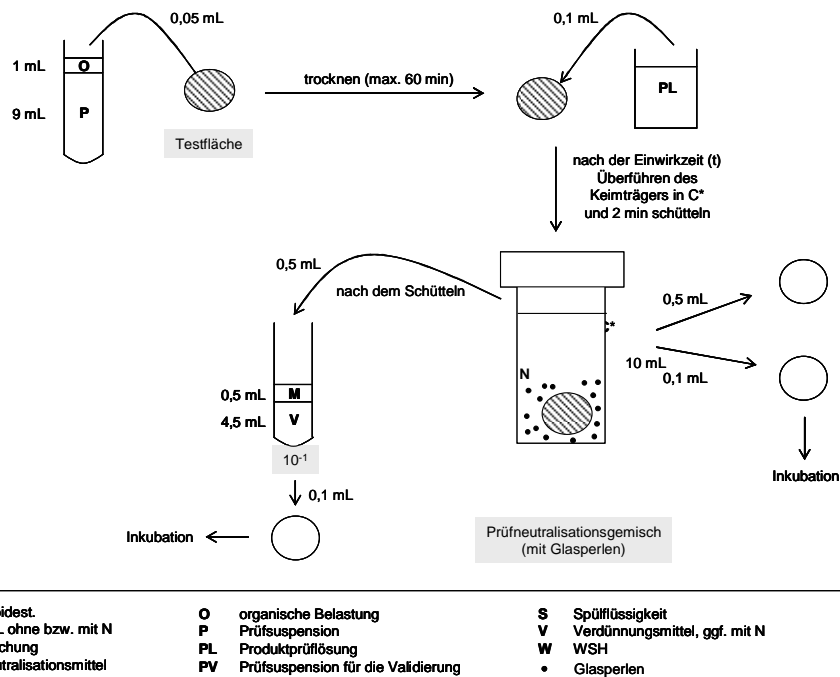


Abbildung 20: Flächendeseinfektion ohne Mechanik (Phase 2, Stufe 2) gemäß DGHM

Modifiziertes Ablaufschema für den praxisnahen Versuch – Sprühdeseinfektion [Gebel, J. *et al.*, 2001]

2.7.1.2 WSH-Kontrolle (Ko1) (siehe 2.6.1.2)

2.7.1.3 Neutralisationskontrolle (Ko2) (siehe 2.6.1.3)

2.7.1.4 Kontrolle der Nicht-Toxizität des Neutralisationsmittels (Ko3) (siehe 2.6.1.4)

2.7.2 Flächendeseinfektion mit Mechanik

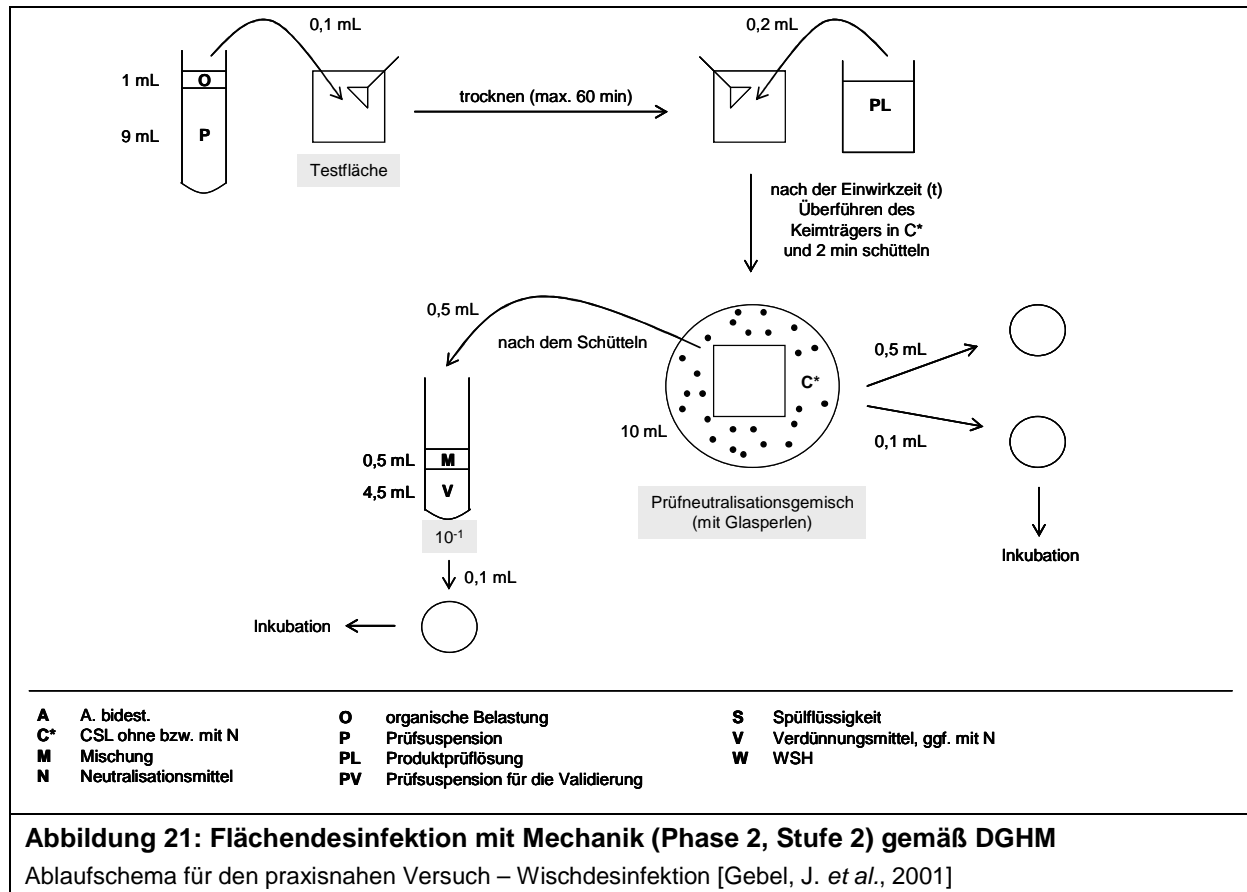
2.7.2.1 Testansatz

Auf je eine mattglasierte OP-Fliese (Testfläche, siehe Tabelle 3) wurde pro Prüfzeit 0,1 ml der Prüfsuspension (inkl. 0,03% Albumin bzw. 0,3 % Albumin + 0,3% Schaferythrozyten für geringe bzw. höhere organische Belastung) mit einer Pipette aufgebracht, mit einem Glasspatel (30 mm Kantenlänge) auf dem mittleren Areal von 30 x 30 mm gleichmäßig verteilt und bis zur optischen Trockenheit (max. 60 min) unter der Laminar Air Flow aufbewahrt. Der zur Verteilung der Prüfsuspension benutzte Spatel wurde zuerst auf einer Blindprobe verwendet, um zu vermeiden, dass die erste Versuchsfläche mit einer zu geringen Keimmenge kontaminiert wurde.

Nach Antrocknung der Prüfsuspension wurden die Testflächen mit 0,2 ml Produktprüflösung durch Verteilen mit einem Glasspatel behandelt.

Für den Nachweis rückgewinnbarer KBE werden die Testflächen mit der Oberseite nach unten in einen Behälter mit max. 10 cm Durchmesser, z.B. Petrischalen, eingelegt, der 10 ml

Neutralisationsmittel und Glasperlen (\varnothing 3 - 4 mm) enthält. Das Abschwemmen erfolgte für 2 min auf einer Schüttelmaschine. Anschließend wurde eine 10^{-1} -Verdünnung in Neutralisationsmittel angelegt. Nach der Neutralisationszeit von $5 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ wurden 0,5 ml und 0,1 ml aus dem Direktansatz und aus der 10^{-1} -Verdünnung 0,1 ml auf das für den Testorganismus geeignete Nährmedium im Doppelansatz ausgespatelt bzw. eingegossen.



2.7.2.2 WSH-Kontrolle (Ko1) (siehe 2.6.1.2)

2.7.2.3 Neutralisationskontrolle (Ko2) (siehe 2.6.1.3)

2.7.2.4 Kontrolle der Nicht-Toxizität des Neutralisationsmittels (Ko3) (siehe 2.6.1.4)

2.7.3 4-Felder Test – patientennahe Flächen

Im Rahmen dieser Studie wurde der von M. Exner und J. Gebel [Exner, M. *et al.*, 2004; Gebel, J. *et al.*, 2004] beschriebene 4-Felder Test so modifiziert, dass er für Belange der Sporizidie-Testung für die patientennahe Flächendesinfektion eingesetzt werden konnte. Der 4-Felder Test ermöglicht auch die Darstellung der Desinfektionswirksamkeit auf Fußböden, hierfür müssten jedoch befeuchtete Wischmöppe und größere Testflächen eingesetzt werden. Dieser Vorschlag wurde als Entwurf für die Normierung bei der WG1 im CEN TC 216 eingereicht.

2.7.3.1 Testansatz

Als Testflächen wurden jeweils neue PVC-freie Bodenbelagstücke in einer Größe von 20 x 50 cm verwendet. Vier Testfelder wurden als Quadrate á 5 x 5 cm in einer Reihe im Abstand von 7 cm auf der Fläche mit der Bezeichnung 1-4 markiert (siehe Abbildung 22). Das Testfeld 1 wurde mit 0,05 ml Prüfsuspension (ca. 3×10^6 KBE/ml inkl. organischer Belastung) kontaminiert und die Suspension mit einem Glasspatel (30 mm Kantenlänge) auf dem gesamten Testfeld 1 gleichmäßig verteilt. Der zur Verteilung der Prüfsuspension benutzte Spatel wurde zuerst auf einer Blindprobe verwenden, um zu vermeiden, dass die erste Versuchsfläche mit einer zu geringen Suspensionsmenge kontaminiert wurde. Die kontaminierte Testfläche wurde bei Raumtemperatur bis zur optischen Trockenheit (max. 60 min) aufbewahrt. Die Testfelder 2-4 wurden nicht kontaminiert. Nach Antrocknung der Prüfsuspension erfolgte der Wischvorgang mit SCA Hygiene Tork Premium Spezialreinigungstüchern, die jeweils mit 16 ml des Prüfproduktes benetzt wurden. Das benetzte Wischtuch wurde vor und nach dem Wischvorgang ausgewogen, um die abgegebene Desinfektionsmittelmenge bestimmen zu können. Der Wischvorgang erfolgte von Testfeld 1 zu Testfeld 4 und wieder zurück zu Testfeld 1 (siehe Abbildung 22). Mit dem Beginn des Wischvorgangs wurde die Stoppuhr gestartet und die Fläche über die entsprechende Einwirkzeit (t) bei Raumtemperatur gelagert.

Am Ende der Einwirkzeit (t) erfolgte, in Anlehnung an das Wattetupferabstrich-Verfahren [DIN, 1997], die Rückgewinnung der Testorganismen von jedem einzelnen Testfeld. Pro Testfeld wurden 2 Wattetupfer in 5 ml Neutralisationsmittel ausgewaschen. Nach der Neutralisationszeit von 5 min \pm 10 s wurden 0,5 ml aus dem Direktansatz auf das für den Testorganismus geeignete Nährmedium im Doppelansatz ausgespatelt bzw. eingegossen. Bestimmt wurden die koloniebildenden Einheiten pro Testfeld (KBE/25 cm²).

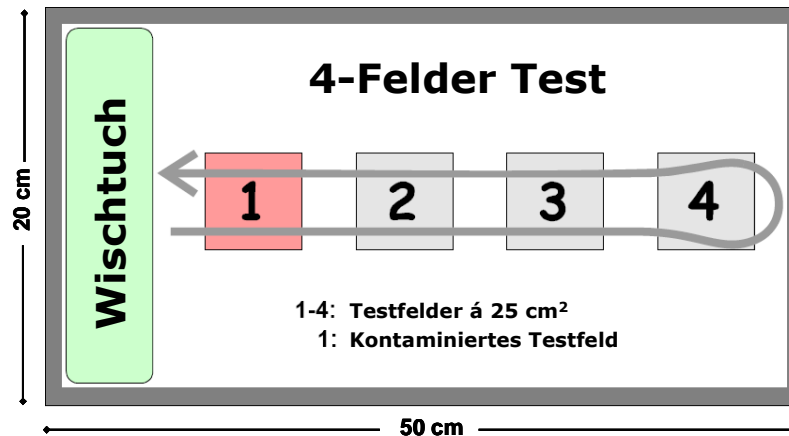


Abbildung 22: 4-Felder Test (Phase 2, Stufe 2)

Schematische Darstellung der Wischstrecke mittels Wischtuch über die Testfelder 1-4. Testfeld 1 wird mit 50 µl Prüfsuspension kontaminiert, Testfelder 2-4 sind keimfreie Oberflächen.

2.7.3.2 Kontrolle der Rückgewinnung (K_{t0} , K_{tx})

Zur Quantifizierung der Rückgewinnbarkeit ohne jeglichen chemischen oder mechanischen Einfluss wurden parallel zur Kontamination des Testfelds 1 (siehe Abbildung 22) auf einem separaten PVC-freien Bodenbelagstück zwei Kontrolltestflächen á 5 x 5 cm (K_{t0} und K_{tx}) kontaminiert. Die Rückgewinnung von Testfeld T_0 erfolgte unmittelbar nach Antrocknung und vor dem Wischvorgang des kontaminierten PVC-freien Bodenbelag 20 x 50 cm (siehe 2.7.3.1). Die Rückgewinnung der Testorganismen von Testfeld K_{tx} erfolgte nach der Einwirkzeit (t_x), um quantifizieren zu können, ob Testorganismen über die Einwirkzeit ohne Behandlung inaktiviert wurden. Die Rückgewinnung der Testorganismen von den Testfeldern (K_{t0} und K_{tx}) erfolgte in Anlehnung an das Wattetupferabstrich-Verfahren [DIN, 1997]. Pro Testfeld wurden 2 Wattetupfer in 5 ml Neutralisationsmittel ausgewaschen. Nach der Neutralisationszeit von 5 min \pm 10 s wurde eine 10^{-1} - und 10^{-2} -Verdünnung angelegt. Aus der 10^{-1} - und 10^{-2} -Verdünnung wurden 0,1 ml auf das für den Testorganismus geeignete Nährmedium im Doppelansatz ausgespatelt bzw. eingegossen. Ermittelt wurden die koloniebildenden Einheiten pro Testfeld (KBE/25 cm²).

2.7.3.3 WSH-Kontrolle (K_{o1})

Die WSH-Kontrolle (K_{o1}) dient als Versuchskontrolle, das heißt die Bestimmung der KBE/25 cm² erfolgte ohne Einwirkung des Prüfproduktes.

Anstelle einer Produktprüflösung wurde bei diesem Testansatz WSH verwendet. Die Durchführung erfolgte in gleicher Weise wie unter Kapitel 2.7.3.1 beschrieben.

2.7.3.4 Neutralisationskontrolle (K_{o2}) (siehe 2.6.1.3)

2.7.3.5 Kontrolle der Nicht-Toxizität des Neutralisationsmittels (K_{o3}) (siehe 2.6.1.4)

3. ERGEBNISSE

3.1 *B. subtilis*-Sporensuspensionen

Bei den aeroben Sporenbildnern wurden vier verschiedene Anreicherungsmethoden miteinander verglichen: SOP 112 Bonn, EN 14347, EN 13704, OECD. Für die drei erstgenannten Anreicherungsverfahren wurde der *B. subtilis*-Stamm ATCC 6633 verwendet, da dieser standardmäßig auf europäischer Ebene für die Sporizidietestung vorgeschlagen wird. Die OECD-Methode sieht mit dem ATCC 19659 für die Sporizidieprüfung einen anderen *B. subtilis*-Stamm.

3.1.1 Sporenanreicherung nach SOP 112 Bonn

Insgesamt wurden sieben Anreicherungen mit *B. subtilis* ATCC 6633 gemäß der in Bonn etablierten Methode (siehe Kapitel 2.4.1) durchgeführt. Die nachstehende Abbildung 23 zeigt exemplarisch mikroskopische Aufnahmen einer Sporensuspension.

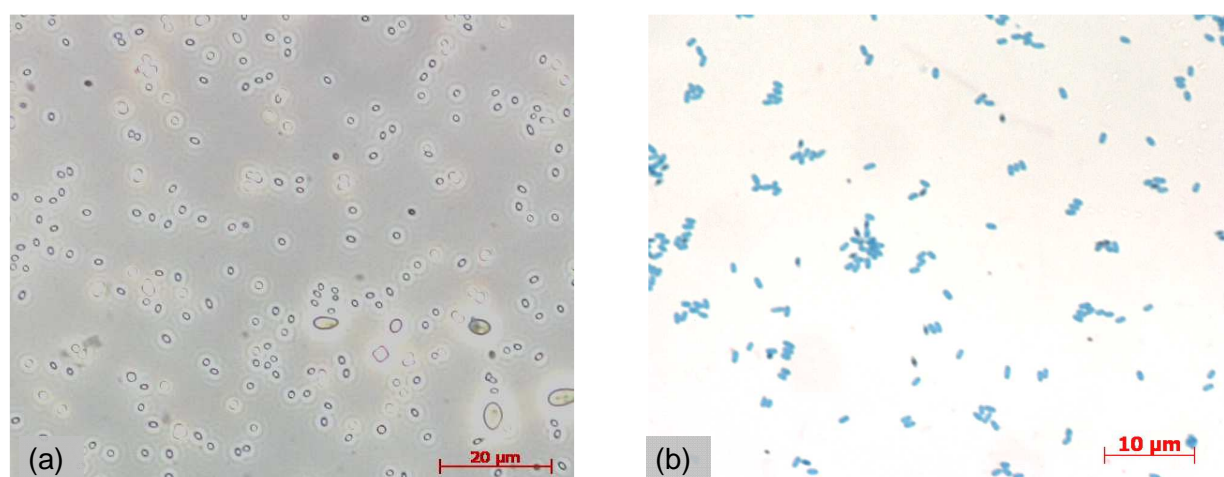


Abbildung 23: Mikroskopische Aufnahmen einer *B. subtilis*-Sporensuspension (SOP 112 Bonn)
B. subtilis-Sporen des ATCC-Stamms 6633, Sporenernte vom 14.03.2007 (a) Phasenkontrastaufnahme (400fach), (b) Sporenfärbung (1000fach)

Die Sporenausbeute lag im Mittel bei $6,84 \times 10^9$ KBE/ml. Orientierend wurde für die Sporenernte vom 14.03.2007 neben der Kultivierung auf Trypton-Soja-Agar (TSA) die Gesamtzellzahl (Sporen) in der Thoma-Zählkammer ermittelt. Die ermittelten koloniebildenden Einheiten auf TSA von $4,9 \times 10^9$ KBE/ml und die parallel ermittelte Gesamtzellzahl von $2,8 \times 10^9$ GZZ/ml dokumentierte eine vollständige Rekulтивierbarkeit der *B. subtilis*-Sporen (siehe Tabelle 11). Der ermittelte Sporenanteil lag konstant bei $\geq 97\%$. Zellfragmente abgestorbener vegetativer Zellen (Zelldebris) waren nicht vorhanden.

Für die Anreicherung der Sporensuspension vom 23.08.2010, die im Rahmen des Sporicidal Task Group (SpoTG)-Ringversuchs erfolgte, wurde zur Herstellung des Sporulationsmediums sogenanntes „Cell culture grade“ Wasser verwendet. Dabei handelt es sich um bidestilliertes, demineralisiertes Wasser der Firma Sigma (W 3000). Für die übrigen Anreicherungen wurde stets demineralisiertes Wasser verwendet (siehe S. 44, Kapitel 2.1.11). Wie aus Tabelle 11 ersichtlich, ist kein signifikanter Unterschied in der Sporenausbeute (KBE/ml) und Reinheit, zwischen der Sporenernte vom 23.08.2010 und den anderen Sporenernten erkennbar.

Tabelle 11: Parameter zur Bestimmung der Sporensuspensionen des *B. subtilis* ATCC 6633 (SOP 112 Bonn). Aufgeführt sind die Erntedaten (Ernte), die koloniebildenden Einheiten pro ml in Trypton-Soja Agar (TSA), die Gesamtzellzahl der Sporen pro ml (Zählkammer) und der prozentuale Anteil der Sporen (Reinheit) im mikroskopischen Bild.

<i>B. subtilis</i> ATCC 6633			
Ernte Datum	TSA KBE/ml	Zählkammer GZZ/ml	Reinheit Sporenteil
26.10.2006	3,80 x 10 ⁹	n.d.	> 97 %
14.11.2006	5,00 x 10 ⁹	n.d.	
14.03.2007	4,90 x 10 ⁹	2,80 x 10 ⁹	
10.03.2008	1,10 x 10 ⁹	n.d.	
15.08.2008	1,90 x 10 ¹⁰	n.d.	
17.08.2009	1,00 x 10 ¹⁰	n.d.	
23.08.2010*	4,10 x 10 ⁹	n.d.	
Mittelwert	6,84 x 10 ⁹	–	

* verwendetes Wasser: Sigma W 3000, n.d. nicht durchgeführt

3.1.2 Sporenanreicherung nach EN 14347

Im Rahmen der Studie wurde aus Stuttgart von B. Hunsinger eine Sporensuspension mit *B. subtilis* ATCC 6633 zur Verfügung gestellt, die gemäß EN 14347 (siehe Kapitel 2.4.2) angereichert wurde. Die nachstehende Abbildung 24 zeigt beispielhaft mikroskopische Aufnahmen der Sporensuspension vom 11.10.2003.

Dabei wird deutlich, dass es sich im Vergleich zur Sporensuspension gemäß SOP 112 Bonn (siehe Abbildung 23) um eine Suspension mit einigen Zelldebris (Zellfragmente abgestorbener vegetativer Zellen) handelt. Des Weiteren waren häufiger mikroskopische Bildausschnitte zu finden (siehe Abbildung 24 (a)), in denen Aggregationen von Sporen vorlagen. Im Vergleich zur SOP Bonn Methode erfolgte bei diesem Anreicherungsverfahren zur Inaktivierung verbliebener vegetativer Zellen eine Alkoholinaktivierung gemäß EN 14347

(siehe S. 53, Kapitel 2.4.2) und keine Hitzeinaktivierung wie in der SOP 112 Bonn (siehe S. 51, Kapitel 2.4.1) beschrieben.

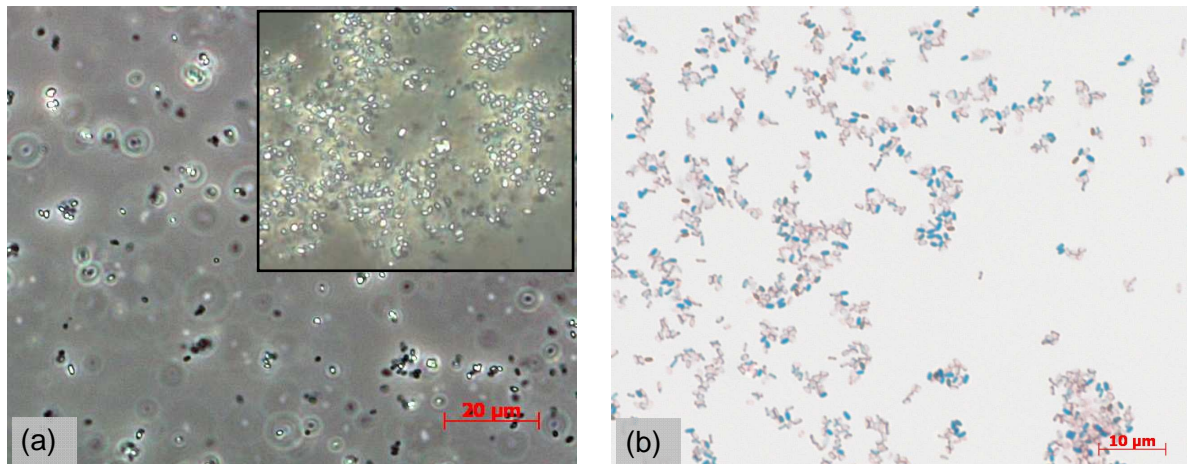


Abbildung 24: Mikroskopische Aufnahmen einer *B. subtilis*-Sporensuspension (EN 14347)
B. subtilis-Sporen des ATCC-Stamms 6633, Sporenernte vom 11.10.03 (a) Phasenkontrastaufnahme (400fach), (b) Sporenfärbung (1000fach)

Tabelle 12: Parameter zur Bestimmung der Sporensuspensionen des *B. subtilis* ATCC 6633 (EN 14347). Aufgeführt sind die Erntedaten (Ernte), die koloniebildenden Einheiten pro ml in Trypton-Soja-Agar (TSA), die Gesamtzellzahl der Sporen pro ml (Zählkammer) und der prozentuale Anteil der Sporen (Reinheit) im mikroskopischen Bild.

<i>B. subtilis</i> ATCC 6633			
Ernte Datum	TSA KBE/ml	Zählkammer GZZ/ml	Reinheit Sporenteil
11.10.2003	$9,32 \times 10^9$	n.d.	n.d.

n.d. nicht durchgeführt

3.1.3 Sporenanreicherung nach EN 13704

Die EN 13704 wurde ebenfalls zur Anreicherung von *B. subtilis*-Sporen ATCC 6633 herangezogen. Die Anreicherung erfolgte ausgehend von vegetativen *B. subtilis*-Zellen, da Sporen einer vorangegangenen Sporenanreicherung gemäß EN 13704 nicht zur Verfügung standen (siehe S. 54, 2.4.3). Sowohl im mikroskopischen Bild (Abbildung 25) als auch bei der Auswertung der Koloniezahl auf TSA zeigten sich hohe Sporenausbeuten mit $7,7 \times 10^8$ KBE/ml und einem hohen Reinheitsgrad von >97%.

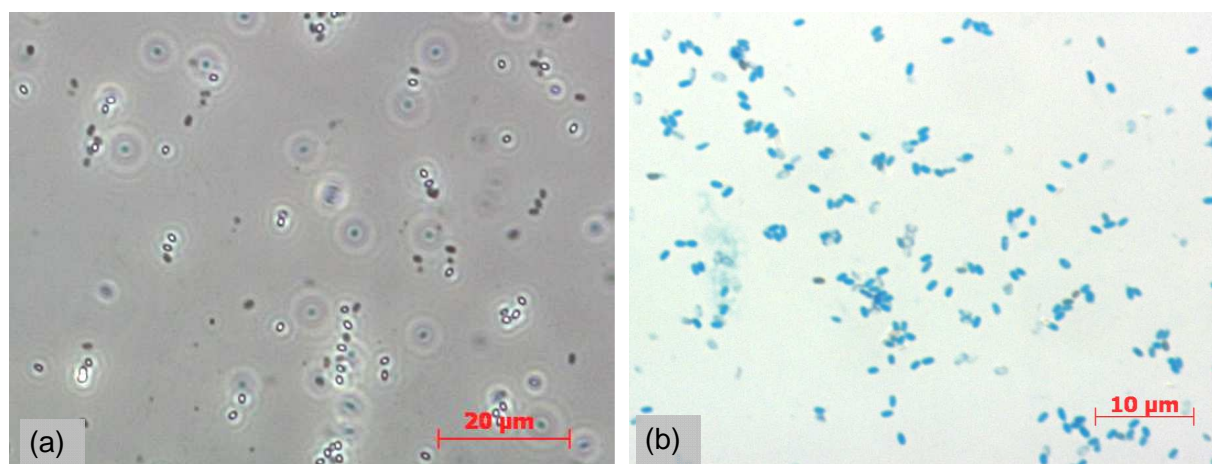


Abbildung 25: Mikroskopische Aufnahmen einer *B. subtilis*-Sporensuspension (EN13704)
B. subtilis-Sporen des ATCC-Stamms 6633, Sporenernte vom 24.11.2006 (a) Phasenkontrastaufnahme (400fach), (b) Sporenfärbung (1000fach)

Tabelle 13: Parameter zur Bestimmung der Sporensuspensionen des *B. subtilis* ATCC 6633 (EN 13704) Aufgeführt sind die Erntedaten (Ernte), die koloniebildenden Einheiten pro ml in Trypton-Soja-Agar (TSA), die Gesamtzellzahl der Sporen pro ml (Zählkammer) und der prozentuale Anteil der Sporen (Reinheit) im mikroskopischen Bild.

<i>B. subtilis</i> ATCC 6633			
Ernte Datum	TSA KBE/ml	Zählkammer GZZ/ml	Reinheit Sporenteil
24.11.2006	$7,70 \times 10^9$	n.d.	> 97 %

n.d. nicht durchgeführt

3.1.4 Sporenanreicherung nach OECD

Im Rahmen der Biozidgesetzgebung wird derzeit von der OECD ein Verfahren zur Testung der sporiziden Eigenschaften geprüft. Dabei handelt es sich um ein Anreicherungsverfahren, das von S. A. Sattar in Ottawa (Kanada) etabliert wurde. Die Anreicherung erfolgte zunächst ausgehend von vegetativen Formen von *B. subtilis* (ATCC 19659) und später, im Rahmen des SpoTG-Ringversuchs gemäß der Methodenvorschrift [OECD, 2008], ausgehend von *B. subtilis*-Sporen. Die *B. subtilis*-Sporen wurden für diesen Ringversuch von S. A. Sattar zur Verfügung gestellt. In Abbildung 26 (a) und (b) ist die Sporensuspension, die ausgehend von vegetativen Formen gestartet wurde und in Abbildung 26 (c) und (d), die von Sporen initiierte Anreicherung dargestellt.

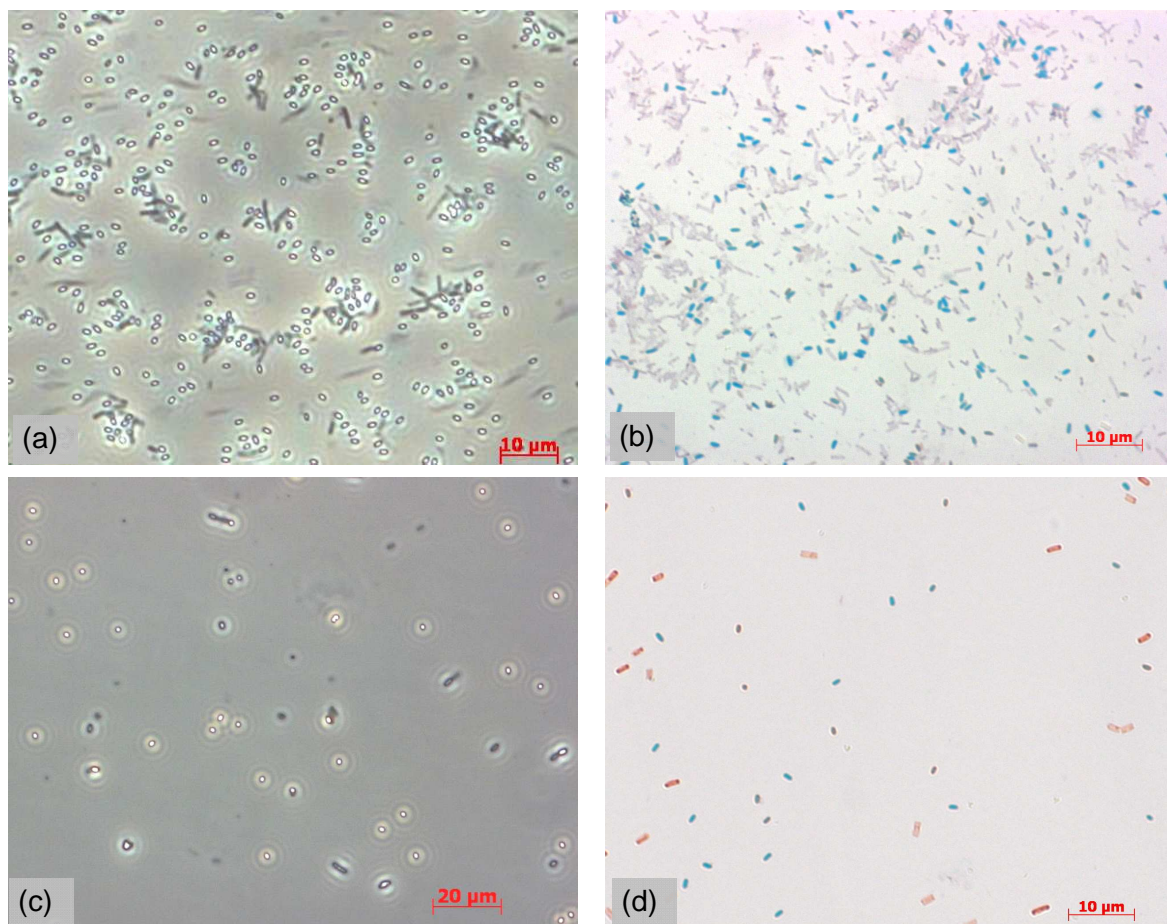


Abbildung 26: Mikroskopische Aufnahmen einer *B. subtilis*-Sporensuspension (nach OECD)
B. subtilis-Sporen des ATCC-Stamms 19659, (a)/(b) Sporenernte vom 02.02.2009, (c)/(d) Sporenernte vom 23.08.2010, (a)/(c) Phasenkontrastaufnahme (400fach) und (b)/(d) Sporenfärbung (1000fach).

Die Sporenanreicherung ausgehend von vegetativen Zellen (siehe Abbildung 26 (a) und (b)) führte im Vergleich zur Anreicherung ausgehend von *B. subtilis*-Sporen (siehe Abbildung 26 (c) und (d)) vermehrt zu Zelldebris und verbleibenden vegetativen Zellen. Im Mittel konnte auf Trypton-Soja-Agar (TSA) eine Sporenausbeute von $1,05 \times 10^9$ KBE/ml ermittelt werden. Der Reinheitsgrad lag bei der optimierten Sporenanreicherung vom 23.08.2010 bei 72% (siehe Tabelle 14).

Tabelle 14 Parameter zur Bestimmung der Sporensuspensionen des *B. subtilis* ATCC 19659 (OECD). Aufgeführt sind die Erntedaten (Ernte), die koloniebildenden Einheiten pro ml in Trypton-Soja-Agar (TSA), die Gesamtzellzahl der Sporen pro ml (Zählkammer) und der prozentuale Anteil der Sporen (Reinheit) im mikroskopischen Bild

<i>B. subtilis</i> ATCC 19659			
Ernte	TSA	Zählkammer	Reinheit
Datum	KBE/ml	GZZ/ml	Sporenteil
02.02.2009	$8,00 \times 10^8$	n.d.	n.d.
23.08.2010	$1,30 \times 10^9$	n.d.	72%

n.d. nicht durchgeführt

3.2 *C. difficile*-Sporensuspensionen

Im Folgenden werden die Ergebnisse dargestellt, die mit unterschiedlichen Stämmen von *Clostridium difficile* mit dem in Bonn etablierten Sporenanreicherungsverfahren generiert wurden. Für den Ribotyp 027 wurden zusätzlich Anreicherungen durchgeführt, die sich auf ein leicht abgewandeltes Verfahren beziehen, das in Anlehnung an die Bonn-Methodik vom RKI eingesetzt wird.

3.2.1 Sporenanreicherung nach SOP 156 Bonn

Entsprechend der Standardarbeitsanweisung Bonn (SOP 156 Bonn, siehe S. 56, Kapitel 2.4.5) wurden die folgenden *C. difficile*-Subtypen angereichert: Ribotyp 027, Ribotyp 001, Ribotyp 046, ATCC 9689.

3.2.1.1 *C. difficile* Ribotyp 027

Die nachstehenden Abbildungen zeigen zwei unterschiedliche Sporensuspensionen nach einer Sporenfärbung. Die Abbildungen stehen exemplarisch für elf Sporenanreicherungen mit dem Ribotyp 027. Der Anteil der verbliebenen vegetativen Zellen lag bei 1-20%, so dass in der Regel ein Reinheitsgrad von > 80% zu erwarten war (siehe Tabelle 16, S.76).

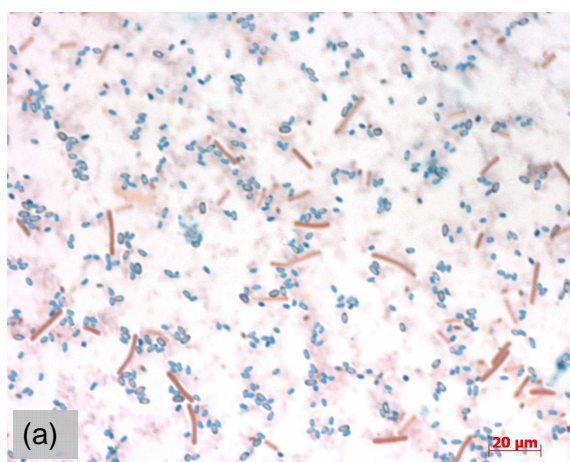


Abbildung 27: Mikroskopische Aufnahme einer *C. difficile* R027 Sporensuspension, Ernte: 21.11.07 (SOP 156 Bonn)
Sporenfärbung (1000fach), blau = Sporen; rot = vegetative Zellen

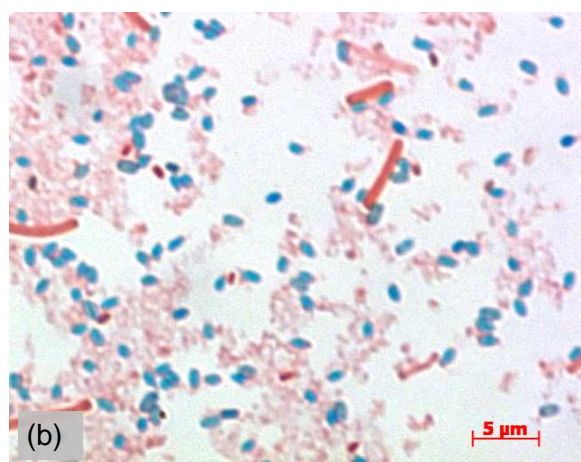


Abbildung 28: Mikroskopische Aufnahme einer *C. difficile* R027 Sporensuspension, Ernte: 02.03.10 (SOP 156 Bonn) Sporenfärbung (1000fach), blau = Sporen; rot = vegetative Zellen

Vergleich der Hitzeinaktivierung und Alkoholinaktivierung:

Im Folgenden wurden zwei unterschiedliche Inaktivierungsformen für verbliebene vegetative Zellen mit einer Sporenernte vom 22.02.2008 untersucht, die in Phasenkontrastaufnahmen und digitalen Interferenzsaufnahmen dargestellt sind:

- 1) Hitzeinaktivierung gemäß SOP 156 Bonn (siehe Abbildung 29)
- 2) Alkoholinaktivierung gemäß EN 14347 (siehe Abbildung 30)

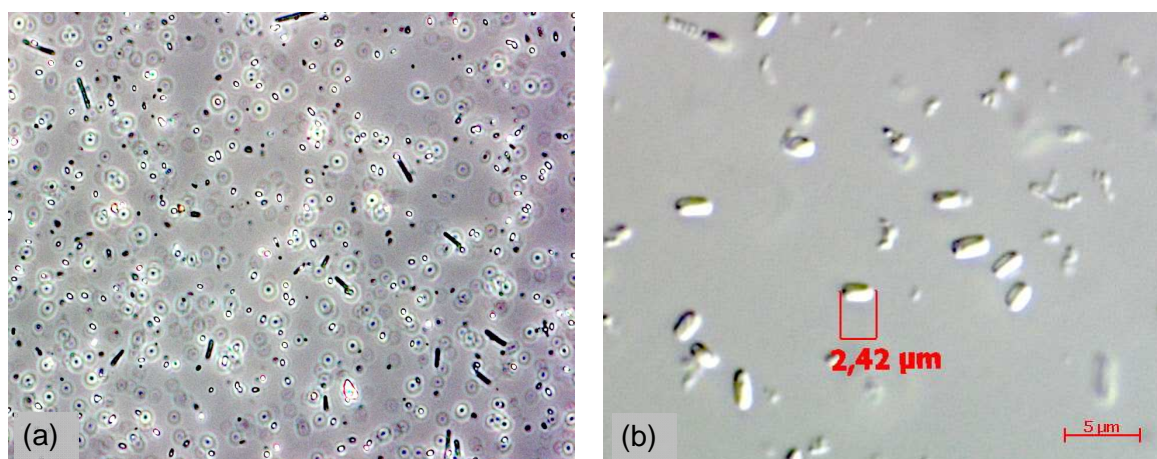


Abbildung 29: Mikroskopische Aufnahme einer *C. difficile* R027 Sporensuspension, Ernte 22.02.2008 (SOP 156 Bonn) Inaktivierung verbliebener vegetativer Formen erfolgte gemäß der Standardarbeitsanweisung mit Hitze bei 80°C für 10 min, (a) Phasenkontrastaufnahme (400fach), (b) Digitale Interferenzaufnahme (1000fach)

Beim Vergleich der mikroskopischen Aufnahmen der hitzeinaktivierten Sporensuspension (Abbildung 29) mit der alkoholinaktivierten Sporensuspension (Abbildung 30) werden deutliche Aggregationen von Sporen bei der Alkoholinaktivierung sichtbar.

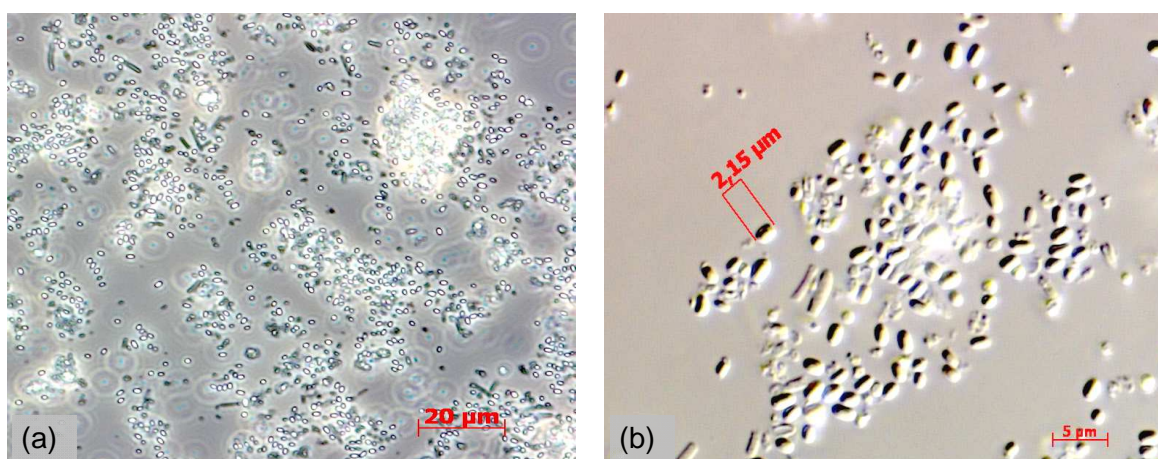


Abbildung 30: Mikroskopische Aufnahme einer *C. difficile* R027 Sporensuspension, Ernte 22.02.2008 (SOP 156 Bonn modifiziert) Inaktivierung verbliebener vegetativer Formen erfolgte gemäß der EN 14347 mit Alkohol (siehe 2.4.2), (a) Phasenkontrastaufnahme (400fach), (b) Digitale Interferenzaufnahme (1000fach)

Einfluss eines Enzymverdaus (Sporensreinigung):

Stichprobenartig wurde der Einfluss eines Enzymverdaus (siehe Kapitel 2.5) geprüft (siehe Abbildung 31), der kürzlich von der Arbeitsgruppe von S. Sattar veröffentlicht wurde [Perez, J. *et al.*, 2011]. Der Reinheitsgrad der Sporensuspension vom 02.02.2009 konnte mit diesem Enzymverdaus von 96% auf 99% gesteigert werden.

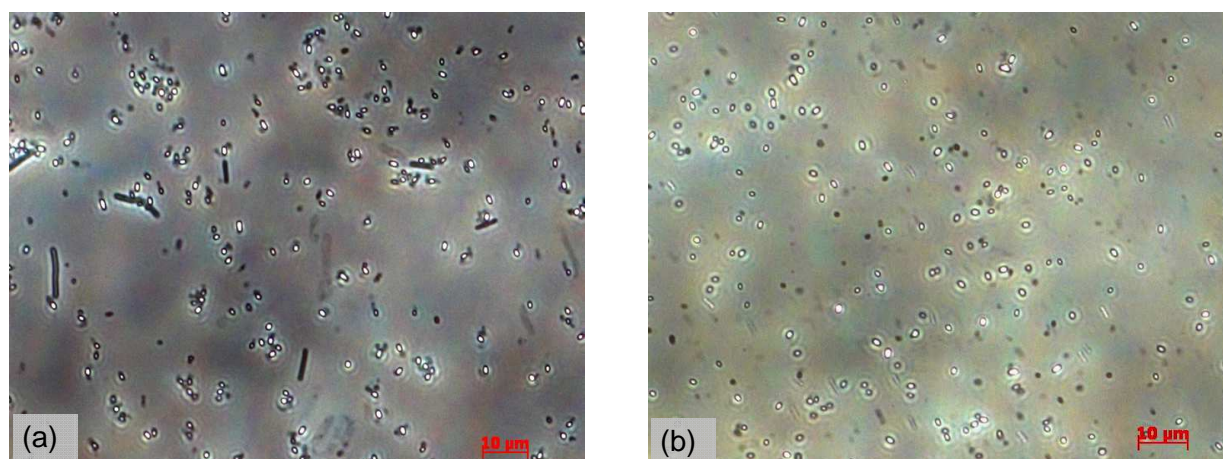


Abbildung 31: Mikroskopische Aufnahme einer *C. difficile* R027 Sporensuspension, Ernte: 02.02.2009 (SOP 156 Bonn) Phasenkontrastaufnahme (400fach) der Sporensuspension (a) vor dem Enzymverdau (b) nach dem Enzymverdau

Vergleich der Agarmedien GSBHI und BHIS:

In der folgenden Tabelle 15 wurde die Wiederfindungsrate germinationsfähiger *C. difficile*-Sporen mit zwei unterschiedlichen Agarmedien, GSBHI- und BHIS- Agar, untersucht (siehe Kapitel 2.1.11). Dabei wurden die Agarmedien mit und ohne Taurocholat (1 g/l) sowie mit und ohne Lysozym (10 mg/l) verwendet. Die höchsten Wiederfindungsraten konnten bei beiden Agarmedien unter Zusatz von Taurocholat (TA) erzielt werden. Ohne Zugabe von Taurocholat lag die Wiederfindungsrate beim GSBHI-Agar, wie bereits erwähnt, um das 100-fache niedriger ($9,70 \times 10^7$ KBE/ml im Vergleich zu $5,21 \times 10^5$ KBE/ml). Bei dem BHIS-Agar war der Unterschied mit und ohne Taurocholat noch gravierender. Ohne Taurocholat wurden $2,68 \times 10^3$ KBE/ml und mit Taurocholat $8,90 \times 10^7$ KBE/ml *C. difficile*-Sporen rekultiviert. Ein Einfluss des Lysozyms konnte ebenfalls dargestellt werden, der sich bei Zugabe von Taurocholat nur geringfügig um etwa 0,5 \log_{10} -Stufen bemerkbar machte. Ohne Zugabe von Taurocholat konnte mit dem GSBHI-Agar, unter Zugabe von Lysozym, mit $5,21 \times 10^5$ KBE/ml eine deutlich höhere Wiederfindung der *C. difficile*-Sporen erzielt werden als mit dem korrespondierenden BHIS-Agar ($2,68 \times 10^3$ KBE/ml).

Tabelle 15: Vergleich verschiedener Agarmedien zur Wiederfindung von *C. difficile*-Sporen

Der Einfluss von Taurocholat (mit und ohne TA) sowie der Einfluss des Lysozyms (*ohne Lysozym) wurden bei zwei verschiedene Agarmedien (GSBHI und BHIS) untersucht. Aufgeführt ist das Erntedatum (Ernte), die koloniebildenden Einheiten pro ml (KBE/ml) die mit dem jeweiligen Medium erzielt wurden.

<i>C. difficile</i> Ribotyp 027				
Ernte	GSBHI ohne TA	GSBHI mit TA	BHIS ohne TA	BHIS mit TA
Datum	KBE/ml	KBE/ml	KBE/ml	KBE/ml
23.08.2008	$5,21 \times 10^5$ $1,13 \times 10^3$ *	$9,70 \times 10^7$ $5,88 \times 10^7$ *	$2,68 \times 10^3$ $2,73 \times 10^3$ *	$8,90 \times 10^7$ $2,42 \times 10^7$ *

* ohne Lysozym

In der folgenden Tabelle 16 werden die Parameter der einzelnen Sporenernten mit dem *C. difficile* Ribotyp 027 dargestellt. Die Ausbeute der Sporen lag mit GSBHI-Agar ohne Taurocholat im Mittel bei $1,69 \times 10^6$ KBE/ml. Unter Zugabe von 1 g/l Taurocholat lag die Ausbeute im Mittel bei $1,59 \times 10^8$ KBE/ml und damit um das 100-fache höher. Die Auszählung in der Thoma-Zählkammer korreliert deutlich besser mit den Werten der Taurocholat-Ansätze und liegt nochmals etwa um den Faktor zehn höher ($1,21 \times 10^9$ KBE/ml). Für die elf Sporensuspensionen konnte im Durchschnitt eine Reinheit von 90% ermittelt werden. Im Vergleich zu den *B. subtilis*-Sporenanreicherungen (siehe Abbildung 23) weisen die *C. difficile*-Anreicherungen, mit Ausnahme der enzymverdauten *C. difficile*-Sporensuspension (siehe Abbildung 31 (b)), vermehrt Zelldebris auf.

Tabelle 16: Parameter zur Bestimmung der Sporensuspensionen des *C. difficile* Ribotyps 027 (SOP 156 Bonn). Aufgeführt sind die Erntedaten (Ernte), die koloniebildenden Einheiten pro ml in GSBHI-Agar ohne Taurocholat (GSBHI ohne TA), GSBHI-Agar mit Taurocholat (GSBHI mit TA), die Gesamtzellzahl der Sporen pro ml (Zählkammer) und der prozentuale Anteil der Sporen (Reinheit) im mikroskopischen Bild.

<i>C. difficile</i> Ribotyp 027				
Ernte Datum	GSBHI ohne TA KBE/ml	GSBHI mit TA KBE/ml	Zählkammer GZZ/ml	Reinheit Sporenananteil
01.10.2007	$1,26 \times 10^6$	n.d.	n.d.	92%
21.11.2007	$1,93 \times 10^6$	n.d.	n.d.	90%
11.12.2007	$1,14 \times 10^6$	n.d.	n.d.	91%
22.02.2008	$1,12 \times 10^6$	n.d.	n.d.	94%
02.05.2008	$7,47 \times 10^6$	n.d.	n.d.	80%
23.08.2008	$5,21 \times 10^5$	$9,70 \times 10^7$	$5,06 \times 10^8$	84%
02.02.2009	$2,09 \times 10^6$	$1,80 \times 10^8$	$2,87 \times 10^8$	96% / $\geq 99\%^*$
06.03.2009	$1,17 \times 10^6$	$4,70 \times 10^8$	$1,98 \times 10^9$	97%
08.09.2009	$6,61 \times 10^4$	$5,59 \times 10^7$	$1,63 \times 10^8$	82%
02.03.2010	$9,55 \times 10^4$	$5,08 \times 10^7$	n.d.	94%
02.08.2010	n.d.	$9,89 \times 10^7$	$3,65 \times 10^8$	94%
Mittelwert	$1,69 \times 10^6$	$1,59 \times 10^8$	$6,60 \times 10^8$	90%

n.d. nicht durchgeführt, * nach Enzymverdau

Die nachstehenden mikroskopischen Bilder zeigen eine Sporenernte des Ribotyps 027 vom 02.08.2010 (siehe Abbildung 32). Parallel zu dieser Anreicherung erfolgte eine Sporenanreicherung mit einem anderen *C. difficile* Ribotyp 027 – einem Patientenisolat des

RKI (siehe Abbildung 33). Beide Isolate zeigten mit der eingesetzten Sporenanreicherung eine gute Sporulation ohne Aggregationsneigung.

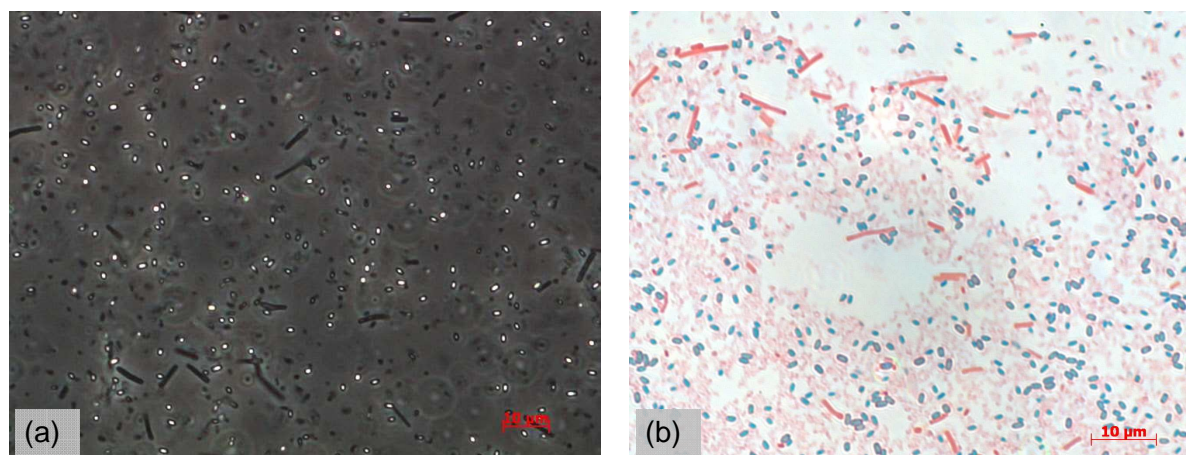


Abbildung 32: Mikroskopische Aufnahme einer *C. difficile* R027 Sporensuspension, Ernte: 02.08.10 (SOP 156 Bonn) (a) Phasenkontrastaufnahme (400fach), (b) Sporenfärbung (1000fach)

3.2.1.2 *C. difficile* Ribotyp 027 RKI

Dieses *C. difficile* R027 Patientenisolat wurde von I. Schwebke vom Robert Koch-Institut (RKI) zur Verfügung gestellt. Mit diesem Isolat sollte geprüft werden, ob die SOP 156 Bonn-Anreicherungsmethode mit einem anderen Isolat des PCR-Ribotyps vergleichbare Sporulationen erzielen kann.

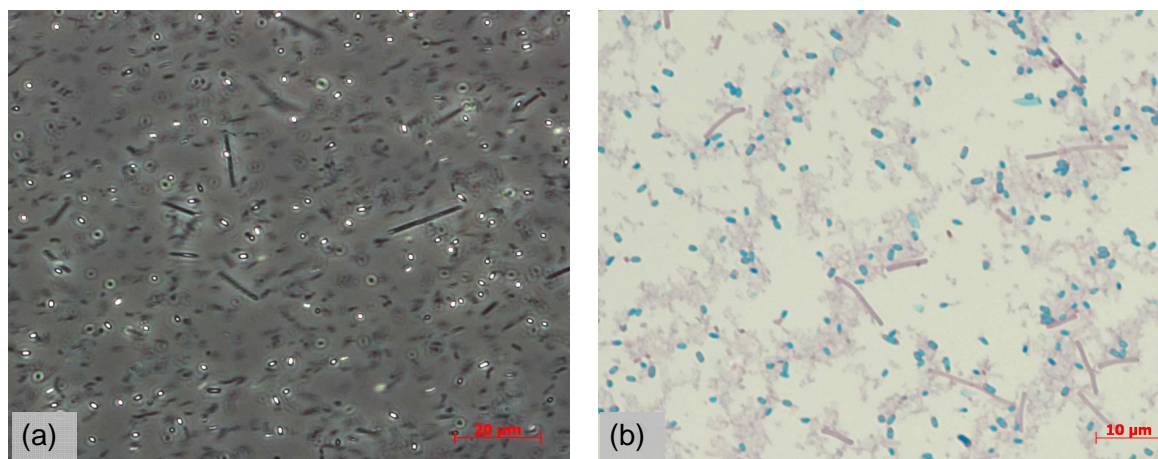


Abbildung 33: Mikroskopische Aufnahme einer *C. difficile* R027 RKI Sporensuspension, Ernte: 02.08.10 (SOP 156 Bonn) (a) Phasenkontrastaufnahme (400fach), (b) Sporenfärbung (1000fach)

Das RKI-Patientenisolat (R027 RKI) zeigte mit einer Reinheit von 91% und einer Sporenausbeute $1,01 \times 10^8$ KBE/ml vergleichbare Resultate wie die im Durchschnitt ermittelten Werte für das Isolat R027 (vergleiche Tabelle 16 und Tabelle 17). Auch die mikroskopischen Bilder veranschaulichen, dass der R027-Stamm des RKI und der R027-Stamm von Labor Centrum Nordhorn (siehe S. 48, Tabelle 10) sich mit der SOP 156 Bonn-Methode vergleichbar gut anreichern lässt (vergleiche Abbildung 32 und Abbildung 33).

Tabelle 17: Parameter zur Bestimmung der Sporensuspensionen des *C. difficile* Ribotyps 027 (Patientenstamm RKI, SOP 156 Bonn). Aufgeführt sind die Erntedaten (Ernte), die koloniebildenden Einheiten pro ml in GSBHI-Agar ohne Taurocholat (GSBHI ohne TA), GSBHI-Agar mit Taurocholat (GSBHI mit TA), die Gesamtzellzahl der Sporen pro ml (Zählkammer) und der prozentuale Anteil der Sporen (Reinheit) im mikroskopischen Bild.

<i>C. difficile</i> Ribotyp 027 (RKI)				
Ernte	GSBHI ohne TA	GSBHI mit TA	Zählkammer	Reinheit
Datum	KBE/ml	KBE/ml	GZZ/ml	Sporenanteil
02.08.2010	n.d.	1,01 x 10 ⁸	n.d.	91%

n.d. nicht durchgeführt

3.2.1.3 *C. difficile* Ribotyp 001

Der *C. difficile* Ribotyp 001 ist eine weitere häufig auftretende Erregervariante, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde. Beim Ribotyp 001 handelt es sich um ein Patientenisolat aus Deutschland, dass vom Labor Nordzentrum zur Verfügung gestellt wurde. Die mikroskopischen Aufnahmen zeigen, dass die Anreicherung mit dieser Erregervariante Ribotyp 001 im Vergleich mit der hypervirulenten Erregervariante R027 zu einem deutlich höheren Anteil vegetativer Formen führt.

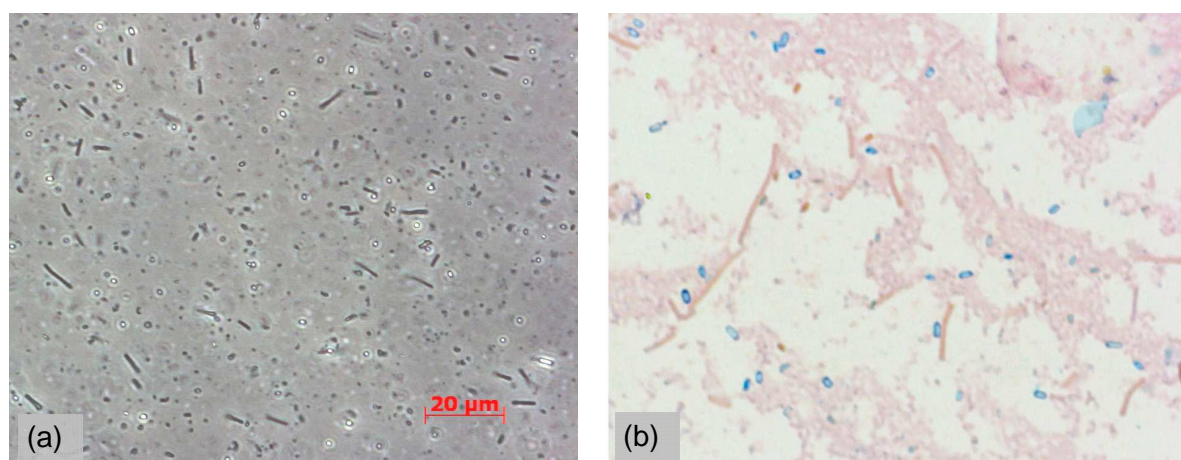


Abbildung 34: Mikroskopische Aufnahme einer *C. difficile* R001 Sporensuspension, Ernte: 13.09.07 (SOP 156 Bonn), (a) Phasenkontrastaufnahme (400fach), (b) Sporenfärbung (1000fach)

In den mikroskopischen Untersuchungen konnten im Mittel ein Sporenanteil von maximal 79% nachgewiesen werden (siehe Tabelle 18). Der Unterschied der KBE/ml mit GSBHI-Agar ohne und mit Taurocholat war mit ca. 2 log₁₀-Stufen mit dem Ribotyp 027 vergleichbar (siehe Tabelle 16 und Tabelle 18).

Tabelle 18: Parameter zur Bestimmung der Sporensuspensionen des *C. difficile* Ribotyps 001 (SOP 156 Bonn). Aufgeführt sind die Erntedaten (Ernte), die koloniebildenden Einheiten pro ml in GSBHI-Agar ohne Taurocholat (GSBHI ohne TA), GSBHI-Agar mit Taurocholat (GSBHI mit TA), die Gesamtzellzahl der Sporen pro ml (Zählkammer) und der prozentuale Anteil der Sporen (Reinheit) im mikroskopischen Bild.

<i>C. difficile</i> Ribotyp 001				
Ernte	GSBHI ohne TA	GSBHI mit TA	Zählkammer	Reinheit
Datum	KBE/ml	KBE/ml	GZZ/ml	Sporenanteil
13.09.2007	$3,00 \times 10^6$	$1,11 \times 10^8$	n.d.	79%

n.d. nicht durchgeführt

3.2.1.4 *C. difficile* Ribotyp 046

Bei der Erregervariante Ribotyp 046 handelt es sich ebenfalls um ein Patientenisolat aus Deutschland, das vom Labor Nordzentrum zur Verfügung gestellt wurde. Dieses Patientenisolat sporulierte mit der SOP 156 Bonn deutlich besser, als die Erregervariante Ribotyp 001 und zeigte kaum vegetative Formen im mikroskopischen Bild (siehe Abbildung 35).

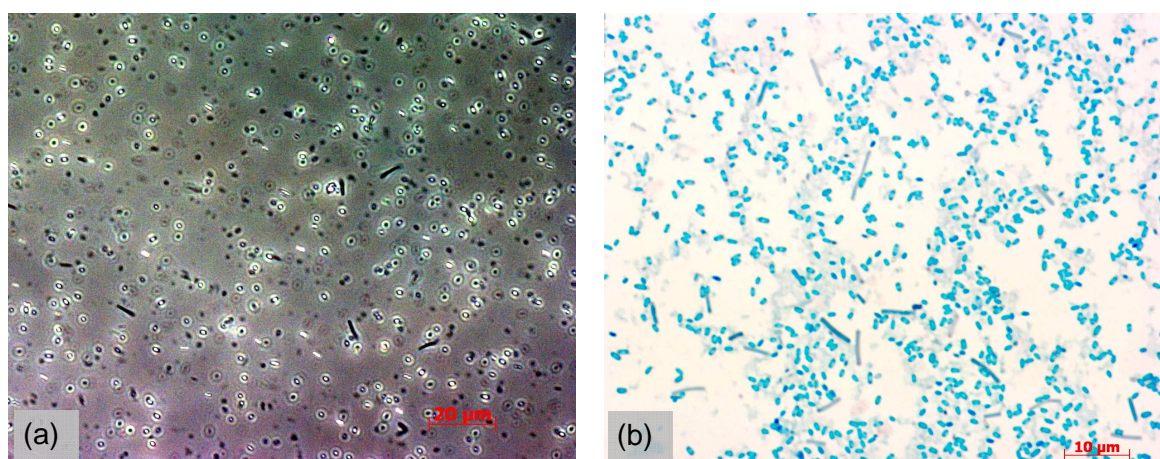


Abbildung 35: Mikroskopische Aufnahme einer *C. difficile* R046 Sporensuspension, Ernte: 11.12.07 (SOP 156 Bonn), (a) Phasenkontrastaufnahme (400fach) (b) Sporenfärbung (1000fach)

Die Sporensuspension mit dem Ribotyp 046 wies eine Reinheit von 94% auf. Die Sporenausbeute lag bei dieser Erregervariante um etwa eine Zehnerpotenz höher als bei dem hypervirulenten Ribotyp 027 (vergleiche Tabelle 16 und Tabelle 19). Das Verhältnis der Wiederfindungsrate der Sporen auf GSBHI-Agar ohne und mit Taurocholat korreliert mit den Ergebnissen der Erregervarianten R027 und R001 (siehe Tabelle 16 und Tabelle 18).

Tabelle 19: Parameter zur Bestimmung der Sporensuspensionen des *C. difficile* Ribotyps 046 (SOP 156 Bonn). Aufgeführt sind die Erntedaten (Ernte), die koloniebildenden Einheiten pro ml in GSBHI-Agar ohne Taurocholat (GSBHI ohne TA), GSBHI-Agar mit Taurocholat (GSBHI mit TA), die Gesamtzellzahl der Sporen pro ml (Zählkammer) und der prozentuale Anteil der Sporen (Reinheit) im mikroskopischen Bild.

<i>C. difficile</i> Ribotyp 046				
Ernte	GSBHI ohne TA	GSBHI mit TA	Zählkammer	Reinheit
Datum	KBE/ml	KBE/ml	GZZ/ml	Sporenanteil
11.12.2007	$1,50 \times 10^7$	$9,55 \times 10^8$	$5,55 \times 10^9$	94%

n.d. nicht durchgeführt

3.2.1.5 *C. difficile* ATCC 9689 (DSM 1296)

Ein Laborstamm *C. difficile* ATCC 9689 (DSM 1296) wurde ebenfalls zur Sporenanreicherungen herangezogen. Die Sporulationsfähigkeit des Laborstamms ist im Vergleich zu den Wildtypstämmen Ribotyp 027 (R027) und Ribotyp 046 (R046) niedriger.

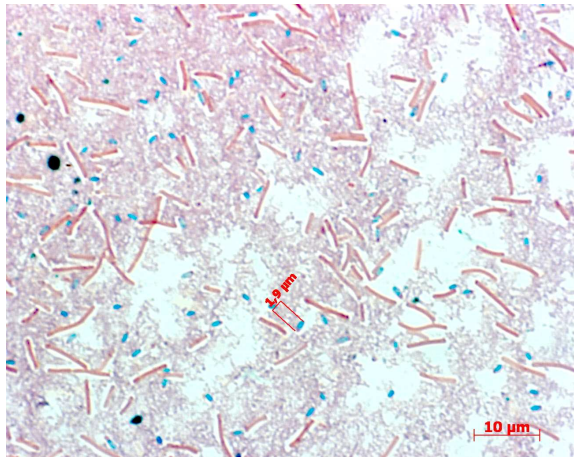


Abbildung 36: Mikroskopische Aufnahme einer *C. difficile* ATCC 9689 Sporensuspension, Ernte: 11.12.07 (SOP 156 Bonn)
Sporenfärbung (1000fach), blau = Sporen; rot = vegetative Zellen

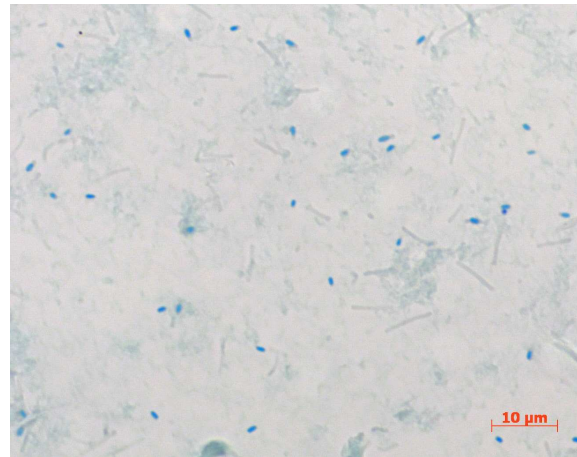


Abbildung 37: Mikroskopische Aufnahme einer *C. difficile* ATCC 9689 Sporensuspension, Ernte: 21.11.09 (SOP 156 Bonn)
Sporenfärbung (1000fach), blau = Sporen; rot = vegetative Zellen

Wie aus Tabelle 20 ersichtlich lag der Anteil der Sporen im Vergleich zu den Wildtypstämmen R027 und R046 (siehe Tabelle 16 und Tabelle 19), mit 61% und 54% deutlich unterhalb von 80%. Auffällig ist das Verhältnis der KBE/ml bei GSBHI-Agar ohne und mit Taurocholat, da hier maximal eine statt zwei Zehnerpotenzen zwischen den Wiederfindungsraten liegen.

Tabelle 20: Parameter zur Bestimmung der Sporensuspensionen des *C. difficile* ATCC 9689 (SOP 156 Bonn). Aufgeführt sind die Erntedaten (Ernte), die koloniebildenden Einheiten pro ml in GSBHI-Agar ohne Taurocholol (GSBHI ohne TA), GSBHI-Agar mit Taurocholol (GSBHI mit TA), die Gesamtzellzahl der Sporen pro ml (Zählkammer) und der prozentuale Anteil der Sporen (Reinheit) im mikroskopischen Bild.

<i>C. difficile</i> ATCC 9689				
Ernte	GSBHI ohne TA KBE/ml	GSBHI mit TA KBE/ml	Zählkammer GZZ/ml	Reinheit Sporenteil
11.12.2007	$8,80 \times 10^5$	n.d.	n.d.	61%
21.11.2009	$3,13 \times 10^6$	$1,95 \times 10^7$	n.d.	54%

n.d. nicht durchgeführt

3.2.2 Sporenanreicherung nach RKI-Methode

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Sporenuuntersuchungen aufgeführt, die entsprechend der Anreicherungs-methode nach RKI (siehe S. 57, Kapitel 2.4.6) ermittelt wurden.

3.2.2.1 *C. difficile* Ribotyp 027

In Abbildung 38 wird das mikroskopische Bild der Sporenteile mit dem *C. difficile* R027-Stamm und der Anreicherung nach RKI dargestellt. Deutlich zu erkennen ist, dass der Anteil an Sporen im Vergleich zur Anreicherung nach SOP 156 Bonn niedriger, dagegen der Anteil an vegetativen Formen höher ausfiel (vergleiche Abbildung 32 und Abbildung 38). Dies wird auch nach Auswertung der Koloniezahl (KBE/ml) deutlich, bei der unabhängig vom Nährmedium (BHA, GSBHI mit oder ohne TA) eine maximale Sporenausbeute von $2,4 \times 10^6$ KBE/ml ermittelt werden konnte. Auffällig ist, dass die Zugabe von Taurocholol keinen erhöhten kulturellen Nachweis erbrachte (vergleiche Kapitel 3.2.1.1). Der ermittelte Sporenteil lag bei 78% (siehe Tabelle 21).

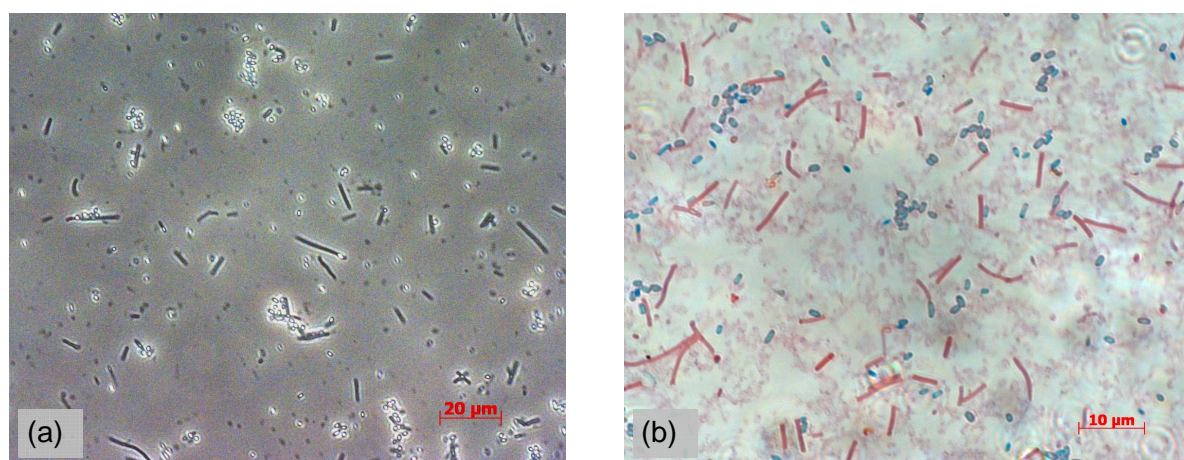


Abbildung 38: Mikroskopische Aufnahme einer *C. difficile* R027 Sporensuspension, Ernte: 02.11.10 (RKI-Methode) (a) Phasenkontrastaufnahme (400fach), (b) Sporenfärbung (1000fach)

Tabelle 21: Parameter zur Bestimmung der Sporensuspensionen des *C. difficile* Ribotyp 027 (RKI-Methode). Aufgeführt sind die Erntedaten (Ernte), die koloniebildenden Einheiten pro ml in Brain Heart Agar (BHA), GSBHI-Agar ohne Taurocholol (GSBHI ohne TA), GSBHI-Agar mit Taurocholol (GSBHI mit TA), die Gesamtzellzahl der Sporen pro ml (Zählkammer) und der prozentuale Anteil der Sporen (Reinheit) im mikroskopischen Bild.

<i>C. difficile</i> Ribotyp 027					
Ernte	BHA	GSBHI ohne TA	GSBHI mit TA	Zählkammer	Reinheit
Datum	KBE/ml	KBE/ml	KBE/ml	GZZ/ml	Sporenanteil
02.11.2010	$1,50 \times 10^6$	$1,10 \times 10^6$	$2,40 \times 10^6$	$2,69 \times 10^8$	78%

3.2.2.2 *C. difficile* ATCC 9689 (DSM 1296)

Vergleichend wurde auch der *C. difficile* Laborstamm (ATCC 9689 = DSM 1296) mit der RKI-Methode zur Sporulation gebracht.

Die mikroskopischen Präparate zeigten sehr geringe Sporenausbeuten. Der Sporenanteil der Ernte vom 02.11.2010 lag bei etwa 22% (siehe Abbildung 39, Abbildung 40 und Tabelle 22). Wie bei der RKI-Anreicherung mit Ribotyp 027 (siehe Kapitel 3.2.2.1) konnte auch hier kein verbesserter kultureller Nachweis durch Zugabe von Taurocholol erzielt werden

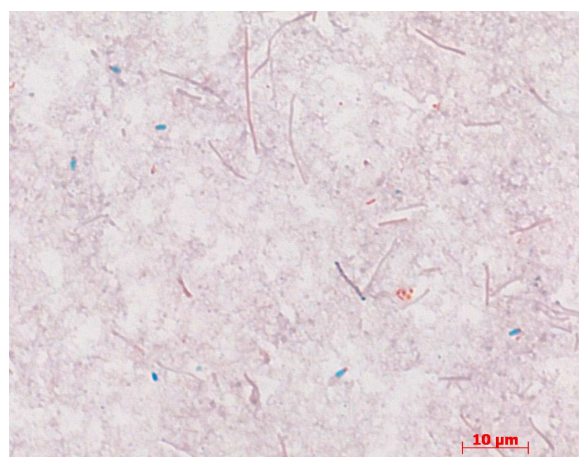


Abbildung 39: Mikroskopische Aufnahme einer *C. difficile* ATCC 9689 Sporensuspension, Ernte: 22.09.09 (RKI-Methode)
Phasenkontrastaufnahme (400fach)

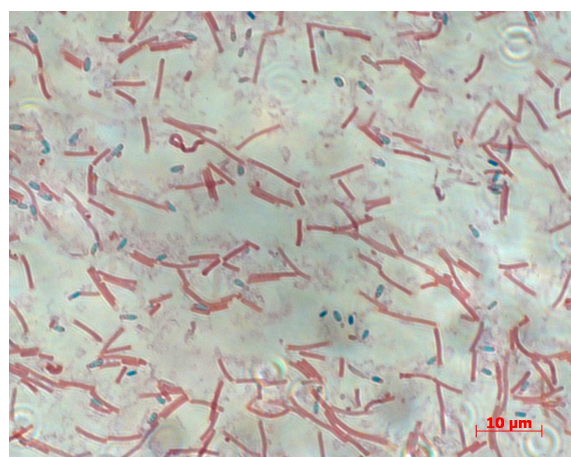


Abbildung 40: Mikroskopische Aufnahme einer *C. difficile* ATCC 9689 Sporensuspension, Ernte: 02.11.10 (RKI-Methode)
Phasenkontrastaufnahme (400fach)

Tabelle 22: Parameter zur Bestimmung der Sporensuspensionen des *C. difficile* ATCC 9689 (RKI-Methode). Aufgeführt sind die Erntedaten (Ernte), die koloniebildenden Einheiten pro ml in Brain Heart Agar (BHA), GSBHI-Agar ohne Taurocholol (GSBHI ohne TA), GSBHI-Agar mit Taurocholol (GSBHI mit TA), die Gesamtzellzahl der Sporen pro ml (Zählkammer) und der prozentuale Anteil der Sporen (Reinheit) im mikroskopischen Bild.

<i>C. difficile</i> ATCC 9689					
Ernte	BHA	GSBHI ohne TA	GSBHI mit TA	Zählkammer	Reinheit
Datum	KBE/ml	KBE/ml	KBE/ml	GZZ/ml	Sporenanteil
22.09.2009	n.d.	$3,92 \times 10^5$	$8,78 \times 10^5$	n.d.	n.d.
02.11.2010	$1,90 \times 10^6$	$6,10 \times 10^5$	$1,30 \times 10^6$	$6,13 \times 10^7$	22%

n.d. nicht durchgeführt

3.3 Testung mit Standardsubstanzen

3.3.1 *B. subtilis*-Sporen

3.3.1.1 Quantitativer Suspensionsversuch (Phase 2, Stufe 1)

Um die Eignung unterschiedlicher Sporensuspensionen für den Einsatz als Indikatororganismen bei der Desinfektionsmitteltestung beurteilen zu können, bietet sich der quantitative Suspensionsversuch ohne organische Belastung an. Dabei werden mit festen Einwirkzeiten die chemischen Widerstandsfähigkeiten unterschiedlicher Sporenanreicherungen und unterschiedlicher Sporensuspensionen mit Standardsubstanzen getestet (siehe Kapitel 2.5, S. 59). In dieser Arbeit wurden als Standardsubstanzen Glutaraldehyd und Peressigsäure eingesetzt. Im Folgenden werden die vergleichenden Untersuchungen mit *B. subtilis*-Sporen dargestellt.

In Abbildung 41 ist die Inaktivierungskinetik von *B. subtilis*-Sporen im quantitativen Suspensionsversuch mit Glutaraldehyd ohne organische Belastung dargestellt. Verglichen wurden zwei unterschiedlich alte Sporensuspensionen vom 23.08.2010 und 14.11.2006, die gemäß SOP 156 Bonn hergestellt wurden. Eine Sporenanreicherung vom 24.11.2006, die gemäß EN 13704 erfolgte, wurde ebenfalls mit der Kinetik der SOP Bonn-Ernten verglichen. Als Einwirkzeit wurde 30 min und 60 min und ein Konzentrationsband von 3-10% gewählt.

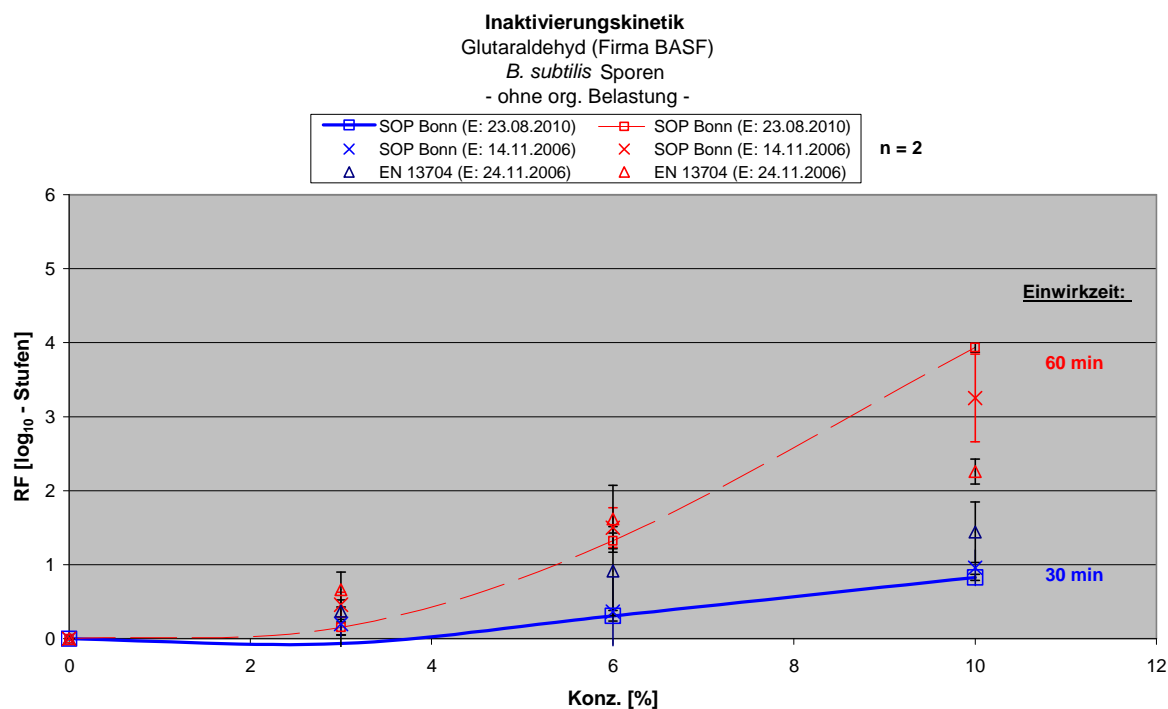


Abbildung 41: Inaktivierungskinetik von *B. subtilis* ATCC 6633-Sporensuspensionen
Reduktion in log₁₀-Stufen im Phase 2-Stufe 1-Test in Abhängigkeit der Glutaraldehyd-Konzentration ohne organische Belastung bei einer Einwirkzeit von 30 und 60 min. Anreicherung erfolgte nach SOP 156 Bonn (Sporenalter ~ drei Monate und ~ vier Jahre) und EN 13704 (Sporenalter ~ vier Jahre).

Glutaraldehyd bewirkte bei den getesteten Sporensuspensionen und einer Einwirkzeit von 30 min, unabhängig vom Alter (vier Monate oder Jahre) und der Anreicherungsart (SOP 156 Bonn oder EN 13704) sehr geringe Reduktionen. Nachweisbare Reduktionen wurden erst ab Konzentrationen von 3% und einer Einwirkzeit von 30 min erzielt. Die Verdopplung der Glutaraldehyd-Konzentration auf 6% resultierte in Reduktionen die im Mittel um 0,5 \log_{10} -Stufen lagen und sich bei einer weiteren Konzentrationserhöhung auf 10% auf einen Wert im Mittel unter 1 \log_{10} -Stufe beliefen. Dabei zeigten sich die Sporen entsprechend EN 13704 sowohl bei 3%, 6% und 10% geringfügig sensibler als die nach SOP 156 Bonn angereicherten Sporen. Eine Verdopplung der Einwirkzeit auf 60 min führte bei gleichen Konzentrationen zu deutlich erhöhten Reduktionen. So wurden bei einer Konzentration von 3% im Mittel Reduktionen um $> 0,5 \log_{10}$ -Stufen, bei 6% im Mittel um 1,5 \log_{10} - und bei 10% im Mittel um 3 \log_{10} -Stufen festgestellt. Bei der höchsten Konzentration konnten die nach EN 13704 angereicherten Sporen lediglich um die 2,2 \log_{10} reduziert werden. Bei der gleichen Konzentration (10%) wird auch ein Unterschied zwischen den vier Monate und vier Jahre alten SOP 156 Bonn Sporen deutlich. Liegt der RF der alten Sporen bei 3,2 \log_{10} , so kann für die relativ junge Sporensuspension (4 Monate) ein RF bis zur Nachweisgrenze von 4 \log_{10} -Stufen festgestellt werden.

In Abbildung 42 ist die Inaktivierungskinetik von *B. subtilis*-Sporen im quantitativen Suspensionsversuch mit Peressigsäure ohne organische Belastung dargestellt. Verglichen wurden vier verschiedene Sporensuspensionen unterschiedlichen Alters, die auf drei verschiedenen Sporenerzeugungsverfahren (SOP 156 Bonn, OECD und EN 13704) beruhten. Basierend auf den Untersuchungen mit den Sporensuspensionen gemäß SOP Bonn vom 23.08.2010 (vier Monate alt) und 14.11.2006 (vier Jahre alt) wurde eine Inaktivierungskinetik erstellt, die für vergleichende Untersuchungen mit den Sporensuspensionen gemäß OECD vom 23.08.2010 (vier Monate alt) und EN 13704 vom 24.11.2006 (vier Jahre alt) herangezogen wurde. Als Einwirkzeit wurde, wie bei den *C. difficile*-Sporen, 15 min und ein Konzentrationsband von 0,01-0,1% gewählt. In der Regel erfolgte bereits bei einer Konzentration von 0,05% Peressigsäure eine Reduktion bis zur Nachweisgrenze. Im Einzelfall konnte bei der SOP Bonn-Sporenernte vom 23.08.2010 nur bis zu zwei Kolonien im Testansatz wieder gefunden werden.

Bei Vergleich der unterschiedlichen SOP 156 Bonn Sporen wurden für die älteren Sporen bei 0,025% zunächst geringere, bei 0,04% dagegen jedoch um 1 \log_{10} -Stufe höhere Reduktionen festgestellt. Insgesamt wurde bei beiden Sporenernten bei etwa 0,05% die Nachweisgrenze mit $\geq 3,8 \log_{10}$ -Stufen erreicht. Bei Betrachtung der OECD und EN 13704 Sporen fällt auf, dass auch diese bei Werten von 0,025% bzw. 0,04% geringfügig höhere Reduktionen darstellen als die SOP 156 Bonn Sporen.

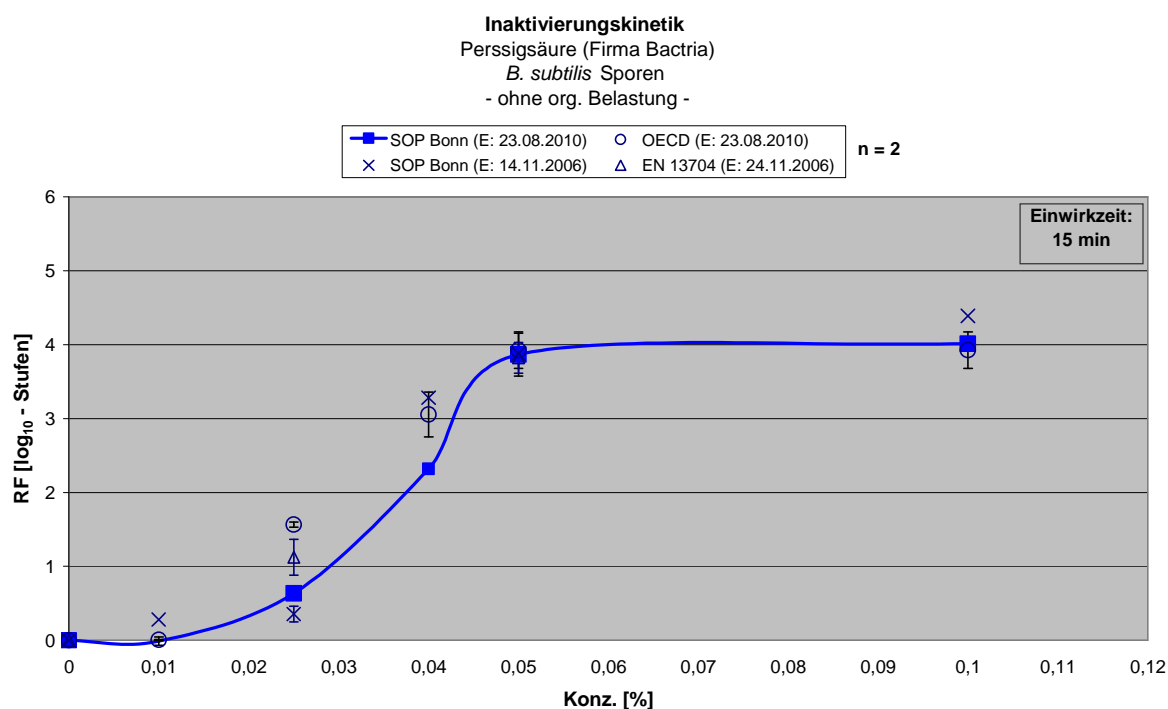


Abbildung 42: Inaktivierungskinetik von *B. subtilis* ATCC 6633 und 19659-Sporensuspensionen
 Reduktion in log₁₀-Stufen im Phase 2-Stufe 1-Test in Abhängigkeit der Peressigsäure-Konzentration ohne organische Belastung bei einer Einwirkzeit von 15 min. Anreicherung erfolgte nach SOP 156 Bonn (Sporenalter ~ drei Monate und ~ vier Jahre, Stamm ATCC 6633), OECD (Sporenalter ~ drei Monate, Stamm ATCC 19659) und EN 13704 (Sporenalter ~ vier Jahre, Stamm ATCC 6633).

Im Rahmen der europäischen Normierung wurde in einem vergleichenden Ringversuch der SpoTG die Eignung unterschiedlicher Sporenanreicherungen in unterschiedlichen Laboratorien (12 teilnehmende Laboratorien) untersucht und gegenüber Standardsubstanzen (Glutaraldehyd und Peressigsäure) auf ihre Widerstandsfähigkeit bzw. Reproduzierbarkeit der Ergebnisse hin überprüft. Jedes Labor sollte im Rahmen dieser Studie 2 vorgegebene Anreicherungsverfahren durchführen und entsprechend prüfen. Zu jeder Anreicherungsart wurden somit von sechs Laboratorien Ergebnisse erzielt.

In der folgenden Tabelle 23 werden die Ergebnisse für Glutaraldehyd mit *B. subtilis*-Sporen entsprechend unterschiedlicher Sporenanreicherungen angereichert nach EN 13704, EN 14347, OECD bzw. SOP 156 Bonn, dargestellt. Für die OECD Anreicherung wurde entsprechend der Anreicherungsanweisung ein anderer *B. subtilis*-Stamm (ATCC 19659) eingesetzt. Als Einwirkzeiten wurden 15 min und 30 min und als Konzentrationen 1% und 3% gewählt. Diese ausgewählten Konzentrations-Zeit-Relationen lehnten sich an die Empfehlungen des Basistests (Phase 1, Stufe 1 Test) zur Validierung der Sporensuspension gemäß EN 14347 [CEN, 2005]. Alle Versuche erfolgten ohne organische Belastung.

Im Rahmen dieser Studie wurden Ergebnisse für die Anreicherungsverfahren nach OECD bzw. SOP 156 Bonn durchgeführt. Die komplette Auswertung des Ringversuches erfolgte in Bonn. Diese Ergebnisse sind noch nicht veröffentlicht und werden mit Einverständnis des Convenors der WG1, Herrn Dr. J. Gebel, hier zusammenfassend aufgeführt.

Die aufgeführten Werte in den jeweiligen Zusammenfassungen (Tabelle 23 und Tabelle 24) beruhen auf 11-17 verwertbaren Einzeluntersuchungen (n= 11-17).

Bei Betrachtung der 15 min-Werte (siehe Tabelle 23) konnte für Wirkstoffkonzentrationen von 1% bei keiner der geprüften Sporenanreicherungen eine Reduktion > 0,05 log₁₀-Stufen erzielt werden. Erst mit 3% wurden messbare Ergebnisse erreicht. Bei einer Konzentration von 3% zeigt sich die Anreicherung nach SOP 156 Bonn mit einem RF von 0,01 log₁₀-Stufen mit den resistentesten Sporen gefolgt von der OECD-Anreicherung mit 0,23 log₁₀-Stufen, der EN 14347- mit 0,7 log₁₀-Stufen und der EN 13704-Anreicherung mit 1,19 log₁₀-Stufen. Bei Betrachtung der Standardabweichung fällt auf, dass die EN 13704 mit einer Standardabweichung von 2,18 log₁₀-Stufen deutlich über den Varianzen der anderen Verfahren mit einer Standardabweichung um 1 log₁₀-Stufen liegt. Unter Berücksichtigung der 30 min-Werte stellt sich auch für die Testung mit 1% eine Vergleichsmöglichkeit dar. Wie schon bei den kürzeren Einwirkzeiten, zeigen hier die SOP 156 Bonn-Sporen vor den OECD-Sporen, EN 14347 und EN 13704 die geringsten Reduktionen. Mit einer Konzentrations-Zeit-Relation von 3% - 30 min wird diese Beobachtung wiederum bestätigt. Gleiches gilt für die Streuung der Ergebnisse. Auch hier zeigen sich die Sporen nach EN 13704 mit einer Standardabweichung von 2,41 log₁₀-Stufen mit deutlich variableren Ergebnissen, wobei auch die OECD-Sporen in diesem Fall mit einer Standardabweichung von 1,74 log₁₀-Stufen größeren Schwankungen unterliegen.

Bei allen geprüften Konzentrations-Zeit-Relationen werden mit den SOP 156 Bonn-Sporen Reduktionen unter 0,1 log₁₀-Stufen erzielt. Dieser Wert liegt deutlich unter den Werten die im Vergleich mit den EN 13704-Sporen erzielt wurden und spricht somit für eine deutlich höhere Resistenz der SOP 156 Bonn-Sporen gegenüber Glutaraldehyd.

Tabelle 23: Widerstandsfähigkeit von *B. subtilis*-Sporen unterschiedlicher Sporenanreicherungen gegenüber Glutaraldehyd (SpoTG-Ringversuch).

Aufgeführt sind die Sporenanreicherungen (EN 13704, EN 14347, OECD, SOP 156 Bonn) mit dem verwendeten *B. subtilis* Stamm (ATCC), die erzielten Reduktionsfaktoren (RF) und Standardabweichungen (Stabw) der untersuchten Konzentrations-Zeit-Relationen von Glutaraldehyd im quantitativen Suspensionsversuch ohne organische Belastung. Die Standardabweichungen resultieren aus 11- 17 Einzeluntersuchungen. Der Nachweis der *B. subtilis*-Sporen erfolgte jeweils in Trypton-Soja Agar (TSA).

<i>B. subtilis</i>									
Glutaraldehyd (Fa. Lysoform)		EN 13704		EN 14347		OECD		SOP Bonn	
Einwirkzeit (min)	Konz. (%)	ATCC 6633		ATCC 6633		ATCC 19659		ATCC 6633	
		RF	Stabw	RF	Stabw	RF	Stabw	RF	Stabw
15	1	0,01	0,70	-0,14	0,32	0,05	0,53	-0,01	0,14
	3	1,19	2,18	0,70	0,91	0,23	0,93	0,01	0,18
30	1	0,43	1,28	0,26	0,67	0,12	0,66	-0,07	0,20
	3	2,06	2,41	1,89	1,06	0,98	1,74	0,05	0,29

In der folgenden Tabelle 24 sind die Reduktionen (RF) und Standardabweichungen (Stabw) für Peressigsäure bei 15 min und 30 min und einer Konzentration von 0,05% und 0,1% dargestellt. Im Gegensatz zu den Ergebnissen mit Glutaraldehyd stellen sich in diesen Untersuchungen die Sporen nach EN 13704 resistenter dar als die Sporen der anderen Anreicherungsverfahren. Ein Vergleich der Sensitivitäten zwischen EN 14347-, OECD- oder SOP 156 Bonn-Sporen ist nicht möglich, da mit allen Konzentrations-Zeit-Relationen, mit einer Ausnahme (OECD 0,05% - 15 min, RF 5,1) die Nachweisgrenze > 5 log₁₀-Stufen erreicht wurde.

Tabelle 24: Widerstandsfähigkeit von *B. subtilis*-Sporen unterschiedlicher Sporenanreicherungen gegenüber Peressigsäure (SpotG-Ringversuch).

Aufgeführt sind die Sporenanreicherungen (EN 13704, EN 14347, OECD, SOP 156 Bonn) mit dem verwendeten *B. subtilis* Stamm (ATCC), die erzielten Reduktionsfaktoren (RF) und Standardabweichungen (Stabw) der untersuchten Konzentrations-Zeit-Relationen von Peressigsäure im quantitativen Suspensionsversuch ohne organische Belastung. Die Standardabweichungen resultieren aus 11- 17 Einzeluntersuchungen. Der Nachweis der *B. subtilis*-Sporen erfolgte jeweils in Trypton-Soja Agar (TSA).

<i>B. subtilis</i>									
Peressigsäure (Fa. Bactria)		EN 13704		EN 14347		OECD		SOP Bonn	
Einwirkzeit (min)	Konz. (%)	ATCC 6633		ATCC 6633		ATCC 19659		ATCC 6633	
		RF	Stabw	RF	Stabw	RF	Stabw	RF	Stabw
15	0,05	4,58	1,64	5,75*	0,20	5,10	1,19	5,69*	0,19
	0,1	4,97	1,62	5,75*	0,20	5,39*	0,50	5,69*	0,19
30	0,05	4,94	1,49	5,73*	0,19	5,43*	0,47	5,69*	0,19
	0,1	5,05	1,36	5,73*	0,19	5,43*	0,47	5,69*	0,19

* Nachweisgrenze

3.3.2 *C. difficile*-Sporen

3.3.2.1 Quantitativer Suspensionsversuch (Phase 2, Stufe 1)

Wie schon in Kapitel 3.3.1.1 erwähnt, können die Vergleiche unterschiedlicher Sporenernten eines Anreicherungsverfahrens sowie der Einfluss der Aufbewahrungszeit auf die Sensitivität der geernteten Sporen mit einem quantitativen Suspensionsversuch dargestellt werden. Im Folgenden werden die Ergebnisse mit *C. difficile*-Sporen, die den Schwerpunkt dieser Arbeit darstellen.

In der Tabelle 25 werden zusammengefasste Ergebnisse mit Glutaraldehyd (GA) 1%- 15 min, den korrespondierenden Wasserkontrollen (WSH/KO1) und logarithmierten Werte der Testsuspensionen (Testsusp.) für sechs unterschiedliche Sporenernten aufgeführt. Die Untersuchungen wurden unter hoher organischer Belastung (dirty conditions) durchgeführt. Als Besonderheit ist hier anzumerken, dass dem Agar zu diesem Zeitpunkt noch kein Taurocholat zugeführt wurde. Erst im späteren Verlauf der Studie stellte sich heraus, dass die Zugabe von Taurocholat die Wiederfindungsrate der germinationsfähigen Sporen deutlich verbesserte (siehe Kapitel 3.2.1).

Mit einer Ausnahme wurde Glutaraldehyd der Firma Merck eingesetzt. Die Sporensuspension vom 23.08.2008 wurde sowohl mit Glutaraldehyd der Firma Merck, als auch mit Glutaraldehyd der Firma BASF verglichen. Diese Sporenernte war im Mittel 179 bzw. 174 Tage alt. Ein Unterschied zwischen Glutaraldehyd der Firma Merck und BASF konnte hier, ohne Zugabe von Taurocholat, nicht festgestellt werden. Die ermittelten Reduktionsfaktoren (RF) lag mit 0,74 \log_{10} -Stufen auf dem gleichen Niveau.

Aus Tabelle 25 ist ersichtlich, dass mit Zunahme des Sporenalters niedrigere Reduktionen erzielt wurden. Bei den vorliegenden Untersuchungsergebnissen, ohne Taurocholatzugabe, verringerte sich im Zeitraum von 113 und 179 Tagen die Reduktion von 1,16 \log_{10} -Stufen auf 0,74 \log_{10} -Stufen. Die ermittelten Standardabweichungen (Stabw) lagen unabhängig vom Sporenalter zwischen 0,06 \log_{10} -Stufen bei 30 Tage alten Sporen und im Maximum bei 0,17 \log_{10} -Stufen bei 113 Tage alten Sporen. Die Betrachtung der Wasserkontrollen (WSH/KO1) zeigte ebenfalls ein sehr homogenes Bild mit Standardabweichungen im Maximum von 0,41 \log_{10} -Stufen. Gleiches gilt für die Standardabweichungen der Testsuspensionen.

In Tabelle 25 wird auch ein Vergleich unterschiedlicher Suspensionsversuchen nach EN /DGHM bzw. mit alkoholinaktivierten Sporen dargestellt. Diese vergleichenden Untersuchungen wurden mit Sporenernten vom 22.02.2008 durchgeführt. Insgesamt konnte kein Unterschied in der Chemoresistenz zwischen hitzeinaktivierten und alkoholinaktivierten Sporen bzw. nach EN- oder DGHM-geprüften *C. difficile*-Sporen festgestellt werden. Bei den hitzeinaktivierten Sporen wurde mit der DGHM-Methodik ein RF von 1,74 log₁₀-Stufen und bei den alkoholinaktivierten ein RF von 1,82 log₁₀-Stufen ermittelt. Vergleicht man diese Werte mit dem Testansatz nach EN, wo 2,04 log₁₀-Stufen ermittelt wurden, so zeigt sich die EN-Methodik trotz geringfügig höheren Reduktionsfaktoren vergleichbar.

Tabelle 25: Widerstandsfähigkeit von *C. difficile*-Sporen (R027) unterschiedlicher Erntedaten gegenüber Glutaraldehyd (hohe organische Belastung)

Aufgeführt sind die unterschiedlichen Sporensuspensionen (Erntedatum), die Details der Untersuchung (Testbeschreibung), das Alter der Sporen (Tage), die erzielten Reduktionsfaktoren (RF) inkl. Standardabweichungen (Stabw) der untersuchten Konzentrations-Zeit-Relationen von Glutaraldehyd (GA 1%-15 min) im quantitativen Suspensionsversuch. Die gemittelten Werte der Wasserkontrolle (WSH/KO1) und Testsuspension (Testsusp.) sowie die Anzahl der durchgeführten Untersuchungen (n) sind ebenfalls aufgeführt. Der Nachweis von *C. difficile* erfolgte ohne Taurocholat (TA).

<i>C. difficile</i> Ribotyp 027									
Ernte	Testbeschreibung				Alter der Sporen	GA 1% - 15 min	WSH/KO1	Testsusp. (N)	Anz.
Datum	Methodik	Bel.	Agar	Produkt	Tage (min - max)	RF log ₁₀ ± Stabw (min - max)	log ₁₀ ± Stabw (min - max)	log ₁₀ ± Stabw (min - max)	n
01.10.2007	DGHM	dirty	ohne TA	GA (Merck)	26 (17 - 41)	1,92 ± 0,11 (1,74 bis 2,06)	5,10 ± 0,12 (4,95 bis 5,27)	6,07 ± 0,13 (5,80 bis 6,19)	8
21.11.2007	DGHM	dirty	ohne TA	GA (Merck)	26 (6 - 54)	1,61 ± 0,29 (1,10 bis 2,07)	5,45 ± 0,02 (5,12 bis 5,90)	5,45 ± 0,02 (5,12 bis 5,90)	8
11.12.2007	DGHM	dirty	ohne TA	GA (Merck)	30 (23 - 37)	1,72 ± 0,06 (1,67 u. 1,76)	4,89 ± 0,24 (4,78 u. 5,00)	5,89 ± 0,21 (5,84 u. 5,93)	2
22.02.2008	EN	dirty	ohne TA	GA (Merck)	35 (33 - 36)	2,04 ± 0,21 (1,84 - 2,28)	2,09 ± 0,00	6,15 ± 0,01 (6,16 - 6,15)	4
	DGHM	dirty	ohne TA	GA (Merck)	49 (33 - 74)	1,74 ± 0,22 (1,47 - 2,08)	5,09 ± 0,10 (4,90 - 5,20)	6,03 ± 0,23 (5,65 - 6,18)	8
	DGHM*	dirty	ohne TA	GA (Merck)	107 (74 - 173)	1,82 ± 0,17 (1,85 - 2,16)	5,21 ± 0,07 (5,15 - 5,28)	5,99 ± 0,14 (5,91 - 6,16)	3
02.05.2008	DGHM	dirty	ohne TA	GA (Merck)	113 (4 - 150)	1,69 ± 0,37 (1,25 - 2,21)	5,40 ± 0,41 (4,82 - 5,77)	6,27 ± 0,42 (5,69 - 6,69)	6
23.08.2008	DGHM	dirty	ohne TA	GA (BASF)	174 (143 - 217)	0,74 ± 0,10 (0,60 - 0,88)	4,66 ± 0,24 (4,34 - 4,91)	5,54 ± 0,19 (5,40 - 5,86)	5
	DGHM	dirty	ohne TA	GA (Merck)	179 (109 - 365)	0,74 ± 0,17 (0,475 - 0,97)	4,66 ± 0,24 (4,27 - 4,95)	5,55 ± 0,30 (5,12 - 6,98)	7

* alkoholinaktivierte Sporen

In Tabelle 26 sind die Ergebnisse aus drei unterschiedlichen Sporenernten zusammengefasst. Zu beachten ist, dass dem Agar zu diesem Zeitpunkt, aufgrund der optimaleren Reaktivierbarkeit (siehe Tabelle 16, S.76), stets Taurocholat (TA) zugesetzt wurde. Die unterschiedlichen Anreicherungen wurden mit Glutaraldehyd 1% - 15 min geprüft, wobei Glutaraldehyd der Firma Merck und BASF eingesetzt wurde. Auffällig ist, dass mit Glutaraldehyd von BASF Reduktionen von 0,54 log₁₀-Stufen (08.09.2009) und 0,52 log₁₀-Stufen (23.08.2008) ermittelt wurden, jedoch in den Ansätzen mit Glutaraldehyd der Firma Merck Reduktionen von 1,23 log₁₀-Stufen (06.03.2009) und 1,00 log₁₀-Stufen (23.08.2008) ermittelt wurden. Zwar wurden unterschiedlich alte Sporensuspensionen herangezogen, doch kann dies nicht allein für die unterschiedlichen Resistenzen als Begründung dienen, da beim ersten Vergleich der geringere RF zwar mit einer älteren Sporensuspension korreliert (06.03.2009 im Vergleich 08.09.2009) im zweiten Vergleich jedoch nahezu gleich alte Sporen vom 23.08.2008 (330 Tage zu 350 Tage) den geringeren RF (0,52 log₁₀-Stufen) mit Glutaraldehyd der Firma BASF darstellen. Auch für diese Untersuchungen wurden geringe Standardabweichungen mit maximal 0,28 log₁₀-Stufen dargestellt. Gleiches gilt für die durchgeführten Wasserkontrollen (WSH) bzw. ermittelten Werte für die Testsuspensionen.

Tabelle 26: Widerstandsfähigkeit von *C. difficile*-Sporen (R027) unterschiedlicher Erntedaten gegenüber Glutaraldehyd (hohe organische Belastung).

Aufgeführt sind die unterschiedlichen Sporensuspensionen (Erntedatum), die Details der Untersuchung (Testbeschreibung), das Alter der Sporen (Tage), die erzielten Reduktionsfaktoren (RF) inkl. Standardabweichungen (Stabw) der untersuchten Konzentrations-Zeit-Relationen von Glutaraldehyd (GA 1%-15 min) im quantitativen Suspensionsversuch. Die gemittelten Werte der Wasserkontrolle (WSH/KO1) und Testsuspension (Testsusp.) sowie die Anzahl der durchgeführten Untersuchungen (n) sind ebenfalls aufgeführt. sind ebenfalls aufgeführt. Der Nachweis von *C. difficile* erfolgte mit Taurocholat (TA).

<i>C. difficile</i> Ribotyp 027									
Ernte	Testbeschreibung				Alter der Sporen	GA 1% - 15 min	WSH	Testsusp. (N)	Anz.
Datum	Methodik	Bel.	Agar	Produkt	Tage (min - max)	RF log ₁₀ ± Stabw (min - max)	log ₁₀ ± Stabw (min - max)	log ₁₀ ± Stabw (min - max)	n
06.03.2009	DGHM	dirty	mit TA	GA (Merck)	173 (172 u. 175)	1,23 ± 0,28 (1,03 u. 1,42)	5,93 ± 0,01 (5,92 u. 5,94)	6,79 ± 0,11 (6,71 u. 6,86)	2
08.09.2009	DGHM	dirty	mit TA	GA (BASF)	234 (124 - 342)	0,54 ± 0,15 (0,30 - 0,74)	5,38 ± 0,23 (5,01 - 5,65)	6,13 ± 0,12 (6,00 - 6,28)	6
23.08.2008	DGHM	dirty	mit TA	GA (BASF)	330 (199 - 480)	0,52 ± 0,15 (0,23 - 0,81)	5,42 ± 0,14 (5,27 - 5,63)	6,29 ± 0,20 (6,02 - 6,68)	32
	DGHM	dirty	mit TA	GA (Merck)	355 (344 - 365)	1,00 ± 0,07 (0,96 - 1,05)	5,38 ± 0,10 (5,31 - 5,45)	6,14 ± 0,16 (6,02 - 6,25)	2

Im Vergleich zu den Ergebnissen aus Tabelle 25 und Tabelle 26 sind in Tabelle 27 Ergebnisse mit Testansätzen ohne organische Belastung aufgeführt. Die Untersuchungen erfolgten, wie in Tabelle 26, unter Zugabe von Taurocholat.

Auch in diesem Fall, kann mit der Zunahme des Sporenlalters eine Abnahme der Reduktion beobachtet werden. Die geringsten Reduktionen wurden mit einer Sporensuspension vom 02.02.2009, die insgesamt 625 Tage alt war und einen RF von 0,16 log₁₀-Stufen darstellte, erzielt. Die höchsten Reduktionen wurden mit einer 23 Tage alten Sporensuspension vom 02.08.2010 erreicht, die in diesem Fall bei 2,20 log₁₀-Stufen lag. Auch die Ernte vom 02.03.2010 mit einem Sporenlalter von 40 Tagen wies noch einen relativ hohen Reduktionsfaktor von 1,16 log₁₀-Stufen auf. Bei der Sporenernte vom 23.08.2008 war zwischen den 23 Tage alten Sporen und den 37 Tage alten Sporen eine Auffälligkeit in der Widerstandsfähigkeit zu erkennen. So lag die Reduktion am 23. Tag bei 2,20 log₁₀-Stufen und am im Mittel 95. Tag (37. Tag und 153. Tag) bereits bei 0,69 log₁₀-Stufen. Diese zeigt deutlich eine Stabilitätsveränderung der Sporen in den ersten ca. zwei Monaten (61 Tagen). Insgesamt konnten auch hier sehr homogene Untersuchungsergebnisse mit maximalen Standardabweichungen von 0,21 log₁₀-Stufen (23.08.2008) erzielt werden. Die sehr alte und enzymatisch gereinigte Sporensuspension vom 02.02.2009 (625 Tage alt) wies die geringste Standardabweichung mit 0,03 log₁₀-Stufen auf. Die Standardabweichungen der parallel mitgeführten Wasserkontrollen (WSH) befanden sich in einem Bereich zwischen 0,11 log₁₀- und 0,21 log₁₀-Stufen und korrelierten sehr gut den Standardabweichungen der Testsuspensionen, die zwischen 0,13 log₁₀- und 0,21 log₁₀-Stufen lagen.

Tabelle 27: Widerstandsfähigkeit von *C. difficile*-Sporen (R027) unterschiedlicher Erntedaten gegenüber Glutaraldehyd (ohne organische Belastung).

Aufgeführt sind die unterschiedlichen Sporensuspensionen (Erntedatum), die Details der Untersuchung (Testbeschreibung), das Alter der Sporen (Tage), die erzielten Reduktionsfaktoren (RF) inkl. Standardabweichungen (Stabw) der untersuchten Konzentrations-Zeit-Relationen von Glutaraldehyd (GA 1%-15 min) im quantitativen Suspensionsversuch sind ebenfalls aufgeführt. Die gemittelten Werte der Wasserkontrolle (WSH/KO1) und Testsuspension (Testsusp.) sowie die Anzahl der durchgeführten Untersuchungen (n) . Der Nachweis von *C. difficile* erfolgte mit Taurocholat (TA).

<i>C. difficile</i> Ribotyp 027									
Ernte	Testbeschreibung				Alter der Sporen	GA 1% - 15 min	WSH	Testsusp. (N)	Anz.
Datum	Methodik	Bel.	Agar	Produkt	Tage (min - max)	RF log ₁₀ ± Stabw (min - max)	log ₁₀ ± Stabw (min - max)	log ₁₀ ± Stabw (min - max)	n
02.08.2010	DGHM	ohne	mit TA	GA (BASF)	23 (23 - 23)	2,20 ± 0,24 (2,03 - 2,37)	5,22 ± 0,02 (5,20 - 5,23)	6,55 ± 0,14 (6,45 u. 6,65)	2
02.03.2010	DGHM	ohne	mit TA	GA (BASF)	40	1,16	5,09	6,25	1
02.08.2010	DGHM	ohne	mit TA	GA (BASF)	95 (37 u. 153)	0,69 ± 0,14 (0,61 - 0,78)	5,30 ± 0,16 (5,19 - 5,41)	6,27 ± 0,09 (6,05 u. 6,49)	2
08.09.2009	DGHM	ohne	mit TA	GA (BASF)	281 (124 - 337)	0,95 ± 0,17 (0,84 - 1,19)	5,14 ± 0,18 (4,97 - 5,38)	6,20 ± 0,13 (6,00 u. 6,28)	4
23.08.2008	DGHM	ohne	mit TA	GA (BASF)	336 (405 - 516)	0,83 ± 0,21 (0,69 - 1,07)	5,60 ± 0,11 (5,22 - 5,43)	6,48 ± 0,21 (6,21 - 6,58)	3
02.02.2009	DGHM	ohne	mit TA	GA (BASF)	625 (577 u. 672)	0,16 ± 0,03 (0,14 u. 0,18)	5,25 ± 0,21 (5,10 u. 5,39)	6,23 ± 0,14 (6,13 u. 6,33)	2

In der Abbildung 43 ist die Inaktivierungskinetik von *C. difficile* R027-Sporen mit Glutaraldehyd im quantitativen Suspensionsversuch ohne und mit hoher organischer Belastung dargestellt. Als Einwirkzeit wurde 15 min bei einem Konzentrationsband von 1 - 12% gewählt. Die Kinetik verläuft mit Ausnahme des 1%-Konzentrationswertes, unabhängig von der vorhandenen organischen Belastung, parallel. Dabei fällt auf, dass nach einem anfänglich steilen Anstieg der Reduktion bis zu 2% (ca. 1 log₁₀-Stufe) eine Stagnation der Reduktion bis 4% folgt, um anschließend bis zu einem Reduktionsfaktor (RF) von 4 log₁₀-Stufen die Nachweisgrenze bei 8% erreicht.

Die organische Belastung nimmt bei Glutaraldehyd keinen Einfluss auf den Verlauf der Inaktivierungskinetik. Die maximale Standardabweichung kann mit ± 0,48 unter hoher organischer Belastung bei 4% und einem RF von 1 log₁₀-Stufen festgestellt werden. Im Mittel lag die Standardabweichung bei ± 0,18 log₁₀-Stufen.

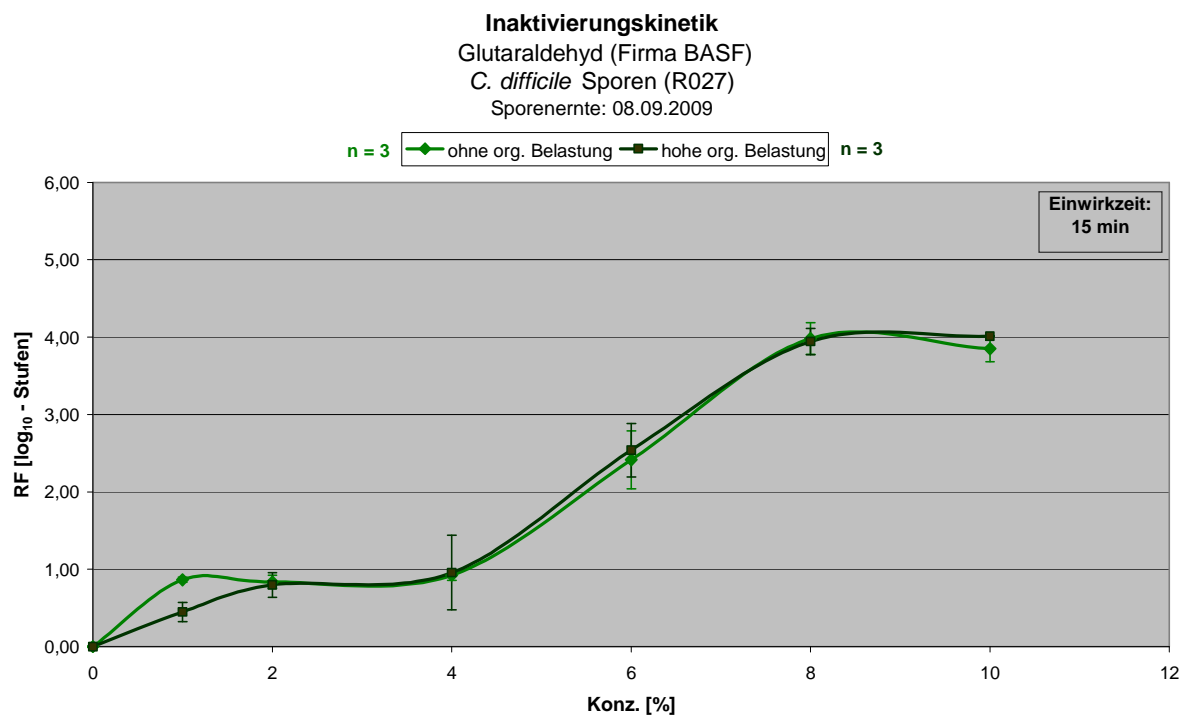


Abbildung 43: Inaktivierungskinetik von *C. difficile* R027-Sporensuspension (SOP 156-Bonn)
 Reduktion in log₁₀-Stufen im Phase 2-Stufe 1-Test in Abhängigkeit der Glutaraldehyd-Konzentration ohne und mit hoher organischer Belastung bei einer Einwirkzeit von 15 min. Alter der Sporensuspension 360 Tage. Nachweis mit Taurocholat.

In der Abbildung 44 ist die Inaktivierungskinetik von *C. difficile* R027-Sporen im quantitativen Suspensionsversuch mit Peressigsäure ohne und mit hoher organischer Belastung dargestellt. Als Einwirkzeit wurde 15 min bei einem Konzentrationsband von 0,05-0,1% gewählt.

Bis zu einer Peressigsäure-Konzentration von 0,01% konnte unabhängig von der organischen Belastung eine maximale Reduktion von 0,15 log₁₀-Stufen erzielt werden. Der Einfluss der organischen Belastung machte sich ab einer Konzentration von 0,025% deutlich. So wird z.B. bei einer Peressigsäure-Konzentration von 0,04% ohne Belastung ein RF von ca. 2,5 log₁₀-Stufen und mit hoher organischer Belastung von knapp über 1 log₁₀-Stufe erreicht. Die Nachweisgrenze von 4 log₁₀-Stufen wird ohne Belastung mit 0,05% und mit hoher organischer Belastung bei 0,06% erreicht. Die maximale Standardabweichung lag bei 0,37 log₁₀-Stufen und die gemittelte Abweichung bei 0,12 log₁₀-Stufen.

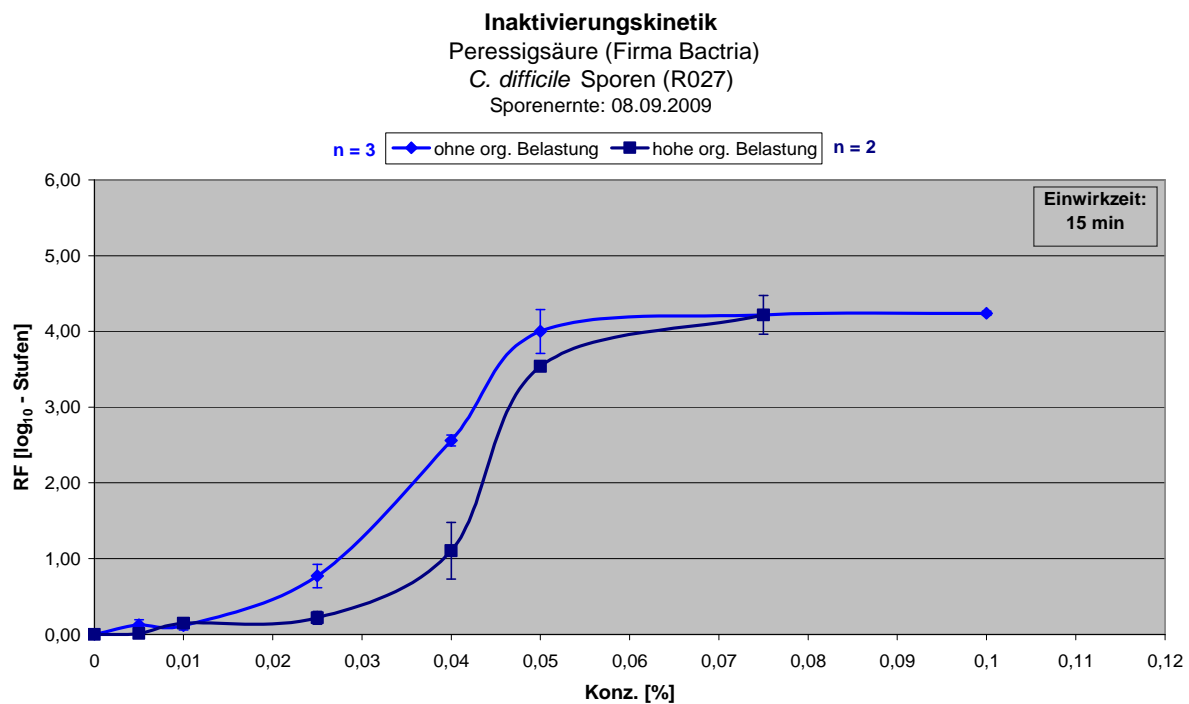


Abbildung 44: Inaktivierungskinetik von *C. difficile* R027-Sporensuspension (SOP-156 Bonn). Reduktion in log₁₀-Stufen im Phase 2-Stufe 1-Test in Abhängigkeit der Peressigsäure-Konzentration ohne und mit hoher organischer Belastung bei einer Einwirkzeit von 15 min. Alter der Sporensuspension 360 Tage. Nachweis mit Taurocholat.

3.3.3 Desinfektionsmittel

Insgesamt wurden 27 Desinfektionsmittel gegenüber Sporen von *C. difficile* im quantitativen Suspensionsversuch überprüft. Das Hauptaugenmerk lag dabei auf dem praxisrelevanten Hyperendemiestamm *C. difficile* Ribotyp 027. Parallel zu diesem Stamm wurden stichprobenartig Untersuchungen gegenüber Sporen von *C. difficile* Ribotyp 001, *C. difficile* ATCC 9689 und *B. subtilis* ATCC 6633 durchgeführt, um mögliche Chemoresistenzunterschiede darstellen zu können. Die *C. difficile*- und *B. subtilis*-Sporen wurden dabei gemäß der SOP Bonn-Methoden angereichert. Bei den aufgeführten Untersuchungsergebnissen zu *C. difficile* ATCC 9689 handelt es sich um Vorwerte aus einer parallel laufenden medizinischen Doktorarbeit von Herrn O. Koch. In den nachstehenden Tabellen werden die Ergebnisse zusammengefasst vorgestellt. Die Tabellen geben zum einen eine Übersicht über die geprüften Wirkstoffgruppen und die finalen Wirkstoffkonzentrationen und zum anderen werden mögliche Chemoresistenzunterschiede der genannten Sporen aufgezeigt. Die ersten beiden Tabellen beziehen sich auf Untersuchungen unter hoher organischer Belastung und die dritte Tabelle auf Prüfungen unter geringer organischer Belastung. Untersuchungen unter Verwendung von Taurocholat, die zu einem späteren Zeitpunkt stattfanden, sind mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

Tabelle 28: Vergleich der Chemoresistenz gegenüber verschiedener Desinfektionsmittel (Aldehyde - Chloramide) unter hoher organischer Belastung im quantitativen Suspensionsversuch. Nachweisgrenze (NG), Zugabe von Taurocholat (*), Quaternäre Ammonium Verbindung (QAV), Natriumdichlorisocyanurat (NaDCC)

Wirkstoffbasis	Produkt	absolute Wirkstoffkonzentration [mg/l] ^a	Konz. [%]	Zeit [min]	<i>C. difficile</i> R027 RF [log ₁₀ -Stufen]	<i>C. difficile</i> R001 RF [log ₁₀ -Stufen]	<i>C. difficile</i> 9689 RF [log ₁₀ -Stufen]	<i>B. subtilis</i> 6633 RF [log ₁₀ -Stufen]	
Aldehyde	F18	1210 mg/l Aldehyde	1,00	60	0,92	-	-	0,70	
				240	1,17	-	-	0,66	
				480	1,80	-	-	-	
	F3	7650 mg/l Aldehyde	3,00	240	1,90 ± 0,30	-	1,81 ± 0,09	0 ± 0,03	
Aldehyde, quaternäre Verbindung	F12	980 mg/l Aldehyd, 1000 mg/l QAV	1,00	60	-	-	2,31 ± 0,02	0,14 ± 0,16	
				120	-	-	3,18 ± 0,14	0,24 ± 0,27	
		1960 mg/l Aldehyd, 2000 mg/l QAV	2,00	60	0,20 ± 0,03	-	-	-	
	F14*	1540 mg/l Aldehyde, 1500 mg/l QAV	2,00	240	60	0,32 ± 0,02	-	-	-
					120	0,99 ± 0,06	-	-	-
					60	2,48 ± 0,17	-	-	-
	F17	11700 mg/l Aldehyde, 6000 mg/l QAV	7,50	480	4,31 ± 0,01 (NG)	4,64 (NG)	3,48 ± 0,21 (NG)	0,63 ± 0,22	
23400 mg/l Aldehyde, 12000 mg/l QAV		15,00	240	4,26 ± 0,04 (NG)	4,50 (NG)	3,48 ± 0,31 (NG)	0,83 ± 0,06		
Chlorabspaltende Verbindungen	F8	160 mg/l freies Chlor (Natriumhypochlorit)	80,00	15	-	0,15	-	-	
				30	-	0,05	-	-	
				60	-	0,38	-	-	
				240	-	0,23	-	-	
	F15	3.000 mg/l freies Chlor (Natriumhypochlorit)	2,00	10	1,48	-	1,3	0 ± 0,25	
				20	1,69	-	1,75	0 ± 0,28	
				30	2,18	-	1,78	-	
	F1	10000 mg/l freies Chlor (NaDCC)	4,10	15	4,66 ± 0,19 (NG)	-	3,78 ± 0,06 (NG)	2,37 ± 0,03	
F13	10000 mg/l freies Chlor (NaDCC)	1,80	15	3,58 ± 0,27	-	3,55 ± 0,32 (NG)	-		
	15000 mg/l freies Chlor (NaDCC)	2,70	15	4,67 ± 0,19 (NG)	-	-	2,26 ± 0,71		
Chloramide	F27	25000 mg/l Chloramid	2,50	120	1,92 ± 0,15	-	-	0 ± 0,07	
	F5	25000 mg/l Chloramid	2,50	120	2,46 ± 0,20	-	-	0 ± 0,01	
	F25	24000 mg/l Chloramid	3,00	120	1,91	-	-	0,07	
		40000 mg/l Chloramid	5,00	120	2,31	-	-	-	
	F4	50000 mg/l Chloramid	5,00	15	1,41	0,45	-	-	
				30	1,75	0,87	-	-	
				60	1,85	1,1	-	-	
				120	2,29	1,55	-	-	

^a entsprechend den Herstellerangaben

Tabelle 29: Vergleich der Chemoresistenz gegenüber verschiedener Desinfektionsmittel (Peroxidverbindungen – Quaternäre Verbindungen) unter hoher organischer Belastung im quantitativen Suspensionsversuch Nachweisgrenze (NG), Zugabe von Taurocholat (*), Quaternäre Ammonium Verbindung (QAV)

Wirkstoffbasis	Produkt	absolute Wirkstoffkonzentration [mg/l] ^a	Konz. [%]	Zeit [min]	<i>C. difficile</i> R027 RF [log ₁₀ -Stufen]	<i>C. difficile</i> R001 RF [log ₁₀ -Stufen]	<i>C. difficile</i> 9689 RF [log ₁₀ -Stufen]	<i>B. subtilis</i> 6633 RF [log ₁₀ -Stufen]
Peroxidverbindung	F19*	500 mg/l Peroxidverbindung	1,00	5	1,58 ± 0,53	-	-	-
				15	4,19 ± 0,02 (NG)	-	-	-
	F2	> 1000 mg/l Peroxidverbindung	2,00	15	4,67 ± 0,19 (NG)	-	3,70 ± 0,27 (NG)	0,46 ± 0,02
	F10	> 1000 mg/l Peroxidverbindung	2,00	15	4,67 ± 0,19 (NG)	-	3,32 ± 0,30 (NG)	1,64 ± 0,06
	F7	8000 mg/l Peroxidverbindung	1,00	240	0,31 ± 0,13	-	2,88 ± 0,77	0,11 ± 0,1
					1,07 ± 0,37	0 ± 0,25	1,35 ± 0,82	0,28 ± 0,19
F16	13500 mg/l Peroxidverbindung	3,00	240	4,99 ± 0,66	3,29	3,58 ± 0,07 (NG)	4,15 ± 0,12	
				0	-	0,54	-	
Peroxidverbindung, organische Säure	F6	7500 Peroxidverbindung, 1250 organische Säure	2,50	60	0	-	0,54	-
				240	0	-	3,84 (NG)	-
				480	1,24	-	-	-
Quaternäre Verbindung, Aldehyde	F26	387,5 mg/l QAV, 306,26 mg/l Aldehyde	0,25	240	0,01	-	-	0 ± 0,26
		775 mg/l QAV, 612,52 mg/l Aldehyde	0,50	60	0,28	-	-	0 ± 0,23
		1550 mg/l QAV, 1225,04 mg/l Aldehyde	1,00	30	0,36	-	-	0 ± 0,27
Quaternäre Verbindung, Alkylaminderivat	F11	375 mg/l QAV, 310 mg/l Alkylaminderivat	0,25	240	0,15	-	-	-
				480	0,17	-	-	-
	F9	900 mg/l QAV, 825 mg/l Alkylaminderivat	1,50	15	0,19 ± 0,15	-	-	-

^a entsprechend den Herstellerangaben

Tabelle 30: Vergleich der Chemoresistenz gegenüber verschiedener Desinfektionsmittel (Alkohole – Quaternäre Verbindungen) unter geringer organischer Belastung im quantitativen Suspensionsversuch Nachweisgrenze (NG), Zugabe von Taurocholat (*), Quaternäre Ammonium Verbindung (QAV)

Wirkstoffbasis	Produkt	absolute Wirkstoffkonzentration [mg/l] ^a	Konz. [%]	Zeit [min]	<i>C. difficile</i> R027 RF [log ₁₀ -Stufen]	<i>C. difficile</i> R001 RF [log ₁₀ -Stufen]	<i>C. difficile</i> 9689 RF [log ₁₀ -Stufen]	<i>B. subtilis</i> 6633 RF [log ₁₀ -Stufen]
Alkohole, quaternäre Verbindung	F24*	600000 mg/l Alkohole, 3500 mg/l QAV	konz.	240	0 ± 0,02	–	–	–
				480	0 ± 0,22	–	–	–
Peroxidverbindung	F19*	500 mg/l Peroxidverbindung	1,00	5	3,17 ± 0,25	–	–	–
				15	4,12 ± 0,01 (NG)	–	–	–
	F21*	6000 mg/l Peroxidverbindung	3,00	15	0,29 ± 0,07	–	–	–
				30	2,08 ± 0,65	–	–	–
				60	4,22 ± 0,22 (NG)	–	–	–
	F20*	8000 mg/l Peroxidverbindung	1,00	120	3,19 ± 0,70	–	–	0 ± 0,02
				240	–	–	–	0 ± 0,05
	F16	16000 mg/l Peroxidverbindung	2,00	120	3,89 ± 0,01 (NG)	–	–	–
4500 mg/l Peroxidverbindung		1,00	120	2,17 ± 0,01	–	–	–	
	13500 mg/l Peroxidverbindung	3,00	240	4,78 ± 0,09 (NG)	–	–	–	
Quaternäre Verbindungen	F22*	7800 mg/l QAV	konz.	240	0,18 ± 0,07	–	–	–
				480	0 ± 0,20	–	–	–
	F23*	8800 mg/l QAV	konz.	240	0,02 ± 0,12	–	–	–
				480	0,09 ± 0,16	–	–	–

^a entsprechend den Herstellerangaben

Insgesamt wurden zehn verschiedene, handelsübliche Wirkstoffgruppen bzw. Wirkstoffkombinationen getestet: Aldehyde, Aldehyde + quaternäre Verbindungen, Alkohole + quaternäre Verbindungen, chlorabspaltende Verbindungen, Chloramide, Peroxidverbindungen, Peroxidverbindungen + organische Säuren, quaternäre Verbindungen, quaternäre Verbindungen + Aldehyde sowie quaternäre Verbindungen + Alkylaminderivate. Vergleicht man die erzielten Reduktionsfaktoren (RF) von *B. subtilis*- mit denen der *C. difficile*- Stämme so fällt auf, dass die *B. subtilis*-Sporen bei allen sieben überprüften Wirkstoffgruppen deutlich geringere Reduktionsfaktoren aufweisen als die untersuchten *C. difficile*-Stämme. Bei Produkt F17 (siehe Tabelle 28), mit Wirkstoffkonzentrationen von 11.700 mg/l Aldehyden und 6.000 mg/l einer quaternären Verbindung, zeigte sich ein markanter Unterschied in der Chemoresistenz zwischen *B. subtilis* und den *C. difficile*-Stämmen. Während bei *B. subtilis* (ATCC 6633) eine Reduktion von 0,63 log₁₀-Stufen erzielt wurde, konnten die *C. difficile*-Stämme bis zur Nachweisgrenze ($R_{027} \geq 4,31 \log_{10}$; ATCC 9689 $\geq 3,48 \log_{10}$) reduziert werden. Lediglich beim peroxidischen Produkt 16 (siehe Tabelle 29) zeigten sich die Sporen des *C. difficile* Ribotyps 001 (3,29 log₁₀-Stufen), bei einer absoluten Wirkstoffkonzentration von 13.500 mg/l Peroxidverbindung, etwas widerstandsfähiger als die *B. subtilis*-Sporen (4,15 log₁₀-Stufen).

Der *C. difficile* Ribotyp 001 zeigte sich bei dem chloramidhaltigen Produkt F4, bei einer finalen Wirkstoffkonzentration von 50.000 mg/l Chlormid, widerstandsfähiger als der Ribotyp 027. Die Reduktionsfaktoren liegen bei dem Ribotyp 001 (0,45 log₁₀-Stufen) um etwa 1 log₁₀-Stufe niedriger als beim Ribotyp 027 (1,41 log₁₀-Stufen). Die gleiche Situation zeigt sich bei Produkt F16 wobei sich hier, wie bereits beschrieben, sogar eine erhöhte Widerstandsfähigkeit gegenüber den *B. subtilis*-Sporen zeigte. Bei Produkt F17 konnte keine erhöhte Chemoresistenz gegenüber den anderen *C. difficile*-Stämmen dargestellt werden, da die erzielten Reduktionen an die Nachweisgrenze gelangten.

Ein Vergleich zur Chemoresistenz zwischen dem *C. difficile* Ribotyp 027 und *C. difficile* ATCC Stamm 9689 kann an sieben von elf Produkten erfolgen. Bei vier Produkten F1, F2, F17 und F10 (siehe Tabelle 28 und Tabelle 29) erfolgten die Reduktionen bis zur Nachweisgrenze, so dass ein Chemoresistenzvergleich dort ausbleibt. Bei vier von sieben möglichen Vergleichsprodukten (F6, F7, F12 und F16) zeigte sich der Ribotyp 027 deutlich resistenter als der ATCC Stamm 9689. Bei Produkt F12 konnte, bei einer finalen Wirkstoffkonzentration von 1.960 mg/l Aldehyd und 2.000 mg/l quaternäre Ammoniumverbindung, der ATCC-Stamm nach einer Einwirkzeit von 60 min bereits um 3,18 log₁₀-Stufen reduziert werden, wo hingegen der Ribotyp 027 nach einer Einwirkzeit von 120 min lediglich eine Reduktion von 0,20 log₁₀-Stufen aufwies. Ein ähnlich deutliches Bild zeigte sich bei Produkt F7 (Peroxidverbindungen) und Produkt F6 (Peroxidverbindungen + organischer Säure), wo die Reduktionsfaktoren beim Laborstamm (ATCC 9689) um

2,57 bzw. 3,84 \log_{10} -Stufen höher lagen als beim Hyperendemiestamm 027. Bei den Produkten F3 (Aldehyde) und F15 (Chlorabspaltende Verbindung) ist nur minimal ein Unterschied zwischen der Chemoresistenz des Ribotyps 027 und des ATCC-Stamms erkennbar. Der ATCC-Stamm zeigte sich bei diesen Produkten geringfügig, um 0,06 bis 0,40 \log_{10} -Stufen, resistenter als der Ribotyp 027.

Weiterhin ist in den Tabelle 28 bis Tabelle 30 erkennbar, dass die Produkte mit unterschiedlich geprüften Konzentrations-Zeit-Relationen bei allen überprüften Testorganismen reproduzierbare Reduktionsfaktoren aufweisen. Das Produkt F16 (siehe Tabelle 29) wurde beispielsweise bei 1% - 120 min und 3% - 240 min geprüft und zeigte bei *C. difficile* R027 Reduktionsfaktoren (RFs) von 1,07 und 4,99, bei *C. difficile* 001 RFs von 0 und 3,29, bei *C. difficile* ATCC 9689 RFs von 1,35 und 3,58 (NG) und bei *B. subtilis* RFs von 0,28 und 4,15. Ähnlich konsequente Konzentrations-Zeit-Abhängigkeiten zeigten sich auch bei den anderen Produkten.

Betrachtet man die einzelnen Wirkstoffgruppen so fällt auf, dass die besten sporiziden Wirksamkeiten gegenüber Sporen von *C. difficile* mit Produkten erzielt wurden, die auf Kombination von Aldehyden und quaternären Verbindungen, auf chlorabspaltende Verbindungen und auf Peroxidverbindungen basierten. Die absoluten Wirkstoffkonzentration und die geprüften Einwirkzeiten korrelieren weitestgehend mit den erzielten Reduktionsfaktoren. Bei der Wirkstoffgruppe Aldehyde + quaternäre Verbindung (siehe Tabelle 28) korrelieren die Steigerung der absoluten Wirkstoffkonzentrationen mit der Erhöhung der erzielten Reduktionsfaktoren. Bei den Peroxidverbindungen (siehe Tabelle 29) ist diese Korrelation nicht erkennbar. Das Produkt F19 erzielt mit einer absoluten Wirkstoffkonzentration von 500 mg/l Peroxidverbindung eine Reduktion des Ribotyps R027, bis zur Nachweisgrenze (NG), von 4,19 \log_{10} -Stufen. Ein weiteres Produkt aus dieser Gruppe F7 erzielt hingegen bei einer absoluten Wirkstoffkonzentration von 8.000 mg/l Peroxidverbindung lediglich eine Reduktion des Ribotyps 027 um 0,31 \log_{10} -Stufen.

3.4 Testung von Desinfektionsmitteln im 2-Stufen-Modell

3.4.1 *C. difficile*-Sporen

3.4.1.1 Sporizide Wirksamkeitstestungen verschiedener Produkte

Von insgesamt 27 getesteten Flächendesinfektionsmitteln im quantitativen Suspensionsversuch (Phase 2, Stufe 1), werden drei Produkte nachstehend detailliert mit entsprechenden praxisnahen Versuchen (Phase 2, Stufe 2) vorgestellt. Die ausgewählten Produkte zeigen unterschiedliche Variationen von praxisnahen Modellen auf und sollten die Aussagefähigkeit und Praktikabilität der sporiziden Desinfektionsmittelprüfung im 2-Stufen-Modell darstellen. Für die Testungen wurde Sporen des Hyperendemiestamms *C. difficile* Ribotyp 027 herangezogen, um im Ausbruchsfall sporizid wirksame Desinfektionsmittel empfehlen zu können. Die Anreicherung der Sporen erfolgte gemäß der Anreicherungsmethode SOP 156 Bonn (siehe 2.4.5).

Als Bewertungskriterium für eine sporizide Wirksamkeit wurde die, derzeit auf europäischer Ebene im quantitativen Suspensionsversuch der WG 3, geforderte Reduktion der Sporen um mindestens 3 log₁₀-Stufen herangezogen [CEN, 2002]. Diese Anforderung wurde auch für die praxisnahen Keimträgerversuche (Phase 2, Stufe 2) ohne Mechanik und mit Mechanik herangezogen [CEN, 2001; Gebel, J. *et al.*, 2001]. Der 4-Felder Test, der derzeit auf europäischer Ebene als Phase 2, Stufe 2-Test zur Diskussion steht, wurde ebenfalls für die Testungen eingesetzt. Für den praxisnahen 4-Felder Test wurde zur Bestätigung einer sporiziden Wirksamkeit auf Testfeld 1 ebenso eine Reduktion der Sporen um 3 log₁₀-Stufen gefordert [CEN, 2002]. Das Streuungsrisiko, das in Form des Akkumulationsfaktors (AF) dargestellt wird, sollte dabei 0,5 log₁₀-Stufen (3 KBE/25 cm²) nicht überschreiten. Bei den ersten Untersuchungen erfolgte die Wiederfindung der germinationsfähigen Sporen ohne Taurocholat (TA) im GSBHI-Agar, später wurde stets Taurocholat hinzugefügt.

I. Produkt F10

Das Produkt F10 zählt zu der Wirkstoffgruppe der Peroxidverbindungen (siehe S. 44, Tabelle 9) und wurde vom Hersteller bei einer Konzentrations-Zeit-Relation von 2,0% - 5 min als sporizid wirksam ausgewiesen. Die Untersuchungen erfolgten mit 0,3% Albumin und 0,3% Schaferythrozyten unter hoher organischer Belastung bzw. dirty conditions. Die Neutralisation erfolgte mit TSH-Thiosulfat. Die Untersuchungen wurden mit einem zweiten Testansatz reproduziert. Die Wiederfindung der germinationsfähigen Sporen erfolgte

zunächst ohne Zugabe von Taurocholol. Später wurden vergleichend Untersuchungen mit Taurocholol durchgeführt.

- **Quantitativen Suspensionsversuch/ Phase 2, Stufe 1-Test (siehe 2.6.1)**

Der folgenden Tabelle 31 sind die ermittelten Reduktionen der eingesetzten *C. difficile*-Sporen (Ribotyp 027) als log₁₀-Stufen für Produkt F10 (2%) nach Einwirkzeiten von 5, 15 und 30 min zu entnehmen. Die Ausgangskonzentration (N) der germinationsfähigen Sporen lag im Mittel bei 3,09 x 10⁶ KBE/ml. Die Sporenkonzentrationen in den parallel mitgeführten Wasserkontrollen (WSH) lagen bei 2,95 x 10⁵ KBE/ml.

Tabelle 31: Produkt F10 - Reduktion von *C. difficile*-Sporen (Ribotyp 027) als log₁₀-Stufen im quantitativen Suspensionsversuch (DGHM) unter hoher organischer Belastung. Konzentration der Testsuspension (N) in KBE/ml, Konzentration der Wasserkontrolle (WSH) in KBE/ml, Taurocholol (TA), Nachweisgrenze (NG), hohe organische Belastung (dirty)

F10		
N= 3,09 x 10 ⁶ KBE/ml; WSH= 2,95 x 10 ⁵ KBE/ml		ohne TA
Einwirkzeit [min]	Konz. [%]	Reduktion [log ₁₀ -Stufen]
		dirty
5	2	3,47 ± 0,73
15		4,67 ± 0,19 (NG)
30		4,47 ± 0,00 (NG)

Das Produkt F10 konnte im quantitativen Suspensionsversuch ab einer Einwirkzeit von 5 min im Mittel eine ausreichend sporizide Wirksamkeit mit einer Reduktion um 3,47 log₁₀-Stufen erzielen. Ab einer Einwirkzeit von 15 min konnte die *C. difficile*-Sporen bis zur Nachweisgrenze reduziert werden.

Vor der Hintergrund der Patientenzuträglichkeit wurde im Folgenden die Konzentration von 2% (Wirkstoffkonzentration >1.000 mg/l Peroxidverbindungen) auf 1% gesenkt, um zu prüfen, ob bei dieser Konzentration noch eine sporizide Wirksamkeit gegenüber *C. difficile*-Sporen gegeben ist. Gleichzeitig sollten verschiedenen Rezepturvarianten untersucht und miteinander verglichen werden (R1, R2, R3). Die Rezepturvarianten unterschieden sich dabei nicht in der Wirkstoffzusammensetzung (Peressigsäurekonzentration), sondern lediglich in der Art der Darreichungsform. Bei Rezepturvariante 1 und 3 (R1, R3) handelte es sich um ein weißes, fein- bis grobkörniges Pulver. Die Rezepturvariante 2 (R2) bestand aus einem blau-weißen, grobkörnigen Granulat. Die Testungen erfolgten bei Konzentrationen von 0,5%, 1% und 2% und Einwirkzeiten von 30 und 60 min. Die Ausgangskonzentration der germinationsfähigen Sporen lag im Mittel bei 3,89 x 10⁵ KBE/ml. Die Sporenkonzentrationen in den parallel mitgeführten Wasserkontrollen lagen bei 3,63 x 10⁴ KBE/ml.

Tabelle 32: Produkt F10 - Reduktion von *C. difficile*-Sporen (R027) als log₁₀-Stufen im quantitativen Suspensionsversuch (DGHM) unter hoher organischer Belastung. Konzentration der Testsuspension (N) in KBE/ml, Konzentration der Wasserkontrolle (WSH) in KBE/ml, Taurocholat (TA), Nachweisgrenze (NG), hohe organische Belastung (dirty), unterschiedliche Rezepturvarianten des Produkts F10 (R1, R2, R3)

F10				
N= 3,89 x 10 ⁵ KBE/ml; WSH= 3,63 x 10 ⁴ KBE/ml		ohne TA		
Einwirkzeit [min]	Konz. [%]	Reduktion [log ₁₀ -Stufen]		
		R1	R2	R3
dirty				
30	1	3,31 ± 0,00 (NG)	3,72 ± 0,03 (NG)	3,55 (NG)
	2	n.d.	3,96 ± 0,00 (NG)	3,55 (NG)
60	0,5	3,42 ± 0,04 (NG)	3,71 ± 0,02 (NG)	3,21 (NG)

n.d. nicht durchgeführt

Das Produkt F10 erzielte bei allen gewählten Konzentrations-Zeit-Relationen (1% - 30 min, 2% - 30 min und 0,5% - 60 min) eine ausreichend sporizide Reduktion bis zur Nachweisgrenze. Ein Unterschied der sporiziden Wirksamkeit der verschiedenen Rezepturvarianten im quantitativen Suspensionsversuch lag nicht vor.

- **Praxisnaher Test: Wischdesinfektion mit Mechanik (siehe 2.7.2)**

Von den drei Rezepturvarianten wurde R3 im praxisnahen Test überprüft, da diese Variante später von der Firma vermarktet und als sporizid gegenüber *C. difficile*-Sporen ausgewiesen werden sollte. Der folgenden Tabelle 33 sind die ermittelten Reduktionen der eingesetzten *C. difficile*-Sporen (Ribotyp 027) als log₁₀-Einheiten für Produkt F10 (R3) bei 1%- 30 min zu entnehmen. Die Ausgangskonzentration der germinationsfähigen Sporen lag im Mittel bei 1,66 x 10⁶ KBE/ml. Die Sporenkonzentrationen in den parallel mitgeführten Wasserkontrollen lagen bei 7,59 x 10⁴ KBE/ml. Die Wiederfindung der germinationsfähigen Sporen fand zu diesem Zeitpunkt mit Taurocholat statt.

Tabelle 33: Produkt F10 - Reduktion von *C. difficile*-Sporen (R027) als log₁₀-Stufen im praxisnahen Versuch mit Mechanik (DGHM) unter hoher organischer Belastung. Konzentration der Testsuspension (N) in KBE/ml, Konzentration der Wasserkontrolle (WSH) in KBE/ml, Taurocholat (TA), Nachweisgrenze (NG), hohe organische Belastung (dirty), unterschiedliche Rezepturvarianten des Produkts F10 (R1, R2, R3)

F10				
N= 1,66 x 10 ⁶ KBE/ml; WSH= 7,59 x 10 ⁴ KBE/ml		mit TA		
Einwirkzeit [min]	Konz. [%]	Reduktion [log ₁₀ -Stufen]		
		dirty		
R1	R2	R3		
30	1	n.d.	n.d.	3,31 ± 0,24

n.d. nicht durchgeführt

Im praxisnahen Versuch mit Mechanik konnte dem Produkt F10 (R3) eine nach CEN TC 216 eine sporizide Wirksamkeit (> 3 log₁₀-Stufen) mit einer Reduktion um 3,31 log₁₀-Stufen bestätigt werden. Im Vergleich zum quantitativen Suspensionsversuch (siehe Tabelle 32) konnte die Reduktion im praxisnahen Versuch nicht bis zur Nachweisgrenze erfolgen.

• **4-Felder Test – praxisnahe Flächen (siehe 2.7.3)**

Im Folgenden werden verschiedene Vergleichsuntersuchungen mit Produkt F10 vorgestellt. Dabei wurden unterschiedliche Ausgangskonzentrationen (N= 10⁵ bzw. 10⁶) und der Einfluss von Taurocholat auf die Sporizidieprüfung untersucht.

Der Tabelle 34 kann das Reduktionsvermögen und das Streuungsrisiko der Testorganismen beim Einsatz von Produkt F10 (R1) bei einer Konzentrations-Zeit-Relation von 1% - 30 min und 2% - 30 min entnommen werden. Die Ausgangskonzentration (N) der germinationsfähigen Sporen lag im Mittel bei 1,87 x 10⁶ KBE/ml. Die Kontrolle 0_{min} (K₀) wies eine Konzentration von 1,29 x 10⁶ KBE/25 cm² und die Kontrolle 30_{min} (K₃₀) von 1,25 x 10⁶ KBE/25 cm² auf. Im Vergleich erfolgten Untersuchungen mit Wasser standardisierter Härte (WSH). Das aufgebrachte Volumen wurde durch Gewichtsbestimmung vor und nach dem Wischvorgang ermittelt. Im Durchschnitt lag das aufgebrachte Volumen bei 9,4 ml/m² ± 2,6 ml. Aufgeführt sind die erzielten Reduktionsfaktoren (RF) auf dem kontaminierten Testfeld 1, die nachgewiesenen Testorganismen nach Behandlung auf Testfeld 1 (RC) und die nachgewiesenen Testorganismen durch Verschleppung nach Behandlung auf Testfeld 2 bis 4 (AF). Die Wiederfindung der germinationsfähigen Sporen erfolgte ohne Taurocholat.

Tabelle 34: Produkt F10 – Reduktion von C. difficile-Sporen (R027) als log₁₀-Stufen im praxisnahen 4-Felder Test. Konzentration der Testsuspension (N) in KBE/ml, Konzentration der Trocknungskontrollen K₀, K_{tx} in KBE/ 25 cm², Taurocholat (TA), Reduktionsfaktor (RF), Restkontamination (RC), Akkumulationsfaktor (AF) in log₁₀-Stufen, Nachweisgrenze (NG), hohe organische Belastung [o. Bel.] (dirty), unterschiedliche Rezepturvarianten des Produkts F10 (R1, R2, R3)

F10 (R1)					
N= 1,87 x 10 ⁶ KBE/ml; K _{0/30} = 1,29 x 10 ⁶ / 1,25 x 10 ⁶ KBE/25cm ²			ohne TA		
Einwirkzeit [min]	o. Bel.	Konz. [%]	RF (Feld 1)	RC (Feld 1)	AF (Feld 2-4)
30	dirty	1	5,54 ± 0,55	0,59 ± 0,59	0,23
		WSH- Kontrolle	3,25 ± 0,06	2,87 ± 0,09	2,76
		2	5,41 ± 0,00	0,70 ± 0,00	0,12
		WSH- Kontrolle	2,43 ± 0,11	3,62 ± 0,06	3,48

Im praxisnahen 4-Felder Test konnte dem Produkt F10, wie im quantitativen Suspensionsversuch und im praxisnahen Versuch mit Mechanik eine sporizide Wirksamkeit bei 1% - 30 min und 2% 30 min bestätigt werden. Auf Testfeld 1 konnte eine Reduktion um

5,54 bzw. 5,41 log₁₀-Stufen und eine Restkontamination von 0,59 bzw. 0,70 log₁₀-Stufen ermittelt werden. Eine Streuung der Mikroorganismen ins Umfeld (Feld 2 - 4) lag unterhalb des Maximalwertes von 0,5 log₁₀-Stufen (≤ 3 KBE/25 cm²). Die parallel mitgeführte WSH-Kontrolle wies dagegen ein Steuerungsrisiko von 2,76 bzw. 3,48 log₁₀-Stufen auf. Auf Testfeld 1 konnte eine Restkontamination von 2,87 bzw. 3,62 log₁₀-Stufen ermittelt werden. In einer weiteren Versuchsreihe wurden die Versuche derselben Rezepturvariante (R1) vergleichend mit einer geringeren Ausgangskonzentration durchgeführt.

Die ermittelten germinationsfähigen Sporen der Ausgangskonzentration (N) lag bei 1,63 x 10⁵ KBE/ml statt bei 1,25 x 10⁶ KBE/ml. Bei den Kontrollen (K_x) konnte ein Wert um 8,30x 10⁴ KBE/25 cm² ermittelt werden. Im Durchschnitt lag das aufgebrachte Volumen bei 9,0 ml/m² ± 2,6 ml.

Tabelle 35: Produkt F10 – Reduktion von *C. difficile*-Sporen (R027) als log₁₀-Stufen im praxisnahen 4-Felder Test. Konzentration der Testsuspension (N) in KBE/ml, Konzentration der Trocknungskontrollen K₁₀, K_{1x} in KBE/25 cm², Taurocholat (TA), Reduktionsfaktor (RF), Restkontamination (RC), Akkumulationsfaktor (AF) in log₁₀-Stufen, Nachweisgrenze (NG), hohe organische Belastung [o. Bel.] (dirty), unterschiedliche Rezepturvarianten des Produkts F10 (R1, R2, R3)

F10 (R1)					
N= 1,63 x 10 ⁵ KBE/ml; K _{0/30} = 8,30 x 10 ⁴ / 7,94 x 10 ⁴ KBE/25cm ²			ohne TA		
Einwirkzeit [min]	o. Bel.	Konz. [%]	RF (Feld 1)	RC (Feld 1)	AF (Feld 2-4)
30	dirty	1	4,22 ± 0,14	0,70 ± 0	0
		WSH- Kontrolle	1,54 ± 0,31	3,38 ± 0,17	2,80
60		0,5	3,06 ± 0,42	1,89 ± 0,58	1,15
		WSH- Kontrolle	1,45 ± 0,34	3,51 ± 0,17	2,74

Im praxisnahen 4-Felder Test konnte dem Produkt F10 (R1) eine sporizide Wirksamkeit für 1% - 30 min bestätigt werden. Eine Streuung der Mikroorganismen ins Umfeld (AF) lag bei diesen Konzentrations-Zeit-Relationen nicht vor. Die Reduktion auf Testfeld 1 lag bei 4,22 log₁₀-Stufen. Für 0,5% - 60 min konnte dem Produkt im 4-Felder Test, entgegen dem quantitativen Suspensionsversuch (siehe Tabelle 32), keine ausreichend sporizide Wirksamkeit bestätigt werden. Die Verschleppung der Sporen ins Umfeld (Feld 2-4) war bei dieser Konzentrations-Zeit-Relation mit 1,15 log₁₀-Stufen (14 KBE/25 cm²) über dem erlaubten Wert von 0,5 log₁₀-Stufen (3 KBE/25 cm²). Ein Vergleich der Akkumulationsfaktoren (AF) des 1% - 30 min Werts aus Tabelle 34 (0,23 log₁₀-Stufen) und Tabelle 35 (0 log₁₀-Stufen) zeigt, dass mit erhöhter Ausgangskonzentration das Streuungsrisiko steigt.

Nachstehend wird der 1% - 30 min Wert der Rezepturvariante 3 (R3) im 4-Felder Test unter Zugabe von Taurocholat vorgestellt. Die aufgebrachte Desinfektionsmittelmenge lag im Durchschnitt bei 9,2 ml/m² ± 2,1 ml.

Tabelle 36: Produkt F10 – Reduktion von *C. difficile*-Sporen (R027) als log₁₀-Stufen im praxisnahen 4-Felder Test. Konzentration der Testsuspension (N) in KBE/ml, Konzentration der Trocknungskontrollen K₁₀, K_{tx} in KBE/25 cm², Taurocholat (TA), Reduktionsfaktor (RF), Restkontamination (RC), Akkumulationsfaktor (AF) in log₁₀-Stufen, Nachweisgrenze (NG), hohe organische Belastung [o. Bel.] (dirty), unterschiedliche Rezepturvarianten des Produkts F10 (R1, R2, R3)

F10 (R3)					
N= 1,76 x 10 ⁶ KBE/ml K _{0/30} = 4,19 x 10 ⁴ / 3,71 x 10 ⁴ KBE/25cm ²			mit TA		
Einwirkzeit [min]	o. Bel.	Konz. [%]	RF (Feld 1)	RC (Feld 1)	AF (Feld 2-4)
30	dirty	1	3,87 ± 0,03	0,70 ± 0,00	1,00
		WSH- Kontrolle	2,74 ± 0,08	1,83 ± 0,05	1,50

Unter Zusatz von Taurocholat konnte im 4-Felder Test der Rezepturvariante 3 keine ausreichend sporizide Wirksamkeit bestätigt werden. Zwar konnte Testfeld 1 mit einer Reduktion von 3,87 log₁₀-Stufen eine ausreichende Inaktivierung der Sporen erfolgen, doch liegt die Verschleppung der Sporen ins Umfeld mit 1 log₁₀-Stufe zu hoch. Auffällig ist das Verhältnis der Ausgangskonzentration (N) zu den Kontrollen (K) unter Zusatz von Taurocholat (siehe Tabelle 36) im Vergleich zu den Ansätzen ohne Taurocholat (siehe z.B Tabelle 34). Während das Verhältnis unter Zugabe von Taurocholat mit Werten von 1,76 x 10⁶ KBE/ml (8,80 x 10⁴ KBE/25 cm²) zu 4,19 x 10⁴ KBE/25 cm² plausibel ist (siehe Tabelle 34), wurden ohne Zugabe von Taurocholat (siehe Tabelle 34) mehr germinationsfähigen Sporen von den Kontrollflächen zurückgewonnen (1,29 x 10⁶ KBE/25 cm²) als scheinbar mit der Ausgangskonzentration (9,35 x 10⁴ KBE/25 cm²) aufgetragen wurden.

II. Produkt F16

Das Produkt F16 zählt ebenfalls zu der Wirkstoffgruppe der Peroxidverbindungen (siehe S. 44, Tabelle 9). Die Untersuchungen erfolgten unter geringer organischer Belastung (0,03% Albumin) und hoher organischer Belastung (0,3% Albumin und 0,3% Schaferythrozyten). Die Neutralisation erfolgte mit TSH-Thiosulfat. Die Versuche erfolgten in Reproduktion, sofern nicht explizit anders ausgewiesen. Zunächst wird eine Untersuchungsreihe ohne Zugabe von Taurocholat (TA) vorgestellt und im Anschluss daran vergleichbare Ergebnisse mit TA. Getestet wurden Konzentrationen von 1, 2 und 3% bei Einwirkzeiten von 120, 240 und 480 min unter clean und dirty conditions. In den folgenden Tabellen werden die erzielten Reduktionsfaktoren aufgeführt:

• **Quantitativen Suspensionsversuch/ Phase 2, Stufe 1-Test (siehe 2.6.1)**

• **Praxisnaher Test: Wischdesinfektion mit Mechanik (siehe 2.7.2)**

Tabelle 37: Produkt F16 - Reduktion von *C. difficile*-Sporen (R027) als log₁₀-Stufen im quantitativen Suspensionsversuch (DGHM) unter geringer und hoher organischer Belastung. Konzentration der Testsuspension (N) in KBE/ml, Konzentration der Wasserkontrolle (WSH) in KBE/ml, Taurocholat (TA), Nachweisgrenze (NG), geringe organische Belastung (clean), hohe organische Belastung (dirty)

F16			
N= 1,70 x 10 ⁷ KBE/ml; WSH= 3,24 x 10 ⁶ KBE/ml		ohne TA	
Einwirkzeit [min]	Konz. [%]	Reduktion [log ₁₀ -Stufen]	
		clean	dirty
120	1	2,17 ± 0,00	1,07 ± 0,37
	2	4,26 ± 0,14	1,40 ± 0,11
	3	3,78 ± 0,33	4,50 ± 0,80
240	1	3,16 ± 0,21	1,42 ± 0,60
	2	3,73 ± 0,44	4,57 ± 0,49
	3	4,78 ± 0,09	4,99 ± 0,66
480	1	4,24 ± 0,59	2,55 ± 0,92
	2	4,72 ± 0,20	4,59 ± 0,75
	3	4,94 ± 0,15	4,24 ± 0,40

Tabelle 38: Produkt F16 - Reduktion von *C. difficile*-Sporen (R027) als log₁₀-Stufen im praxisnahen Test mit Mechanik (DGHM) unter geringer und hoher organischer Belastung. Konzentration der Testsuspension (N) in KBE/ml, Konzentration der Wasserkontrolle (WSH) in KBE/ml, Taurocholat (TA), Nachweisgrenze (NG), geringe organische Belastung (clean), hohe organische Belastung (dirty)

F16			
N= 9,77 x 10 ⁶ KBE/ml; WSH= 1,35 x 10 ⁶ KBE/ml		ohne TA	
Einwirkzeit [min]	Konz. [%]	Reduktion [log ₁₀ -Stufen]	
		clean	dirty
120	1	1,65 ± 0,04	1,47 ± 0,02
	2	1,93 ± 0,32	1,80 ± 0,50
	3	1,01 ± 0,73	2,30 ± 0,37
240	1	2,45 ± 0,64	1,20 ± 0,14
	2	3,03 ± 0,14	2,35 ± 0,29
	3	2,90 ± 0,31	2,45 ± 0,36
480	1	2,90 ± 0	1,24 ± 0,38
	2	4,03 ± 0,22	1,39 ± 0,01
	3	4,94 ± 0,13	1,66 ± 0,06

Vergleicht man die erzielten Reduktionen im quantitativen Suspensionsversuch (siehe Tabelle 37) mit denen des praxisnahen Versuchs mit Mechanik (siehe Tabelle 38) so wird deutlich, dass die Reduktionen bzw. Reduktionsfaktoren im praxisnahen Test durchweg niedriger liegen. Diese Beobachtung spricht für eine erhöhte Anforderung an das Produkt im praxisnahen Versuch.

Kann im quantitativen Suspensionsversuch bereits eine sporizide Wirksamkeit unter clean conditions ab 2% - 120 min bzw. 1% - 240 min bestätigt werden (siehe Tabelle 37), so kann diese im praxisnahen Versuch erst ab 2% - 240 min bestätigt werden (siehe Tabelle 38). Dies ist mit der Beobachtung unter hoher organischer Belastung (dirty conditions) kongruent.

Bei Vergleich der Belastungssubstanzen (clean und dirty conditions) fällt auf, dass die Reduktionsfaktoren unter clean conditions höher liegen als unter dirty conditions. Lediglich im quantitativen Suspensionsversuch liegen bei den hohen Konzentrationen 3% - 120 min und 2% -/ 3% - 240 min konträre Ergebnisse vor (siehe Tabelle 37). Auffällig war bei diesen Konzentrationen die schlechte Löslichkeit des Produktes sowie die auffällige Verklumpung (siehe Abbildung 45) im Testansatz des quantitativen Suspensionsversuchs.

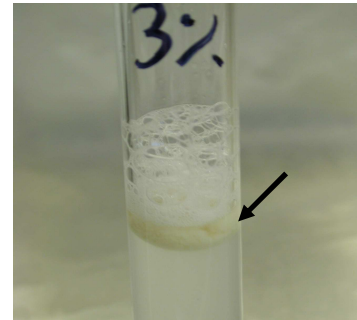


Abbildung 45: Testansatz mit Produkt F16 im quantitativen Suspensionsversuch.
Im Testansatz (siehe Pfeil) ist eine Verklumpung deutlich erkennbar

In den nachfolgenden Tabellen werden analoge Ergebnisse mit Produkt F16, unter Zugabe von Taurocholat (TA) im GSBHI-Agar, vorgestellt.

- **Quantitativen Suspensionsversuch / Phase 2, Stufe 1-Test (siehe 2.6.2)**

Der quantitative Suspensionsversuch erfolgte nach europäischem Vorbild [CEN, 2009]. Die WSH-Kontrolle entfällt bei diesem Testdesign und wird durch die Kontrolle A (KoA) ersetzt. Es wurden Einwirkzeiten von zwei und vier Stunden (120/ 240 min) und Konzentrationen von 0,5%, 1% und 2% unter clean conditions getestet.

Tabelle 39: Produkt F16 - Reduktion von *C. difficile*-Sporen (R027) als log₁₀-Stufen im quantitativen Suspensionsversuch (EN) unter geringer organischer Belastung. Konzentration der Testsuspension (N) in KBE/ml, Konzentration der Wasserkontrolle (WSH) in KBE/ml, Taurocholat (TA), Nachweisgrenze (NG), geringe organische Belastung (clean)

F16		
N= 1,07 x 10 ⁶ KBE/ml; KoA= 1,78 x 10 ² KBE/ml		mit TA
Einwirkzeit [min]	Konz. [%]	Reduktion [log ₁₀ -Stufen]
		clean
120	0,5	0 ± 0,05
	1	1,70 ± 0,17
	2	3,95 ± 0,05 (NG)
240		3,95 ± 0,05 (NG)

Aus der voranstehenden Tabelle ist ersichtlich, dass ab einer Wirkstoffkonzentration von 1% messbare Reduktionen im Mittel von 1,70 log₁₀-Stufen erreicht wurden. Vergleicht man diese mit den korrespondierenden Werten im Mittel von 2,17 log₁₀-Stufen ohne Zugabe von TA (siehe Tabelle 37), so liegt die Reduktion mit TA um 0,47 log₁₀-Stufen darunter. Bei einer Konzentration von 2% wurde mit eine Reduktion um 3,95 log₁₀-Stufen die Nachweisgrenze erreicht. Dies ist auch vergleichbar mit dem 2% - Wert ohne Zugabe von TA (siehe Tabelle 37). Die gleiche Situation stellt sich für den 4-Stunden-Wert (240 min) mit einer

Konzentration von 2% dar. Der maximale RF von 3,95 log₁₀-Stufen unter Zugabe von TA korrespondiert mit dem ermittelten RF von 3,73 log₁₀-Stufen ohne Zugabe von TA.

- **Praxisnaher Test: Flächendesinfektion ohne Mechanik (siehe 2.7.1)**
- **Praxisnaher Test: Flächendesinfektion mit Mechanik (siehe 2.7.2)**

Tabelle 40: Produkt F16 - Reduktion von C. difficile-Sporen als log₁₀-Stufen im praxisnahen Test ohne Mechanik Konzentration der Testsuspension (N) in KBE/ml, Konzentration der Wasserkontrolle (WSH) in KBE/ml, Taurocholat (TA), Nachweisgrenze (NG), geringe organische Belastung (clean)

F16		
N= 1,12 x 10 ⁶ KBE/ml; WSH= 6,17 x 10 ⁴ KBE/ml		mit TA
Einwirkzeit [min]	Konz. [%]	Reduktion [log ₁₀ -Stufen]
		clean
120	0,5	0,42 ± 0,22
	1	3,50 ± 0,02 (NG)
	2	3,81 ± 0,11 (NG)
240	2	3,78 ± 0,12 (NG)

Tabelle 41: Produkt F16 – Reduktion von C. difficile-Sporen als log₁₀-Stufen im praxisnahen Test mit Mechanik (DGHM) Konzentration der Testsuspension (N) in KBE/ml, Konzentration der Wasserkontrolle (WSH) in KBE/ml, Taurocholat (TA), Nachweisgrenze (NG), geringe organische Belastung (clean), hohe organische Belastung (dirty)

F16			
N= 2,45 x 10 ⁶ KBE/ml; WSH= 3,24 x 10 ⁵ KBE/ml		mit TA	
Einwirkzeit [min]	Konz. [%]	Reduktion [log ₁₀ -Stufen]	
		clean	dirty
120	2	2,04 ± 0,03	n.d.
240	2	2,81 ± 0,15	1,48 ± 0,03

n.d. nicht durchgeführt

Im praxisnahen Test ohne Mechanik (siehe Tabelle 40) wurden Einwirkzeiten von zwei und vier Stunden und Konzentrationen von 0,5%, 1% und 2% unter clean conditions getestet. Mit 0,5% wurden im Mittel 0,42 log₁₀-Stufen erzielt, ab einer Konzentration von 1% wurde die Nachweisgrenze erreicht. Im Vergleich zu den korrespondierenden Werten mit Mechanik (siehe Tabelle 41) zeigten sich beim Ansatz ohne Mechanik deutlich höhere Reduktionen. Beim direkten Vergleich Praxistest ohne Mechanik (siehe Tabelle 40) und quantitativer Suspensionsversuch EN (siehe Tabelle 39), beide mit Taurocholat (TA), lagen die ermittelten Reduktionen im Praxisversuch ohne Mechanik bei einer Konzentration 0,5% um ca. 0,5 log₁₀-Stufen und bei 1% um 1,8 log₁₀-Stufen höher als im Suspensionsversuch. Bei der 2% Produktprüflösung wurde jeweils die Nachweisgrenze erreicht.

Beim praxisnahen Keimträgerversuch mit Mechanik (siehe Tabelle 41) lagen dagegen die Reduktion im Vergleich zum quantitativen Suspensionsversuch EN (siehe Tabelle 39) um ca. 1,91 log₁₀-Stufen niedriger (2,04 log₁₀-Stufen im Vergleich zu 3,95 log₁₀-Stufen). Der Praxisversuch mit Mechanik stellte demnach deutlich höhere Anforderungen an das Produkt als der quantitative Suspensionsversuch.

Vergleicht man die Ergebnisse des praxisnahen Versuchs ohne Zugabe von TA (siehe Tabelle 38) und die Resultate mit TA (siehe Tabelle 41), so zeigten sich bei diesem Produkt unter Zugabe von TA geringfügig höhere Reduktionen (1,65 log₁₀-Stufen im Vergleich zu 2,04 log₁₀-Stufen).

• **4-Felder Test – praxisnahe Flächen (siehe 2.7.3)**

Getestet wurde die Konzentrations-Zeit-Relation 2% - 240 min unter hoher und geringer organischer Belastung. Zur Optimierung der Wirksamkeit wurden zwei Wischvorgänge durchgeführt und gleichzeitig der Einfluss einer erhöhten Benetzung der Wischtücher untersucht. Bei der standardmäßigen Benetzung der Wischtücher mit 16 ml Desinfektionsmittellösung erfolgte eine durchschnittliche Abgabe von $8,5 \text{ ml/m}^2 \pm 2,2 \text{ ml}$. Bei einer Benetzung mit 20 ml wurden im Durchschnitt $17,8 \text{ ml/m}^2 \pm 6,5 \text{ ml}$ abgegeben.

Tabelle 42: Produkt F16 – Reduktion von *C. difficile*-Sporen als \log_{10} -Einheiten im praxisnahen 4-Felder Test Konzentration der Testsuspension (N) in KBE/ml, Konzentration der Trocknungskontrollen K_{10} , K_{tx} in KBE/25 cm^2 , Taurocholat (TA), Reduktionsfaktor (RF), Restkontamination (RC), Akkumulationsfaktor (AF) in \log_{10} -Einheiten, Nachweisgrenze (NG), geringe organische Belastung [o. Bel.] (clean), hohe o. Bel. (dirty)

F16					
N= $2,49 \times 10^6$ KBE/ml; $K_{0/240} = 1,21 \times 10^5 / 1,35 \times 10^5$ KBE/25 cm^2			mit TA		
Einwirkzeit [min]	o. Bel.	Konz. [%]	RF (Feld 1)	RC (Feld 1)	AF (Feld 2-4)
240 (2 Wischvorgänge) 16 ml	clean	2	$5,16 \pm 0,27$	0 ± 0	0,33
		WSH- Kontrolle	$2,81 \pm 0,69$	$2,35 \pm 0,42$	1,86
	dirty	2	$2,98 \pm 0,44$	$2,26 \pm 0,30$	1,67
		WSH- Kontrolle	$3,49 \pm 0,13$	$1,77 \pm 0,29$	1,27
240 (2 Wischvorgänge) 20 ml*	clean	2	4,08	0,70	0,00
		WSH- Kontrolle	4,08	0,70	1,21
	dirty	2	3,91	0,70	0,00
		WSH- Kontrolle	3,91	0,70	1,06

*orientierende Untersuchung (Einfachbestimmung)

Vergleicht man in Tabelle 42 die Werte mit 16 ml und 20 ml getränkten Wischtüchern, so fällt auf, dass eine Akkumulation (AF) und damit eine Streuung ins Umfeld, durch das erhöhte Desinfektionsmittelvolumen verhindert werden konnte. Besonders deutlich wird dies bei Vergleich der Werte unter dirty conditions: $1,67 \log_{10}$ - im Vergleich zu $0,00 \log_{10}$ -Stufen. Die Werte unter clean und dirty conditions lassen erkennen, dass höhere Reduktionen (RF) bzw. geringere Restkontaminationen (RC) und Akkumulationen (AF) unter clean conditions im Vergleich zu dirty conditions erzielt wurden. Das 2%ige Produkt F16 wirkte unter geringer organischer Belastung (clean conditions) deutlich besser.

Eine sporizide Wirksamkeit konnte bei dem 20 ml getränktem Wischtuch sowohl für clean als auch für dirty conditions bestätigt werden ($\text{RF} \geq 3 \log_{10}$ -Stufen; $\text{AF} \geq 0,5 \log_{10}$ -Stufen). Bei dem 16 ml getränkten Wischtuch wirkte das Desinfektionsmittel nur unter clean conditions definitionsgemäß sporizid.

III. Produkt F19

Das Produkt F19 basiert ebenfalls auf Peroxidverbindungen (siehe S. 44, Tabelle 9). Die Untersuchungen erfolgten unter hoher und geringer organischer Belastung. Die Neutralisation erfolgte mit Na-Thiosulfat + 0,1% Katalase, da laut Herstellerangaben auch Wasserstoffperoxid entstehen kann. Die Versuche erfolgten in Reproduktion, sofern dies nicht anders ausgewiesen ist.

Die Untersuchungen erfolgten unter Zugabe von Taurocholat im quantitativen Suspensionsversuch nach europäischen Vorbild [CEN, 2009] und im praxisnahen Versuch ohne Mechanik [CEN, 2001]. Geprüft wurden 1% und 2% bei Einwirkzeiten von 5 min und 15 min.

- **Quantitativen Suspensionsversuch / Phase 2, Stufe 1-Test (siehe 2.6.2)**
- **Praxisnaher Test: Flächendesinfektion ohne Mechanik (siehe 2.7.2)**

Tabelle 43: Produkt F19 – Reduktion von *C. difficile*-Sporen als log₁₀-Stufen im quantitativen Suspensionsversuch (EN). Konzentration der Testsuspension (N) in KBE/ml, Konzentration der Wasserkontrolle (KoA) KBE/ml, Taurocholat (TA), Nachweisgrenze (NG), geringe organische Belastung (clean), hohe o. Bel. (dirty)

F19			
N= 1,35 x 10 ⁶ KBE/ml; KoA= 1,26 x 10 ² KBE/ml		mit TA	
Einwirkzeit [min]	Konz. [%]	Reduktion [log ₁₀ -Stufen]	
		clean	dirty
5	1	3,16 ± 0,25	1,58 ± 0,48
	2	4,02 ± 0,09 (NG)	4,19 ± 0,02 (NG)
15	1	4,12 ± 0,00 (NG)	4,19 ± 0,02 (NG)
	2	4,02 ± 0,09 (NG)	4,19 ± 0,02 (NG)

Tabelle 44: Produkt F19 – Reduktion von *C. difficile*-Sporen als log₁₀-Stufen im praxisnahen Test ohne Mechanik (mit TA). Konzentration der Testsuspension (N) in KBE/ml, Konzentration der Wasserkontrolle (WSH) in KBE/ml, Taurocholat (TA), Nachweisgrenze (NG), geringe organische Belastung (clean), hohe o. Bel. (dirty)

F19			
N= 2,24 x 10 ⁶ KBE/ml; WSH= 1,29 x 10 ⁵ KBE/ml		mit TA	
Einwirkzeit [min]	Konz. [%]	Reduktion [log ₁₀ -Stufen]	
		clean	dirty
5	1	3,68 ± 0,32	2,32 ± 0,41
	2	4,11 ± 0,11	3,20 ± 0,36
15	1	3,74 ± 0,06	4,12 ± 0,06 (NG)
	2	4,09 ± 0,06 (NG)	4,06 ± 0,06 (NG)

Im quantitativen Suspensionsversuch (siehe Tabelle 43) konnte unter Zugabe von Taurocholat (TA) bei 1% - 5 min eine sporizide Wirksamkeit unter clean conditions mit 3,16 log₁₀-Stufen bestimmt werden. Unter hoher organischer Belastung lag die Reduktion deutlich niedriger bei 1,58 log₁₀-Stufen. Ab einer Konzentrations-Zeit-Relation von 2% - 5 min bzw. 1% - 15 min konnten die Testorganismen sowohl bei hoher als auch bei geringer organischer Belastung bis zur Nachweisgrenze reduziert werden.

Im praxisnahen Test ohne Mechanik (siehe Tabelle 44) konnte ebenfalls eine Abhängigkeit der Reduktionen von den Konzentrations-Zeit-Relationen gezeigt werden. Ferner ist der Einfluss der Belastungssubstanzen, mit Ausnahme von dem 1% - 15 min-Wert unter geringer organischer Belastung, schlüssig. Vergleicht man den praxisnahen Test (siehe Tabelle 44) mit dem quantitativen Suspensionsversuch (siehe Tabelle 43) so liegen die Reduktionsfaktoren im quantitativen Test bei 1% - 5 min um 0,52 bzw. 0,74 log₁₀-Stufen niedriger als im praxisnahen Test. Bei den übrigen Konzentrations-Zeit-Relationen lagen die Reduktionsfaktoren im quantitativen Test höher als praxisnahen Test.

• **4-Felder Test – praxisnahe Flächen (siehe 2.7.3)**

Im Folgenden werden kongruente Untersuchungen mit und ohne Taurocholol mit dem 4-Felder Test vorgestellt. Die durchschnittliche Abgabe des Desinfektionsmittels lag bei $8,07 \text{ ml/m}^2 \pm 0,9 \text{ ml}$.

Tabelle 45: Produkt F19 – Reduktionen von *C. difficile*-Sporen als \log_{10} -Einheiten im praxisnahen 4-Felder Test. Konzentration der Testsuspension (N) in KBE/ml, Konzentration der Trocknungskontrollen K_{10} , K_{30} in KBE/25 cm², Taurocholol (TA), Reduktionsfaktor (RF), Restkontamination (RC), Akkumulationsfaktor (AF) in \log_{10} -Einheiten, Nachweisgrenze (NG), geringe organische Belastung [o. Bel.] (clean), hohe o. Bel. (dirty), (A) Sporenernte vom 23.08.2008, Sporizidieprüfung ohne TA, (B) Sporenernte vom 23.08.2008 Sporizidieprüfung mit TA, (C) Sporenernte vom 23.08.2008 (1:100 verdünnt) Sporizidieprüfung mit TA

(A)

F19					
N= $7,15 \times 10^5$ KBE/ml; $K_{0/30} = 6,48 \times 10^5 / 1,04 \times 10^6$ KBE/25cm ²			ohne TA		
Einwirkzeit [min]	o. Bel.	Konz. [%]	RF (Feld 1)	RC (Feld 1)	AF (Feld 2-4)
15	clean	2	$3,50 \pm 0,14$	$2,41 \pm 0,19$	0,62
		WSH- Kontrolle	$2,00 \pm 0,35$	$3,90 \pm 0,33$	3,53
30	dirty	2	$4,16 \pm 0,03$	$1,94 \pm 0,06$	0,90
		WSH- Kontrolle	$2,28 \pm 0,14$	$3,81 \pm 0,23$	3,15

(B)

F19					
N= $1,46 \times 10^8$ KBE/ml; $K_{0/30} = 7,30 \times 10^6 / 1,62 \times 10^7$ KBE/25cm ²			mit TA		
Einwirkzeit [min]	o. Bel.	Konz. [%]	RF (Feld 1)	RC (Feld 1)	AF (Feld 2-4)
15*	clean	2	3,76	3,27	2,54
		WSH- Kontrolle	2,03	5,00	4,46
30*	dirty	2	4,51	2,82	2,39
		WSH- Kontrolle	2,22	5,12	5,02

*orientierende Untersuchung (Einfachbestimmung)

(C)

F19					
N= $1,98 \times 10^6$ KBE/ml; $K_{0/30} = 5,83 \times 10^4 / 5,00 \times 10^4$ KBE/25cm ²			mit TA		
Einwirkzeit [min]	o. Bel.	Konz. [%]	RF (Feld 1)	RC (Feld 1)	AF (Feld 2-4)
15	clean	2	$4,68 \pm 0,03$	0 ± 0	0,35
		WSH- Kontrolle	$1,76 \pm 0,07$	$2,92 \pm 0,03$	2,47
30	dirty	2	$3,86 \pm 0,15$	$0,85 \pm 0,15$	1,14
		WSH- Kontrolle	$2,14 \pm 0,08$	$2,57 \pm 0,08$	2,26

Bei den Untersuchungen in Tabelle (A) und (B) wurde die gleiche unverdünnte Sporensuspension verwendet. Während ohne Taurocholol nur eine Ausgangskeimzahl von $7,15 \times 10^5$ KBE/ml ($3,58 \times 10^4$ KBE/25 cm²) bestimmt werden konnte, konnte unter Zugabe von Taurocholol 2 \log_{10} -Stufen mehr dargestellt werden ($1,46 \times 10^8$ KBE/ml entspricht $7,30 \times 10^6$ KBE/25 cm²).

Vergleicht man die Werte ohne Zugabe von Taurocholol aus Tabelle 45 (A), mit den Werten aus Tabelle 45 (B) unter Zugabe von Taurocholol, so fällt auf, dass die erzielten Reduktionsfaktoren (RF) auf Testfeld 1 vergleichbar sind (2% - 15 min-Wert: 3,50 log₁₀- im Vergleich zu 3,76 log₁₀-Stufen). Die Restkontaminationen (RC) und Akkumulationsfaktoren (AF) liegen dagegen, aufgrund der verbesserten Wiederfindungsrate mit TA, in Tabelle (B) deutlich höher.

In Tabelle (B) und (C) wurde der Einfluss unterschiedlicher Ausgangskonzentrationen unter Zugabe von Taurocholol untersucht. Dabei wurde für das Testprozedere in Tabelle (C) eine verdünnte Sporensuspension eingesetzt, die unter Zugabe von TA einer Ausgangskonzentration von 1,98 x 10⁶ KBE/ml aufwies. Die Untersuchungen zeigten, dass höhere Ausgangskonzentrationen (Tabelle (B)) insbesondere zu erhöhten Restkontamination und damit einhergehend zu vermehrter Verschleppung der Testorganismen ins Umfeld führt (AF). Während unter clean conditions bei einer Einwirkzeit von 15 min und einer Konzentration von 2% (siehe Tabelle 45 (B)) eine Restkontamination (RC) von 3,27 log₁₀-Stufen und eine Verschleppung ins Umfeld (AF) von 2,54 log₁₀-Stufen (ca. 347 KBE/25 cm²) nachgewiesen wurde, konnte bei der geringeren Ausgangskonzentration in Tabelle 45 (C) eine geringere RC von 0 log₁₀-Stufen und ein AF von 0,35 log₁₀-Stufen (ca. 2 KBE/25 cm²) ermittelt werden.

Bei einer üblichen Ausgangskonzentration von ca. 10⁶ KBE/ml und unter Zugabe des zur Germination notwendigen Taurocholols zeigte sich das Produkt F19 unter clean conditions mit einer Konzentrations-Zeit-Relation von 2%-15 min definitionsgemäß (RF ≥ 3 log₁₀-Stufen, AF ≤ 0,5 log₁₀-Stufen) als sporizid wirksam (siehe Tabelle 45 (C)). Unter hoher organischer Belastung (dirty) konnte dem Produkt aufgrund des Akkumulationsfaktors von 1,14 log₁₀-Stufen (ca. 14 KBE/cm²) auch bei 2% - 30 min keine sporizide Wirksamkeit bestätigt werden. Auffällig ist wiederum das Verhältnis von Ausgangskonzentration (N) zu den Kontrollen (K), das nur bei den Untersuchungen mit Taurocholol in Tabelle 45 (B und C) schlüssig ist.

In Tabelle 45 (A), ohne Zugabe von Taurocholol, lag die Ausgangskonzentration bei ca. 3,58 x 10⁴ KBE/25 cm² (7,15 x 10⁵ KBE/ml) während die Kontrollfläche eine Konzentration von 6,48 x 10⁵ KBE/ 25 cm² aufwies. Wie bei Produkt F10 auf Seite 105 beobachtet, wurden auch hier - durch den fehlenden Einfluss des Taurocholols - mehr germinationsfähige Sporen von den Kontrollflächen zurückgewonnen als scheinbar aufgetragen wurden.

3.4.2 *B. subtilis*-Sporen

3.4.2.1 Sporizide Wirksamkeitstestung verschiedener Produkte

Insgesamt wurden 16 Flächendesinfektionsmittel im quantitativen Suspensionsversuch gegenüber Sporen von *B. subtilis* ATCC 6633 geprüft. Die verwendeten Sporen wurden entsprechend der SOP 112 Bonn angereichert (siehe Kapitel 2.4.1). Die Ergebnisse der 16 Produkte sind in Tabelle 28 bis Tabelle 30 zusammengefasst. Im Folgenden werden zwei Flächendesinfektionsmittel mit entsprechenden Praxisversuchen vorgestellt.

Die Untersuchungen erfolgten mit 0,03% Albumin unter geringer organischer Belastung bzw. clean conditions. Die Neutralisation erfolgte mit Na-Thiosulfat. Alle Versuche erfolgten in Reproduktion. Die Wiederfindung der germinationsfähigen Sporen erfolgte auf Trypton-Soja-Agar (TSA).

I. Produkt F16

Bei Produkt F16 handelt es sich um einen Sauerstoffabspalter. Das Produkt wurde auch in Kapitel 3.4.1, in Zusammenhang mit den *C. difficile*-Sporen, detailliert behandelt. Geprüft wurde das Produkt bei einer Konzentrations-Zeit-Relation von 1% - 120 min und 2% - 240 min.

- **Quantitativen Suspensionsversuch/ Phase 2, Stufe 1-Test (siehe 2.6.2)**
- **Praxisnaher Test: Flächendesinfektion ohne Mechanik (siehe 2.7.1)**

Tabelle 46: Produkt F16 - Reduktion von *B. subtilis*-Sporen (ATCC 6633) als log₁₀-Stufen im quantitativen Suspensionsversuch (DGHM) unter geringer organischer Belastung. Konzentration der Testsuspension (N) in KBE/ml, Konzentration der Wasserkontrolle (WSH) in KBE/ml, Nachweisgrenze (NG), geringe organische Belastung (clean)

F16		
N= 1,82 x 10 ⁶ KBE/ml; KoA= 3,02 x 10 ² KBE/ml		
Einwirkzeit [min]	Konz. [%]	Reduktion [log ₁₀ -Stufen] clean
120	1	1,97 ± 0,02
240		4,23 ± 0,03

Tabelle 47: Produkt F16 - Reduktion von *B. subtilis*-Sporen (ATCC 6633) als log₁₀-Stufen im praxisnahen Test ohne Mechanik unter geringer organischer Belastung. Konzentration der Testsuspension (N) in KBE/ml, Konzentration der Wasserkontrolle (WSH) in KBE/ml, Nachweisgrenze (NG), geringe organische Belastung (clean)

F16		
N= 1,26 x 10 ⁶ KBE/ml; WSH= 4,57 x 10 ⁴ KBE/ml		
Einwirkzeit [min]	Konz. [%]	Reduktion [log ₁₀ -Stufen] clean
120	1	1,30 ± 0,28
240		1,83 ± 0,03

Den voranstehenden Tabellen ist zu entnehmen, dass die erhöhten Reduktionsfaktoren (RF) mit den verlängerten Einwirkzeiten korrelieren. Vergleicht man die Reduktionsfaktoren des quantitativen Suspensionsversuch (siehe Tabelle 46) mit den korrespondierenden Werten des praxisnahen Test (siehe Tabelle 47) so wird deutlich, dass die RFs im praxisnahen Versuch (1,30 und 1,83 log₁₀-Stufen) gegenüber im quantitativen Suspensionsversuch (1,97 und 4,23 log₁₀-Stufen) niedriger ausfallen. Dies spricht wiederum für erhöhte

Anforderungen an das Produkt im praxisnahen Test. Dem Produkt konnte im praxisnahen Versuch, mit einer maximalen Reduktion um 1,83 log₁₀-Stufen, keine sporizide Wirksamkeit (3 log₁₀-Stufen) bestätigt werden. Bei der vergleichenden Untersuchung mit *C. difficile*-Sporen R027 konnte dagegen eine sporizide Wirksamkeit im Praxisversuch ohne Mechanik belegt werden (siehe Tabelle 40, S. 108).

II. Produkt F20

Bei Produkt F20 handelt es sich ebenfalls um einen Sauerstoffabspalter (Peroxidverbindung). Geprüft wurden die folgenden Konzentrations-Zeit-Relationen: 1% - 120 min und 1% - 240 min.

- **Quantitativen Suspensionsversuch/ Phase 2, Stufe 1-Test (siehe 2.6.2)**
- **Praxisnaher Test: Flächendesinfektion ohne Mechanik (siehe 2.7.1)**

Tabelle 48: Produkt F20 - Reduktion von *B. subtilis*-Sporen (ATCC 6633) als log₁₀-Stufen im quantitativen Suspensionsversuch (DGHM) unter geringer organischer Belastung. Konzentration der Testsuspension (N) in KBE/ml, Konzentration der Wasserkontrolle (WSH) in KBE/ml, Nachweisgrenze (NG), geringe organische Belastung (clean)

F20		
N= 1,70 x 10 ⁶ KBE/ml; KoA= 3,31 x 10 ² KBE/ml		
Einwirkzeit [min]	Konz. [%]	Reduktion [log ₁₀ -Stufen]
		clean
120	1	0 ± 0,03
240		0 ± 0,05

Tabelle 49: Produkt F20 - Reduktion von *B. subtilis*-Sporen (ATCC 6633) als log₁₀-Stufen im praxisnahen Test ohne Mechanik unter geringer organischer Belastung. Konzentration der Testsuspension (N) in KBE/ml, Konzentration der Wasserkontrolle (WSH) in KBE/ml, Nachweisgrenze (NG), geringe organische Belastung (clean)

F20		
N= 2,02 x 10 ⁶ KBE/ml; WSH= 4,65 x 10 ⁴ KBE/ml		
Einwirkzeit [min]	Konz. [%]	Reduktion [log ₁₀ -Stufen]
		clean
120	1	0,19 ± 0,08
240		1,01 ± 0,02

Das Produkt F20 wies weder im quantitativen Suspensionsversuch (siehe Tabelle 48) noch im praxisnahen Test (siehe Tabelle 49) eine ausreichend sporizide Wirksamkeit (Reduktion von ≥ 3 log₁₀-Stufen) gegenüber *B. subtilis*-Sporen auf. Im Vergleich zu Produkt F16 zeigt sich bei diesem Produkt ein umgekehrtes Bild. Die Reduktionsfaktoren liegen bei diesem Produkt im quantitativen Suspensionsversuch (0 log₁₀-Stufen) im Vergleich zu denen im praxisnahen Test (1,01 log₁₀-Stufen) niedriger.

4. DISKUSSION

Die Wirksamkeitsprüfung chemischer Desinfektionsmittel nach standardisierten Testmethoden ist notwendige Voraussetzung, um in Krankenhäusern und anderen medizinischen Bereichen eine verlässliche Abtötung bzw. Inaktivierung von fakultativ-pathogenen oder pathogenen Mikroorganismen zu gewährleisten [Exner, M., 2007]. In Deutschland werden die Anforderungen an die Hygiene bei der Flächendesinfektion durch Empfehlungen des Robert Koch-Instituts (RKI) geregelt [RKI, 2004]. Diese Empfehlungen, Richtlinien und Merkblätter sind im Infektionsschutzgesetz (IfSG) verankert und sind in dieser oder anderer vergleichbaren Weise umzusetzen [IfSG, 2001, § 4]. In der Empfehlung des RKI zur Flächendesinfektion wird die Notwendigkeit wirksamkeitsgeprüfter Desinfektionsmittel, insbesondere für patientennahe Flächen (Bettgestelle, Nachttische, Toilettenstühle, Türgriffe, Inkubatoren etc.), verdeutlicht. Flächen mit häufigem Hand- und Hautkontakt und Flächen, die für aseptisches Arbeiten vorgesehen sind, sollen gemäß der Empfehlung routinemäßig mit wirksamkeitsgeprüften und gelisteten Desinfektionsmitteln behandelt werden. Das RKI verweist dabei auf die Desinfektionsmittel-Liste des VAH [RKI, 2004].

Die Problematik besteht darin, dass sporizide Desinfektionsmittel weder in der VAH-Liste noch in Desinfektionsmittel-Listen anderer europäischer Länder aufgeführt werden, da entsprechende Prüfvorschriften bzw. Prüfnormen bislang fehlen [VAH, 2009].

Durch die stark zunehmende Inzidenz *Clostridium-difficile*-assoziierter-Diarrhoe (CDAD) und der Verbreitung des hypervirulenten *C. difficile*-Stammes PCR-Ribotyp 027 [RKI, 2007a; b; 2008c] wurde der Druck, der dringenden Notwendigkeit abgestimmter, standardisierter Testverfahren zur Prüfung sporizider Desinfektionsmittel, auf das europäische Komitee zur Normierung (CEN) enorm erhöht.

Aufgrund des derzeitigen Wissenstands zur Sporizidie empfiehlt das RKI zur Flächendesinfektion, bei Patienten mit Durchfällen und einem toxinpositiven *Clostridium-difficile*-Befund, ganz allgemein den Einsatz von Oxidationsmittel wie z.B. Peressigsäure und Natriumhypochlorit [RKI, 2008d]. Auf eine wünschenswerte, qualitätsgesicherte Listung sporizider Desinfektionsmittel für den Anwender kann bis dato, wegen der zuvor beschriebenen Problematik, nicht verwiesen werden.

Welch entscheidenden Einfluss der Einsatz adäquater sporizider Desinfektionsmittel auf das Infektionsgeschehen in Krankenhäusern hat, wurde inzwischen in diversen Studien belegt (siehe Kapitel 4.3.4).

Im Folgenden wird die Erarbeitung eines Testverfahrens zur standardisierten Überprüfung sporizider Flächendesinfektionsmitteln vorgestellt und diskutiert.

4.1 Auswahl eines geeigneten Sporenanreicherungsverfahrens

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Sporenbildung des aeroben Sporenbilders *Bacillus subtilis* und des anaeroben Sporenbilders *Clostridium difficile* untersucht. Im Fokus stand der hypervirulente Hyperendemiestamm *C. difficile* PCR-Ribotyp 027, der aktuell gehäuft mit schweren Verlaufsformen in Verbindung gebracht wird.

4.1.1 Anforderungen an das Sporulationsverfahren

Für die Testung sporizider Desinfektionsmittel ist die Verfügbarkeit eines adäquaten Sporenanreicherungsverfahrens zur Bildung bakterieller Sporen Grundvoraussetzung. Das Anreicherungsverfahren sollte dabei im Wesentlichen folgende Punkte erfüllen:

- 1) Bildung stabiler, ruhender Sporen
- 2) hoher Sporenanteil ($\geq 80\%$)
- 3) hohe Sporenausbeute ($\geq 10^6$ Sporen/ml in großem Endvolumen)
- 4) hohe Homogenität der Sporensuspension (keine Aggregate)
- 5) geringer Anteil an Zellfragmenten (Zelldebris)
- 6) hohe Praktikabilität (Zeitaufwand, Durchführbarkeit)
- 7) hohe Reproduzierbarkeit des Anreicherungsverfahrens

4.1.1.1 Sicherstellung valider Sporensuspensionen

Die Festlegung auf eine einheitliche Sporenanreicherungsmethode zur Wirksamkeitstestung sporizider Desinfektionsmittel ist von entscheidender Bedeutung, da Änderungen der Sporulationskonditionen einen signifikanten Einfluss auf die Sporeneigenschaften und somit auch auf die sporizide Wirksamkeitstestung haben können [Hodges, N. A. *et al.*, 1980; Perez, J. *et al.*, 2005].

In einer Studie von R. Rose [Rose, R. *et al.*, 2007] wurde beispielsweise gezeigt, dass die Anreicherung auf Agar zu resistenteren Sporen führen kann als in einem identischen Flüssigmedium. Auch das für die Sporulationsmedien verwendete Wasser wird häufig als Einflussfaktor in der derzeit verfügbaren Literatur [Knott, A. G. *et al.*, 1997] und innerhalb europäischen Gremien, wie der Sporicidal Task Group (SpoTG), diskutiert.

Da selbst bei scheinbar gleich bleibenden Sporulationskonditionen unterschiedliche Sporeneigenschaften nicht völlig ausgeschlossen werden können, wird für die europäischen Standards eine Validierung der Sporensuspension mit Standardsubstanzen gefordert [Hodges, N. A. *et al.*, 1980; CEN, 2005; 2011a]. Die zu erfüllenden Validierungskriterien sollen dabei in einer entsprechenden Norm zur sporiziden Testung chemischer Desinfektionsmittel einfließen, ähnlich wie im Basistest der EN 14347 [CEN, 2005]. Die Validierung der geernteten Suspensionen dient der Qualitätssicherung und soll

gewährleisten, dass für die sporizide Desinfektionsmitteltestung stets Sporen mit vergleichbarer chemischer Resistenz herangezogen werden.

4.1.2 Anreicherungsverfahren für *B. subtilis*-Sporen

Zur Anreicherung der aeroben Sporenbildner *B. subtilis*, wurden vier verschiedene Sporenanreicherungsverfahren miteinander verglichen: SOP 112 Bonn, EN 14347, EN 13704 und OECD (siehe S. 68, Kapitel 3.1). Diese Anreicherungsverfahren stehen derzeit in Europa im CEN TC 216 der SpoTG zur Diskussion und wurden auch für einen orientierenden Ringversuch von Juni 2010 bis Oktober 2010 zur Festlegung des optimalen Anreicherungsverfahrens ausgewählt [CEN, 2011a]. Bei den hier vorgestellten Anreicherungsverfahren kann für die Anreicherung von *B. subtilis*-Sporen auf einen Enzymverdau oder andere Aufkonzentrierungsschritte, wie einer Dichtegradientenzentrifugation [Killick, K. A., 1981], verzichtet werden.

In der Literatur werden häufig Sporenpräparationen für *B. subtilis* beschrieben, die zu deutlich heterogeneren Sporenernten führen und stets eine Enzymbehandlung voraussetzen [Nicholson, W. L. & Setlow, P., 1990; Setlow, B. & Setlow, P., 1996; Takamatsu, H. *et al.*, 2000; Setlow, P., 2006]. Aus diesem Grund werden häufig keine routinemäßigen Desinfektionsmitteltestungen angestrebt, für die ein ausreichendes großes Volumen an Sporensuspension Voraussetzung wäre.

Die Phasenkontrastaufnahmen der vier untersuchten Sporenanreicherungen zeigten charakteristische, lichtbrechende Sporen [Moir, A. & Smith, D. A., 1990]. Dies sprach bei allen Anreicherungsverfahren für die Bildung stabiler und ruhender Sporen (siehe S. 68, Abbildung 23 bis Abbildung 26).

In Tabelle 50 werden die wichtigsten Parameter der Anreicherungsverfahren zur Bewertung der Verfahren noch einmal zusammengefasst:

Tabelle 50: Vergleich der aeroben Sporenanreicherungsverfahren

Methode	Dauer	Aufwand	Ausbeute	Volumen	Homogenität	Reinheit
Bezeichnung	Tage [d]	subjektiv	KBE/ml	Gesamt [ml]	Suspension	Sporenteil
SOP Bonn	3	gering	$6,84 \times 10^9$	70	gut	> 97%
OECD	3	gering	$1,30 \times 10^9$	10	gut	72%
EN 13704	10 - 13	mittel - hoch	$7,70 \times 10^9$	50	gut	> 97%
EN 14347	23	mittel - hoch	$9,32 \times 10^9$	45	mäßig	n.d.

n.d. nicht durchgeführt

4.1.2.1 Beurteilung der Anreicherungen nach SOP 112 Bonn und OECD

Die Sporenanreicherungen gemäß SOP 112 Bonn und OECD erfolgen in Flüssigkultur. Die Anreicherungsprozesse der Methoden dauern drei Tage und sind vom Aufwand gut und einfach durchzuführen. Beide Anreicherungsverfahren führten zu einer hohen Sporenausbeute von $\geq 10^9$ KBE/ml. Die Sporensuspensionen wurden in Wasser aufgenommen und gelagert und zeigten optisch und im mikroskopischen Bild eine sehr gute Homogenität (siehe S. 68, Abbildung 23 und Abbildung 26).

Die Gewährleistung homogener Prüfsuspensionen ist bei der Desinfektionsmitteltestung von entscheidender Bedeutung, um Artefakte bei der Prüfung zu vermeiden

Bei Betrachtung der Reinheitsgrade wird deutlich, dass mit der SOP Bonn-Methode im Vergleich zur OECD-Methode ein deutlich höherer Sporenteil, 97% (Bonn-Methode) im Vergleich zu 72% (OECD-Methode), erzielt werden konnte (siehe Tabelle 50). Diese Beobachtungen decken sich auch mit denen im Ringversuch der Sporicidal Task Group, wo für die SOP Bonn-Methode in unterschiedlichen Laboratorien im Mittel ein Sporenteil von 95% und für die OECD-Methode von 78% ermittelt werden konnte [CEN, 2011a].

4.1.2.2 Beurteilung der Anreicherungen nach EN 13704 und EN14347

Die Anreicherungen gemäß EN 13704 und EN 14347 erfolgen auf Agar (Festmedien) und sind im Vergleich zu den voran vorgestellten Methoden zeit- und materialaufwändiger. Der Anreicherungsprozess der EN 13704 dauert zwischen zwölf und vierzehn Tagen, der Prozess gemäß EN 14347 benötigt 24 Tage. Mit beiden Methoden konnte ebenfalls eine hohe Sporenkonzentration von $\geq 10^9$ KBE/ml erzielt werden (siehe Tabelle 50). Die Sporensuspensionen beider Methoden wurden wiederum in sterilem Wasser (siehe S. 53, Kapitel 2.4.2 und 2.4.3) gelagert.

Ein Unterschied bestand in der Art der Inaktivierung verbliebener vegetativer Zellen. Während die SOP 112 Bonn, OECD und EN 13704 Anreicherungen einer Hitzeinaktivierung unterzogen wurden, erfolgte die Inaktivierung verbliebener vegetativer Formen bei der EN 14347 mit einer Alkoholinaktivierung. Möglicherweise führen geringfügig verbleibende Alkoholreste in der Sporensuspension der EN 14347 zu einer mäßigen Homogenität im Vergleich zu den anderen drei Sporensuspensionen (siehe Tabelle 50). Die Aggregation von Sporen (mäßige Homogenität) zeigte sich auch im mikroskopischen Bild und wurde insbesondere bei alkoholinaktivierten Sporensuspensionen wahrgenommen, sowohl bei *B. subtilis* (siehe S.70, Abbildung 24) als auch bei *C. difficile* (siehe S. 74, Abbildung 30).

Insgesamt konnte mit der EN 13704 eine Sporensuspension mit hohem Reinheitsgrad von >97% erzielt werden. Zu Beachten ist, dass die Anreicherung im Vergleich zur Vorschrift geringfügig modifiziert wurde und die Anreicherung ausgehend von vegetativen Zellen anstelle von Sporen erfolgte (siehe Kapitel 2.4.3, S. 54). Die Methode nach EN 14347 zeigte

im Vergleich zur EN 13704 unerwünschte Zellfragmente (vergleiche S. 70, Abbildung 24 und Abbildung 25). Auch hier decken sich die Resultate des SpoTG-Ringversuchs mit den hier gewonnenen Erkenntnissen. Im Ringversuch konnte mit der EN 13704 Methode in den einzelnen Laboratorien hohe Sporenreinheiten von 80 – 95% erzielt werden. Der Sporenanteil in den Suspensionen nach EN 14347 variierte in den teilnehmenden Laboratorien zwischen 50 – 95% [CEN, 2011a].

4.1.2.3 Zusammenfassende Beurteilung der aeroben Anreicherungsverfahren

Wie in dieser Arbeit zeigten sich auch im Ringversuch der Sporicidal Task Group (SpoTG) die Verfahren gemäß SOP 112 Bonn bzw. EN 13704 als die effektivsten und praktikabelsten Methoden zur Anreicherung von *B. subtilis*-Sporen für Desinfektionsmitteltestungen (siehe Tabelle 50) [CEN, 2011a]. Ein Nachteil der SOP Bonn-Methode im Vergleich zur EN 13704 Methode stellt die derzeit fehlende Anpassung der Anreicherung an *B. cereus* dar.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass für die Sporulationsmedien ebenso demineralisiertes Wasser verwendet werden kann. Ein direkter Vergleich zwischen zwei unterschiedlichen Wasserqualitäten zur Anreicherung wurde in Kapitel 3.1.1 vorgestellt und zeigte keinen signifikanten Unterschied. Wie in Kapitel 4.1.1.1 beschrieben wird das verwendete Wasser für die Sporulationsmedien häufig als Einflussfaktor beschrieben [Knott, A. G. *et al.*, 1997], was sich in den hier gewonnenen Erkenntnissen nicht bestätigte. Innerhalb der SpoTG wurde zu diesem Punkt am 3. November 2010 ebenfalls eindeutig Stellung genommen und eine Resolution gefasst in der es heißt: „No requirement for cell culture water. For culture media, the water shall be freshly glass-distilled or deionised water“ [CEN, 2011a].

Ein Vergleich der Inaktivierungsarten von verbliebenen vegetativen Zellen (Hitzeinaktivierung, Alkoholinaktivierung) wurde ebenfalls vorgestellt und besprochen (siehe Kapitel 4.1.2.2). Weitere Ausführungen zu diesem Punkt werden im Kapitel 4.1.4.3 detaillierter diskutiert.

4.1.3 Anreicherungsverfahren für *C. difficile*-Sporen

Im Fokus der Arbeit stand die Sporenanreicherung und Etablierung der Sporizidieprüfung von *C. difficile*. Die deutlich zunehmende Inzidenz von *C. difficile* und das gehäufte Auftreten schwer verlaufender CDAD mit erhöhten Mortalitätsraten [Miller, M. A. *et al.*, 2002; Eggertson, L., 2005; Redelings, M. D. *et al.*, 2007; Karas, J. A. *et al.*, 2010] hat die Relevanz einer validen und qualitätsgesicherten Sporizidieprüfung für diesen Testorganismus maßgeblich verstärkt. Während bislang die Erarbeitung von Prüfnormen für aerobe Sporenbilder im Mittelpunkt stand, wurde für den humanmedizinischen Bereich im CEN TC 216 der Working Group (WG) 1, aufgrund dieser dramatischen Entwicklung, die Erarbeitung von Testverfahren für praxisrelevante *C. difficile*-Sporen gefordert. Im Jahre 2008 wurde von

dieser Arbeitsgruppe (WG1) eine Resolution getroffen, in der es heißt: „CEN/TC 216/WG1 needs a sporidical test procedure for anaerobic spores (*Clostridium difficile*)...“ [CEN, 2008]. Aus diesem Grund und mit dem Ziel Anwendungsempfehlungen für den Ausbruchsfall zur Hand zu haben wurde im Rahmen dieser Arbeit der Schwerpunkt auf die Sporizidieprüfung von *C. difficile* Ribotyp 027 gelegt.

Im ersten Teil der Arbeit erfolgte die Überprüfung und Optimierung des Anreicherungsverfahrens von *C. difficile*-Sporen gemäß SOP 156 Bonn. Vergleichende Untersuchungen erfolgten später mit einer Methode des Robert Koch-Instituts. Die RKI-Methode wurde auf Basis der SOP Bonn-Methode modifiziert und unterscheidet sich im Wesentlichen in zwei Punkten:

1. Verwendung einer standardisierten Hirn-Herz-Bouillon (BHI) statt einer Hackfleisch-Bouillon
2. Alkoholinaktivierung und Lagerung der Sporen in 50%igem Ethanol statt Hitzeinaktivierung und Lagerung der Sporen in sterilem Wasser

Insgesamt sind die Anreicherungsverfahren für *C. difficile* deutlich aufwändiger und komplexer, als die Anreicherungsverfahren für die aeroben Sporenbildner und bedürfen einer gewissen Erfahrung im Umgang in anaeroben Mikroorganismen.

Zur Beurteilung der beiden Anreicherungsverfahren werden für einen besseren Vergleich in Tabelle 51 die wichtigsten Parameter zusammengefasst.

Tabelle 51: Vergleich der anaeroben Sporenanreicherungsverfahren

Methode Bezeichnung	<i>C. difficile</i> Stamm	Dauer Tage [d]	Aufwand subjektiv	Ausbeute KBE/ml*	Volumen Gesamt [ml]	Homogenität Suspension	Reinheit Sporenteil
SOP Bonn	Ribotyp 027	21	mittel-hoch	$1,59 \times 10^8$	30	gut	90%
	Ribotyp 027 RKI			$1,01 \times 10^8$	30	gut	85%
	Ribotyp 001			$1,10 \times 10^8$	30	gut	79%
	Ribotyp 046			$9,55 \times 10^8$	30	gut	94%
	ATCC 9689			$1,95 \times 10^7$	20	gut	58%
RKI Methode	Ribotyp 027	21	mittel-hoch	$2,4 \times 10^6$	40	gut	78%
	ATCC 9689			$1,1 \times 10^6$	40	gut	22%

* Bestimmung der KBE/ml mit GSBHI (+TA)

4.1.3.1 Beurteilung der Anreicherung nach SOP 156 Bonn

Die Anreicherung mit der optimierten SOP Bonn-Methode (siehe S. 56, Kapitel 2.4.5) zeigte gute und reproduzierbare Resultate. Die Anreicherung mit dem *C. difficile*-Ribotyp 027 wurde insgesamt 11-mal durchgeführt und zeigte nur geringfügige Schwankungen (siehe S. 76, Tabelle 16). Im Mittel konnte für den *C. difficile*-Ribotyp 027 eine Sporenpureinheit von 90%

ermittelt werden. Die Sporenausbeute unter Verwendung des GSBHI-Agars mit Taurocholat (TA) lag im Durchschnitt bei 1×10^8 KBE/ml.

Eine stichprobenartige Überprüfung ergab, dass die Sporenanreicherungen anderer Subtypen (R001, R046) bzw. Patientenstämme (R027 RKI) mit dieser Methode ebenfalls möglich sind. Wie aus Tabelle 51 ersichtlich, konnte mit anderen Subtypen beim Vergleich der Ausbeute und der Reinheit ähnliche Resultate erzielt werden, die ebenfalls einen geforderten Sporenanteil von $\geq 80\%$ ermöglichten. Auffallend war die deutlich schlechtere Sporulationsrate mit dem Laborstamm ATCC 9689, die sich insbesondere in der Reinheit mit einem Sporenanteil von 58% im mikroskopischen Bild der Suspensionen niederschlug (siehe S. 80, Abbildung 36).

Dieses Phänomen, dass unterschiedliche *C. difficile*-Stämme zu unterschiedlichen Sporulationsraten führen können, wurde bereits mehrfach in der Literatur beschrieben [Haraldsen, J. D. & Sonenshein, A. L., 2003; Fawley, W. N. *et al.*, 2007; Akerlund, T. *et al.*, 2008; Burns, D. A. *et al.*, 2010; Merrigan, M. *et al.*, 2010]. T. Akerlund *et al.* [2008] und M. Merrigan *et al.* [2010] stellten ebenfalls fest, dass hypervirulente Stämme, wie der Ribotyp 027 (R20291), eine erhöhte Sporulation aufweisen. Die geringfügige Sporulationsrate des Typstamms ATCC 9689 lässt sich nach J.D. Haraldsen und A.L. Sonenshein [2003] darüber hinaus auf eine fehlende skin^{Cd}-Sequenz im sigK Gen zurückführen (Genotyp sigK, skin^{Cd}). In der Studie [Haraldsen, J. D. & Sonenshein, A. L., 2003] zeigte sich diese Sequenz als essentiell für eine effiziente Sporulation.

Die vorliegenden Sporen zeigten im mikroskopischen Bild ihre typisch lichtbrechende Eigenschaft, die auf ruhende so genannte „*dormant*“ Sporen hinwies (siehe Kapitel 3.2). Im Vergleich zu den *B. subtilis*-Suspensionen wiesen die Sporensuspensionen von *C. difficile* zum Teil einen deutlich höheren Anteil von Zellfragmenten auf. Durch einen anschließenden Enzymverdau konnte die Sporenreinheit und die Reduktion von Zellfragmenten jedoch noch weiter optimiert werden (siehe Kapitel 4.1.4.1).

4.1.3.2 Beurteilung der Anreicherung nach RKI-Methode

Die Anreicherung gemäß der RKI-Methode führte mit $2,4 \times 10^6$ KBE/ml im Vergleich zur SOP Bonn-Methode mit $1,59 \times 10^8$ KBE/ml zu deutlich geringeren Sporenausbeuten. Wie bei der SOP Bonn-Methode zeigte sich auch mit der RKI-Methode eine deutlich schlechtere Sporulationsrate mit dem Laborstamm ATCC 9689 (22% im Vergleich zu 78%), was die Aussagen von J.D. Haraldsen und A. L. Sonenshein [2003] zu diesem Typstamm nochmals bekräftigte. Auffallend war bei der Anreicherung des Ribotyps 027 die Diskrepanz zwischen kultivierbaren Sporen ($2,4 \times 10^6$ KBE/ml) und den tatsächlichen Sporenanteil in der Suspension ($2,69 \times 10^8$ GZZ/ml). Die Rekultivierbarkeit der germinationsfähigen Sporen müsste nach den hier gewonnenen Erkenntnissen noch optimiert werden, weder mit BHA-

Agar noch mit GSBHI-Agar und der Zugabe von Taurocholat konnte hier die Wiederfindungsrate der Sporen verbessert werden.

4.1.3.3 Zusammenfassende Beurteilung der anaeroben Anreicherungsverfahren

Das Anreicherungsverfahren gemäß SOP 156 Bonn wurde eingehend untersucht und zeigte sehr gute reproduzierbare Ergebnisse, die zu Sporenausbeuten von 10^7 bis 10^8 KBE/ml führten und ohne Enzymverdau eine Sporenreinheit von im Mittel 90% aufwiesen. Durch einen zusätzlichen Enzymverdau gemäß der Sattar-Vorschrift [Perez, J. *et al.*, 2011] kann die Sporenreinheit darüber hinaus bis hin zu einer Reinheit von 99% optimiert werden.

Die Verwendung der Hackfleisch-Bouillon der SOP 156 Bonn wurde gezielt auf Basis vorangegangener Untersuchungen ausgewählt und nicht modifiziert [Achenbach, B., 2001].

Die spezielle Hackfleisch-Bouillon führt zu einem optimierten Wachstum von *C. difficile* und wird beispielsweise auch in ähnlicher Form von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) zur Anzucht von *C. difficile* empfohlen.

Die RKI-Methode, die eine standardisierte BHI-Bouillon statt der Hackfleisch-Bouillon verwendet, wurde erst zu einem späteren Zeitpunkt in dieser Arbeit untersucht und müsste hingehend der Reproduzierbarkeit, Sporulationsrate, Praktikabilität weiter untersucht werden. Erste vergleichende Untersuchungen zeigten jedoch im direkten Vergleich eine geringere Sporulationsrate, die möglicher Weise mit diesem initialen Schritt zusammenhängt.

4.1.4 Spezielle Erkenntnisse zu den Anreicherungsverfahren

4.1.4.1 Enzymverdau zur Optimierung der *C. difficile*-Sporensuspensionen

Zu Optimierung und Aufreinigung von Sporensuspensionen sind unterschiedliche Verfahren bekannt wie Enzymverdau [Grecz, N. *et al.*, 1962; Nicholson, W. L. & Setlow, P., 1990; Perez, J. *et al.*, 2011], Dichtegradientenzentrifugation [Killick, K. A., 1981] oder Acetat-Phenol-SDS-Aufschluss [Rieder, T., 2006]. Ein Nachteil der beiden zuletzt genannten Aufreinigungsverfahren ist häufig ein hoher Verlust an Sporen von bis zu 94%. Zudem sind diese Verfahren häufig nur für kleinste Volumina (ca. 1 ml) validiert [Rieder, T., 2006]. Bei einem Enzymverdau ist dagegen der Verlust der Sporen deutlich geringer (ca. 23%) [Rieder, T., 2006]. Während für die Anreicherung von *B. subtilis*-Sporen auf einen zusätzlichen Aufreinigungsschritt verzichtet werden kann, ist ein Enzymverdau bei der Bereitstellung von *C. difficile*-Sporen abzuwägen. Die SOP Bonn-Methode zur Anreicherung von *C. difficile*-Sporen führte bereits ohne zusätzlichen Aufreinigungsschritt zu sehr hohen Sporenausbeuten und –reinheiten (siehe S. 76, Tabelle 16). Dennoch ist abschließend für eine Optimierung der Sporenreinheit und zur Minimierung vorhandener Zellfragmente ein zusätzlicher Enzymverdau gemäß der Sattar-Methode zu empfehlen. In dieser Arbeit konnte

der Sporenteil in einer Sporensuspension von 96% auf 99% optimiert werden (siehe S. 75, Abbildung 31).

4.1.4.2 Optimierter Nachweis von *C. difficile*-Sporen

In der Regel wird zum Nachweis von *C. difficile* aus Stuhlproben oder von Oberflächen CCFA [George, W. L. *et al.*, 1979; Buggy, B. P. *et al.*, 1983; Wilson, K. H., 1983; Clabots, C. R. *et al.*, 1991] oder CLO Agar [Rousseau, C. *et al.*, 2010] verwendet. Diese Agarmedien sind für den Nachweis von ruhenden *C. difficile*-Sporen in Suspensionen und zum Nachweis nach einer Desinfektionsmitteltestung ungeeignet [Gould, G. W., 1984; Russell, A. D., 1990; 1998; Perez, J. *et al.*, 2011].

In dieser Arbeit wurde ein nährstoffreicher GSBHI-Agar [Nakamura, S. *et al.*, 1985] unter Zusatz von Taurocholat (TA) und Lysozym verwendet. Wie aus Tabelle 15 auf Seite 75 hervorgeht konnte durch die Zugabe von 1 g/l (0,1%) Taurocholat die Wiederfindungsrate, um das 100-fache ($2 \log_{10}$ -Stufen) erhöht werden. Die Zugabe von 10 mg/l Lysozym führte ebenfalls nachweislich zu einer Steigerung der Wiederfindungsrate (ca. $0,5 \log_{10}$ -Stufen). Diese Beobachtungen zu Taurocholat [Wilson, K. H., 1983; Buggy, B. P. *et al.*, 1985; Sorg, J. A. & Sonenshein, A. L., 2008] und Lysozym [Labbe, R. G. & Chang, C. A., 1995; Wilcox, M. H. *et al.*, 2000] deckten sich dabei mit den Angaben aus der Literatur. Unter Zugabe von 0,1% Taurocholat im Nährmedium finden die *C. difficile*-Sporen ähnliche Bedingungen wie im Dünndarm des menschlichen Körpers vor und keimen aus [Northfield, T. C. & McColl, I., 1973; Sorg, J. A. & Sonenshein, A. L., 2008]. J. A. Sorg und A. L. Sonenshein [2008; 2009] zeigten, dass die Verwendung anderer Gallensalze wie Chenodesoxycholat, Glycocholat nicht geeignet sind.

Parallel zu dem standardmäßig eingesetzten Nährmedium GSBHI(TA) wurde ein weiteres potentiell Nährmedium BHIS(TA) untersucht [Sorg, J. A. & Sonenshein, A. L., 2008; 2009; Perez, J. *et al.*, 2011], das sich in der Wiederfindungsrate von *C. difficile*-Sporen vergleichbar zeigte (siehe Tabelle 15). Ohne Taurocholat war die Wiederfindungsrate der germinationsfähigen Sporen im GSBHI-Agar ($5,21 \times 10^5$ KBE/ml) um ca. $2 \log_{10}$ -Stufen höher im Vergleich zum BHIS-Agar ($2,68 \times 10^3$ KBE/ml), so dass aufgrund dieser Erkenntnisse die Verwendung des GSBHI-Agar plus Taurocholat plus Lysozym favorisiert wurde.

4.1.4.3 Hinweise zur Inaktivierung vegetativer Zellen und Lagerung der Sporen

Zur Inaktivierung verbliebener vegetativer Formen werden in der Regel Hitze- oder Alkoholinaktivierungen durchgeführt. Die Hitzeinaktivierung erfolgt gewöhnlich zwischen 70°C und 80°C für zehn Minuten im Wasserbad. Bei der Alkoholinaktivierung ist die Inkubation der Sporen in 65% 2-Propanol über eine Inkubationszeit von drei Stunden [CEN, 2005] oder eine dauerhafte Lagerung in 50% Ethanol (siehe S. 57 Kapitel 2.4.6) bekannt.

Die Alkoholinaktivierung gemäß EN 14347 in 2-Propanol und der anschließenden Lagerung in Wasser führte im Vergleich zu den hitzeinaktivierten Sporensuspensionen zu gehäuften Aggregatbildungen (siehe Abbildung 24 und Abbildung 30). Vermutlich führten kleinste Alkoholreste in der Sporensuspension zur Aggregationsneigung der Sporen. Beim Vergleich der Widerstandsfähigkeit im quantitativen Suspensionsversuch gegenüber Glutaraldehyd konnte kein Unterschied zwischen den alkoholinaktivierten *C. difficile*-Sporen und den hitzeinaktivierten *C. difficile*-Sporen festgestellt werden (siehe S. 89, Tabelle 25).

Die Sporen gemäß der RKI-Methode wurden in 50%igem Ethanol gelagert und mussten vor jeder Desinfektionsmittelprüfung portionsweise in sterilem Wasser gereinigt und bereitgestellt werden. Zwar konnte in der aufgereinigten Suspension keine vermehrte Aggregationsneigung festgestellt werden, doch ist der zusätzliche Arbeitsaufwand und die zum Teil variierende Ausgangskeimzahl, durch Verluste während der Aufreinigungsschritte, nachteilig zu bewerten.

Die Hitzeinaktivierung ist von der Durchführung und im Hinblick auf die spätere Nutzung für sporizide Prüfungen deutlich unkomplizierter und weniger fehleranfällig. Die Suspensionen wiesen keine Aggregationsneigung auf und standen durch die Lagerung in sterilem Wasser umgehend für Untersuchungen bereit (siehe z.B. Abbildung 29). Darüber hinaus konnten keine Unterschiede in der Widerstandsfähigkeit der Sporen festgestellt werden. Die Arbeitsgruppe von S. Sattar [Perez, J. *et al.*, 2011] postuliert ebenfalls die Hitzeinaktivierung für *C. difficile*-Sporen. Eine Lagerung der Sporen in Wasser bei 4°C ist für mindestens zwei Jahre möglich [CEN, 2011a; Perez, J. *et al.*, 2011]. Auch in dieser Arbeit wurden bis zu zwei Jahre alte Sporensuspensionen verwendet, ohne einen signifikanten Verlust in der Sporenausbeute zu beobachten. Für langfristige Lagerungen (4°C) der Sporen von bis zu fünf Jahren empfiehlt J. Perez [2011] die Aufbewahrung in 50%igen Ethanol.

Unter Berücksichtigung der Für und Wider der einzelnen Inaktivierungsmethoden ist aufgrund der hier gewonnenen Erfahrungen eine Hitzeinaktivierung und Lagerung der Sporen bei 4°C in sterilem Wasser zu empfehlen, insbesondere vor dem Hintergrund dass das Volumen der Sporensuspensionen in der Regel nie länger als zwei bis drei Jahre für routinemäßige Desinfektionsmitteltestungen ausreichen würde.

4.2 Auswahl der geeigneten Endosporen

Bei der Flächendesinfektion ist für die Festlegung geeigneter Desinfektionsmaßnahmen die Empfehlung des Robert Koch-Instituts [RKI, 2004] und die im Rahmen der Biozidrichtlinie geforderte Risikoeinschätzung gegenüber Mensch, Tier und Umwelt zu berücksichtigen [Biozidrichtlinie, 1998; Biozidgesetz, 2002; RKI, 2004]. Die Werte der maximalen Arbeitsplatzkonzentration (MAK) sollten bei ausreichender Belüftung nicht überschritten werden [BMAS, 2006], um Personal- und Patientenunzuträglichkeiten vorzubeugen

[Waclawski, E. R. *et al.*, 1989; Di Stefano, F. *et al.*, 1999; Ravis, S. M. *et al.*, 2003]. Darüber hinaus gilt es auch die Materialverträglichkeit gemäß den Anforderungen der Bundesanstalt für Materialforschung und –prüfung (BAM) zu beachten.

Aus diesen Gründen reicht es nicht aus, bei gehäuftem Auftreten von *Clostridium-difficile*-Infektionen (CDI), prophylaktische Flächendesinfektionsmaßnahme mit einer besonders resistenten bakteriellen Spore zu validieren. Vielmehr sollte die Wirksamkeitsprüfung auf eine Endospore ausgerichtet sein, die für den humanmedizinischen Bereich relevant ist und zugleich ein ausreichend großes Sicherheitslevel gemäß EN 14885 und EN 13704 [CEN, 2002; 2007a] bietet.

Im konkreten Fall wird nach einem Flächendesinfektionsverfahren gesucht, das gegen anaerobe Sporenbilder wirksam ist.

4.2.1 Chemoresistenzvergleich: *B. subtilis*- und *C. difficile*-Sporen

Im Rahmen der Untersuchungen sollte festgestellt werden, ob die aeroben *B. subtilis*-Sporen und die Sporen des anaeroben, praxisrelevanten *C. difficile*-Stammes Ribotyp 027 in Bezug auf Standardsubstanzen und handelsübliche Wirkstoffe vergleichbare Widerstandsfähigkeiten aufweisen.

Für den Vergleich der Widerstandsfähigkeit gegenüber Standardsubstanzen wurden die in vorangegangenen europäischen Ringversuchen etablierten Substanzen Glutaraldehyd 50% (Protectol GA 50, Firma BASF) und Peressigsäure 5% (PAA 5/25, Firma Bactria) herangezogen. Diese Standards hatten sich auch in zwei Ringversuchen, die vom VAH im Rahmen der Validierung von quantitativen Suspensionsversuchen gegenüber *S. aureus* und *C. albicans* durchgeführt wurden, bewährt [Uhlig, S. *et al.*, 2009; Uhlig, S. *et al.*, 2010].

Wie in Kapitel 3.3 dargestellt, zeigten die Ergebnisse mit dem Glutaraldehyd-Standard, dass sich die *B. subtilis*-Sporen (siehe S. 83, Abbildung 41) im Vergleich zu den *C. difficile*-Sporen (siehe S. 92, Abbildung 43) deutlich widerstandsfähiger gegenüber Glutaraldehyd verhalten. A.D. Russel [1990] berichtet ebenfalls, dass die Sporen von *B. subtilis* und *B. pumilus* sich durch eine besonders hohe Resistenz gegenüber Glutaraldehyd auszeichnen.

Dem gegenüber stehen die korrespondierenden Inaktivierungskinetiken mit Peressigsäure. Beim Vergleich der Abbildung 42 (S. 85) und Abbildung 44 (S. 93) ist nur eine geringfügig höhere Widerstandsfähigkeit der *B. subtilis*-Sporen (SOP 112 Bonn) gegenüber Peressigsäure erkennbar. Insgesamt zeigten sich die *B. subtilis*-Sporen gegenüber den ausgewählten Standardsubstanzen, insbesondere gegenüber Glutaraldehyd, widerstandsfähiger als die *C. difficile*-Sporen.

Parallel zu den Standardsubstanzen sollte ein Chemoresistenzvergleich im quantitativen Suspensionsversuch gegenüber handelsüblichen Wirkstoffen erfolgen (siehe Kapitel 3.3.3, Tabelle 28 bis Tabelle 30). Insgesamt ist ein Chemoresistenzvergleich zwischen *B. subtilis*-

und *C. difficile*-Sporen für sechs Wirkstoffgruppen möglich: (1) Aldehyde, (2) Aldehyde + quaternäre Verbindungen, (3) chlorabspaltende Verbindungen, (4) Chloramide, (5) Peroxidverbindungen, (6) quaternäre Verbindungen + Aldehyde. Bei allen Wirkstoffgruppen zeigten sich die *B. subtilis*-Sporen gegenüber den Desinfektionsmitteln zum Teil deutlich widerstandsfähiger als die *C. difficile*-Sporen des Subtyps 027 [Büttgen, S. *et al.*, 2008a]. Während eine Studie von M. Votava und B. Slitrova [2009] die erhöhte Chemoresistenz der *B. subtilis*-Sporen bestätigt, konnten C. Block [2004] und J. Perez [2005] keinen gravierenden Unterschied in der Widerstandsfähigkeit der beiden Sporen feststellen. Die Universität Schleswig-Holstein kam dagegen zum Schluss, dass die *C. difficile*-Sporen des Ribotyps 027 resistenter sind als die *B. subtilis*-Sporen und dass generell stammspezifische Unterschiede in der sporiziden Wirksamkeit vorliegen [Martin, M., 2010]. Insgesamt sind nur wenige vergleichende Daten in der Literatur verfügbar. Erschwerend kommt hinzu, dass sich die Studien häufig in den Sporenanreicherungsverfahren, den Nachweis germinationsfähiger Sporen und den Prüfmethode unterscheiden und somit einen Vergleich ohnehin nur bedingt ermöglicht (siehe Kapitel 4.1.1.1).

4.2.2 *C. difficile* als Surrogat für Desinfektionsmitteltestungen

In der vorliegenden Arbeit zeigten sich die aeroben *B. subtilis*-Sporen im Vergleich zu den Sporen von *C. difficile* Ribotyp 027 deutlich widerstandsfähiger gegenüber 15 verschiedenen handelsüblichen Wirkstoffen bzw. sechs verschiedenen Wirkstoffgruppen (siehe Tabelle 28 bis Tabelle 30). In der Literatur werden zum Teil kontroverse Studien zum Chemoresistenzvergleich vorgestellt (siehe Kapitel 4.2.1), die damit nochmals eine standardisierte Sporizidieprüfung gegenüber humanmedizinisch relevanten Sporen von *C. difficile*, wie vom CEN TC 216 gefordert, unterstreichen.

Durch die Wirksamkeitstestung gegenüber Sporen des *C. difficile* Ribotyp 027 könnte die Desinfektionsmittelprüfung an einen epidemiologisch und infektiologisch relevanten Prüforganismus angepasst werden, der in Kombination mit praxisnahen Prüfmethode ein ausreichendes Maß an Sicherheit bieten würde. Der wesentliche Vorteil einer Sporizidieprüfung gegenüber *B. subtilis*-Sporen liegt in dem deutlich einfacheren Umgang mit diesem apathogenen aeroben Prüforganismus und den deutlich einfacheren Sporenanreicherungsverfahren (siehe Kapitel 4.1). In der klinischen Praxis sind aerobe *B. subtilis*-Sporen jedoch nahezu unbedeutend. Im Lebensmittelbereich (WG3) wird die Sporizidieprüfung für einen anaeroben Mikroorganismus *Clostridium sporogenes* beschrieben [CEN, 2002]. Die Sporen von *C. sporogenes* erwiesen sich jedoch als weniger resistent im Vergleich zu *C. difficile* und sind zudem für den humanmedizinischen Bereich (WG1) ebenfalls eher nebensächlich.

Die epidemiologisch und praxisrelevanten Sporen von *C. difficile* Ribotyp 027 eignen sich als Surrogat für die Sporizidieprüfung insbesondere aus den folgenden Gründen:

1. Eine positive sporizide Wirksamkeit gegenüber einer praxisfernen *B. subtilis*-Spore, die möglicherweise keinen eindeutigen Rückschluss auf eine sporizide Wirksamkeit gegenüber einer praxisrelevanten *C. difficile*-Spore zulässt, wie von M. Martin [2010] beschrieben, würde vermieden.
2. Der Ribotyp 027 verfügt über eine gute Sporulationseigenschaft und lässt sich mit dem vorgestellten Anreicherungsverfahren intralaboratoriell mit hoher Qualität reproduzierbar anreichern.
3. Sporen des praxisrelevanten Ribotyps 027 sind chemoresistenter als der Typstamm *C. difficile* ATCC 9689 (siehe S.94, Kapitel 3.3.3) und weisen somit ein höheres Sicherheitsmaß auf.
4. **Die prophylaktische Desinfektionsmaßnahmen könnten an diese relevante *C. difficile*-Spore angepasst werden, so dass zum Teil im Vergleich zu einer Anpassung der Verfahren an *B. subtilis*-Sporen, eine deutliche Reduzierung der Konzentrations-Zeit-Relationen, ohne Sicherheitsverlust in der Praxis, möglich wäre [Büttgen, S. et al., 2008a].**

Der zuletzt genannte Punkt wird aufgrund des in Kraft getretenen Biozidgesetzes gerade im Bereich der prophylaktischen Desinfektion zunehmend von Bedeutung sein, da entsprechend dem Minimierungsgebot nur soviel Biozid auf die Flächen aufgetragen werden soll, dass ein Infektionsgeschehen unterbunden werden kann. Die Anpassung der Desinfektionsmaßnahmen an praxisrelevante Sporen, die nicht zwangsläufig die resistentesten Sporen sind [Büttgen, S. et al., 2008a; Votava, M. & Slitrova, B., 2009; Lawley, T. D. et al., 2010], kann somit die Patienten- und Personalzutraglichkeit einer Hygienemaßnahme erhöhen und dient zugleich dem Schutz der Umwelt und der Materialoberflächen. In der vorliegenden Arbeit konnte so beispielsweise die Konzentrations-Zeit-Relation des Produkts F10 im Hinblick auf die Patientenzutraglichkeit von 2% - 15 min , welche der Auslobung für *B. subtilis*-Sporen gemäß EN 13704 entsprach, auf 1% - 30 min für eine Wirksamkeit gegenüber *C. difficile*-Sporen reduziert werden (siehe S. 100, Kapitel 3.4.1).

4.2.3 Sporizidieprüfung: Validierung und Qualitätssicherung

Die Festlegung auf eine einheitliche Anreicherungs- und Prüfmethode ist, wie bereits in Kapitel 4.1.1.1 erwähnt, Grundvoraussetzung für eine qualitätsgesicherte Wirksamkeitsprüfung sporizider Desinfektionsmittel. Darüber hinaus ist bei der Sporizidie die Validierung der geernteten Sporensuspensionen, aufgrund der vielen Einflussfaktoren auf die Widerstandsfähigkeit der Sporen [Hodges, N. A. et al., 1980; Knott, A. G. et al., 1997;

Rose, R. *et al.*, 2007], vor der Verwendung für Wirksamkeitstestungen verpflichtend [CEN, 2011a].

Um die Eignung unterschiedlicher Sporensuspensionen für den Einsatz als Indikatororganismen bei der Desinfektionsmitteltestung beurteilen zu können, bietet sich der quantitative Suspensionsversuch ohne organische Belastung an (siehe S. 83, Kapitel 3.3). Dabei werden mit festen Konzentrations-Zeit-Relationen die chemischen Widerstandsfähigkeiten unterschiedlicher Sporensuspensionen mit Standardsubstanzen getestet. Die im Rahmen dieser Studie aufgenommenen Inaktivierungskinetiken für *C. difficile* (siehe S. 92, Abbildung 43 und Abbildung 44), aber auch für *B. subtilis* (siehe S. 83, Abbildung 41 und Abbildung 42), können in der Zukunft zur Validierung der Sporensuspensionen und als Qualitätssicherungskriterium beim Vergleich unterschiedlicher Laborbefunde herangezogen werden. Zur Absicherung dieser Inaktivierungskinetiken bzw. bestimmter Kennwerte sind entsprechende Ringversuche auf europäischer Ebene in Vorbereitung [CEN, 2011a], die Aufschluss über interlaboratorielle Abweichungen geben sollen. Die maximalen intralaboratorielle Standardabweichungen für *C. difficile* lagen bei 0,48 log₁₀-Stufen für Glutaraldehyd und 0,37 log₁₀-Stufen für Peressigsäure (siehe Kapitel 3.3.2.1, S. 92 und S. 93).

Derzeit könnten als Parameter zur Validierung der Sporensuspensionen von *C. difficile*-Sporen im quantitativen Suspensionsversuch ohne organische Belastung die in Tabelle 52 aufgeführten Kenndaten vorgegeben werden (siehe S. 92, Abbildung 43 und Abbildung 44). Eine Absicherung der Richtwerte mit entsprechenden Ringversuchen steht noch aus.

Tabelle 52: Validierung der Sporensuspensionen: Richtwerte zur chemischen Stabilität

Testorganismus [Sporen]	Anreicherungs- methode	Standard- substanz	Konz [%]	Zeit [min]	Richtwert Reduktion log ₁₀ -Stufen
<i>C. difficile</i> Ribotyp 027	SOP Bonn	GA ¹	1	15	< 1
			6		2 - 3
		PAA ²	0,01	15	< 1
			0,04		1,5 - 2,5

GA¹: Glutaraldehydlösung (Firma BASF, Produktname: Protectol GA 50)

PAA²: Peressigsäurelösung (Firma Bactria, Produktname: PES 5/25)

4.2.3.1 Sicherstellung ruhender, stabiler Sporensuspensionen

Die Validierung der Sporensuspensionen mit Standardsubstanzen gab darüber hinaus auch über mögliche Stabilitätsunterschiede hinsichtlich des Alters der Sporen Aufschluss. Unterschiedlich alte Sporensuspensionen wurden unter identischen Bedingungen geprüft und deren Sensitivität gegenüber einer Standardsubstanz verglichen. Dabei wurde deutlich, dass die *C. difficile*-Sporen kurz nach der Sporenernte sensibler gegenüber einer

Wirksamkeitstestung sind. Erst nach einem Zeitraum von knapp zwei Monaten war eine sichere Konstanz in der Widerstandsfähigkeit der Sporen gegenüber Glutaraldehyd gegeben (siehe S. 91, Tabelle 27). **Somit sollten *C. difficile*-Sporensuspensionen erst nach einer zweimonatigen Ruhephase nach der Sporenernte für sporizide Wirksamkeitstestungen herangezogen werden.** Die Sporensuspensionen können dann über einen Zeitraum von mindestens zwei Jahren zur Sporizidieprüfung herangezogen werden (siehe Kapitel 4.1.4.3). Die Beobachtung zur Stabilität entspricht auch den Forderungen von R. Böhm, der eine Lagerung von mind. zwei Wochen für die Bereitstellung von *dormant* Sporen im Basistest vorgegeben hat [CEN, 2005]. Innerhalb der SpoTG wurde sich inzwischen für die aeroben Sporenbildner auf eine Mindestlagerung der Sporensuspensionen von vier Wochen geeinigt, um ruhende und stabile Sporen zu gewährleisten [CEN, 2011a]. Für die *C. difficile*-Sporensuspensionen sollte dagegen die Mindestlagerungszeit auf zwei Monate erhöht werden. Das parallele Mitführen einer Standardsubstanz ist aus qualitätssichernden Gründen zu empfehlen. Die SpoTG empfiehlt vor Gebrauch und mindestens alle zwölf Monate eine Überprüfung der Sporensuspensionen mit Standardsubstanzen [CEN, 2011a].

4.3 Untersuchung von Handelsprodukten

Während die Validierung der unterschiedlichen Sporenanreicherungen, sprich die Überprüfung der chemischen Stabilität der Spore, mit Standardsubstanzen vornehmlich im quantitativen Suspensionsversuch ohne Belastung erfolgt, muss das Untersuchungsspektrum bei Handelsprodukten auf praxisnahe Testmodelle erweitert werden. Sowohl bei den quantitativen Suspensionsversuchen als auch bei den praxisnahen Versuchen ist das Einbeziehen der humanmedizinischen Belastungssubstanzen notwendig [Gebel, J. *et al.*, 2001; CEN, 2007a]. Ferner ist das Mitführen adäquater Neutralisationskontrollen (siehe S. 61, Kapitel 2.6.1.3) und Toxizitätskontrollen (siehe Kapitel 2.6.1.4), so wie sie in den nationalen und europäischen Normen vorgeschrieben werden [Gebel, J. *et al.*, 2001; CEN, 2007a], obligatorisch, um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden [Kampf, G. *et al.*, 2005]. Die Kontrollen sind auch bei den Validierungen der Sporensuspensionen mit Standardsubstanzen zu beachten. Die Neutralisation von Monopräparaten wie Peressigsäure und Glutaraldehyd ist jedoch unproblematisch, sofern sie nicht gewisse Konzentrationen überschreiten. Die Neutralisation von handelsüblichen Flächendesinfektionsmitteln stellt dagegen deutlich höhere Ansprüche an das Neutralisationsmittel, da diese in der Regel aus einer Kombination von Wirkstoffen und Tensiden bestehen [Kampf, G. *et al.*, 2005; Humphreys, P. N., 2011].

4.3.1 Praktikabilität der Prüfmodelle für die Sporizidieprüfung

Wie im Ergebnisteil in Kapitel 3.4 (S. 100) dargestellt sollten die Desinfektionsmitteltestungen stets in einem 2-Stufen Modell nach folgendem Schema erfolgen:

- Phase 2, Stufe 1 Tests (quantitative Suspensionsversuche)
- Phase 2, Stufe 2 Tests (praxisnahe Testmodelle)

Zur Wirksamkeitstestung von Flächendesinfektionsmittel bieten sich drei praxisnahe Testmodelle an (siehe S. 5, Kapitel 1.3.1.2):

- Flächendesinfektion „ohne Mechanik“ [CEN, 2001; Gebel, J. *et al.*, 2001]
- Flächendesinfektion „mit Mechanik“ [Gebel, J. *et al.*, 2001]
- 4-Felder Test [Exner, M. *et al.*, 2004; Gebel, J. *et al.*, 2004]

Diese Prüfmodelle wurden an die Sporizidieprüfung angepasst und auf Ihre Praktikabilität und Reproduzierbarkeit hin überprüft.

4.3.1.1 Quantitativer Suspensionsversuch (Phase 2, Stufe 1 Test)



Abbildung 46: Quantitativer Suspensionsversuch

Die Anpassung der Sporizidieprüfung an den Suspensionsversuch war Grundlage für die Überprüfung weiterer praxisnaher Versuchsmodelle. Die Untersuchungen im quantitativen Suspensionsversuch zeigten schlüssige Reduktionsfaktoren bezogen auf die unterschiedlich getesteten Konzentrations-Zeit-Relationen. Das bedeutet, dass mit Erhöhung der Konzentration bzw. Einwirkzeit auch die Anzahl der inaktivierten Sporen anstieg (siehe ab S. 101, Tabelle 31, Tabelle 37, Tabelle 39, Tabelle 43). Der Einfluss

der Belastungssubstanzen (clean und dirty conditions) korrelierte ebenfalls mit den erzielten Resultaten. Hohe organische Belastungen (dirty conditions) im Testansatz führten zu geringeren Reduktionsfaktoren und stellten somit erwartungsgemäß höhere Anforderungen an das Prüfprodukt (siehe ab S. 106, Tabelle 37 und Tabelle 43). Dass die Wirksamkeit der Prüfprodukte durch klinisch relevante organische Belastungen signifikant beeinflusst werden kann, ist hinreichend bekannt [Bloomfield, S. F. & Uso, E. E., 1985; McDonnell, G. & Russell, A. D., 1999; Humphreys, P. N., 2011] und sollte daher stets mit berücksichtigt werden. Die Versuchskontrollen (WSH bzw. KoA) zeigten darüber hinaus, dass die Prüfungen valide waren und die germinationsfähigen Sporen ohne Beeinflussung des Prüfprodukts vollständig zurückgewonnen werden konnten (siehe S. 101, Tabelle 31). Dabei gilt zu beachten, dass in den WSH-Kontrollen entsprechend der DGHM-Methode [Gebel, J. *et al.*, 2001] bei einer Ausgangskeimzahl (N) von 10^6 KBE/ml im Testansatz durch die Verdünnung mit dem Prüfprodukt und der organischen Belastung maximal 10^5 KBE/ml zurückgewonnen werden

können. Bei der KoA gemäß den EN-Methoden [CEN, 2009] sollte die Kontrolle, so wie beispielsweise bei Produkt F19 zwischen 15 und ≥ 160 KBE/ml liegen (siehe S. 110, Tabelle 43). Auch der Vergleich zwischen quantitativen Suspensionsversuch und praxisnahen Versuchen war schlüssig und zeigte, dass in der Regel stets höhere Anforderungen an das Produkt im praxisnahen Versuch gestellt werden (siehe S. 106, Tabelle 37 u. Tabelle 38).

Die Reproduzierbarkeit der Sporizidieprüfung im quantitativen Suspensionsversuch war gegeben, die intralaboratorielle Abweichung lag im Mittel unterhalb von $\pm 0,5 \log_{10}$ -Stufen. Dies wird bei Betrachtung der Ergebnisse mit den Standardsubstanzen ebenfalls deutlich (siehe S. 90, Tabelle 26). Abweichungen von bis zu $\pm 0,5 \log_{10}$ -Stufen in den Einzeluntersuchungen sind intralaboratoriell charakteristisch und mit statistischen Auswertungen im Bereich der Bakterizidie zu vergleichen [Uhlig, S. *et al.*, 2009; Uhlig, S. *et al.*, 2010]. Ausnahmen stellten schwer lösliche, inhomogene Produktkonzentrationen, wie vereinzelt bei Produkt F16 erkennbar (siehe S. 106, Tabelle 37), oder Produktkonzentrationen, die in einem Grenzbereich zwischen sporizid wirksam bzw. unwirksam lagen (siehe S. 101, Tabelle 31) dar. Der VAH fordert daher stets die Abgrenzung des wirksamen vom unwirksamen Bereich [DGHM, 2002].

Grundsätzlich sollten quantitative Suspensionsversuche mit in die Beurteilung eines sporiziden Desinfektionsmittels einfließen, da diese aufgrund des guten Mischverhältnisses von Testsuspension und Prüfprodukt sehr gut reproduzierbare Ergebnisse aufweisen [Humphreys, P. N., 2011]. Ein weiterer Grund für die Prüfung im quantitativen Suspensionsversuch ist, dass nicht ausnahmslos von einer Wirksamkeit im praxisnahen Versuch auf eine ausreichende Wirksamkeit im quantitativen Suspensionsversuch geschlossen werden kann. In der vorliegenden Arbeit erzielte beispielsweise das Produkt F16 im praxisnahen Versuch ohne Mechanik höhere Reduktionsfaktoren als im quantitativen Suspensionsversuch (vergleiche S. 107, Tabelle 39 u. Tabelle 40). Eine sichere Inaktivierung der Sporen im quantitativen Suspensionsversuch ist jedoch wichtig, um eine Verbreitung der Sporen über die Flotte, den Desinfektionsmittelbehälter, ausschließen zu können. Die Verbreitung von Mikroorganismen über das Putzwasser ist insbesondere bei Verwendung von Reinigungslösungen, aber auch bei Verwendung inadäquater Desinfektionsmittellösungen bekannt [Exner, M. *et al.*, 1982; Dharan, S. *et al.*, 1999; Gebel, J. *et al.*, 2004; Martin, U. *et al.*, 2004; RKI, 2004] und sollte stets mit dem Phase 2, Stufe 1 Test im Labormaßstab abgesichert werden.

4.3.2 Flächendesinfektion ohne Mechanik (Phase 2, Stufe 2 Test)



Abbildung 47: Flächendesinfektion ohne Mechanik

Bei dieser Testmethode handelt es sich um einen praxisnahen Keimträgertest auf einer Metalloberfläche (Stahl). Diese Testmethode wird von der DGHM bzw. dem VAH [Gebel, J. *et al.*, 2001] eingesetzt und ist auch europäisch im Bereich der Lebensmittelhygiene [CEN, 2001] etabliert. Die Testsuspension wird zusammen mit einer organischen Belastung auf den Keimträger aufgetragen und nach dem Antrocknen mit Desinfektionsmittel überschichtet. Eine Verteilung des Desinfektionsmittels erfolgt nicht. Die aufgetragene Flüssigkeitsmenge entspricht etwa 320 ml/m^2 . Die Sporizidieprüfungen zeigten auch hier, dass die geprüften Konzentrations-Zeit-Relationen und der Einfluss der Belastungssubstanzen mit den erzielten Reduktionsfaktoren korrelierte (siehe S. 110, Tabelle 44). Eine hinreichende Reproduzierbarkeit war auch mit diesem Testmodell sowohl bei *C. difficile*-Sporen (siehe S. 108, Tabelle 40 u. Tabelle 44) als auch bei *B. subtilis*-Sporen (siehe S. 114, Tabelle 49) gegeben. Die Abweichung lag bei diesen Produkten ebenfalls in dem Bereich von $\pm 0,5 \log_{10}$ -Stufen und decken sich dabei mit vergleichbaren Untersuchungen einer kanadischen Arbeitsgruppe [Majcher, M. R. *et al.*, 2008]. Die Versuchskontrollen waren valide und zeigten, dass die aufgetragenen Testsuspensionen (N) vollständig in den WSH-Kontrollen zurückgewonnen werden konnten. Bei Produkt F16 lag die Ausgangskeimzahl (N) beispielsweise bei $1,12 \times 10^6$ KBE/ml und die WSH-Kontrolle, aufgrund der aufgetragenen Menge bei etwa $1/20$ der Ausgangskeimzahl ($6,17 \times 10^4$ KBE/ml). Auffällig war, dass die erzielten Reduktionen im quantitativen Suspensionsversuchen vereinzelt sogar höher als im Flächentest ohne Mechanik lagen (siehe S. 107, Tabelle 39 u. Tabelle 40). In der Literatur wird dagegen beschrieben, dass die Dekontamination einer angetrockneten Keimsuspension ausnahmslos schwieriger ist als die Inaktivierung in Suspension [Springthorpe, V. S. & Sattar, S. A., 2005]. Die hier erzielten Ergebnisse zeigen, dass dies auf das Antrocknen der Sporen mit organischer Belastung nicht grundsätzlich zutrifft, zumindest nicht dann, wenn diese im Folgenden mit Desinfektionsmittel überflutet werden. In jedem Fall zeigten sich die Anforderungen an das Prüfprodukt mit diesem Testmodell nicht grundsätzlich höher als im quantitativen Suspensionsversuch, so dass eine parallele Testung im quantitativen Suspensionsversuch nachdrücklich zu empfehlen ist (siehe Kapitel 4.3.1.1). Dass neben der Konzentration und Einwirkzeit auch das aufgebrachte Volumen eine entscheidende Rolle bei der Wirksamkeit von Desinfektionsmittel spielt ist bekannt [Perez, J. *et al.*, 2005]. Im vorliegenden Versuchsmodell entspricht die aufgetragene Flüssigkeitsmenge etwa 320 ml/m^2 . In der Praxis werden jedoch nur $\leq 10 \text{ ml/m}^2$ eines Desinfektionsmittels auf die Oberflächen aufgebracht [Exner, M. *et al.*, 2004; Gebel, J. *et al.*, 2004]. Da die Ausgangskonzentrationen

der *C. difficile*-Sporen in den Testverfahren jedoch deutlich über dem Niveau liegen, was auf Handkontaktflächen im Krankenhaus zu erwarten ist [Buggy, B. P. *et al.*, 1983], wird trotz relativ praxisfernen Volumen von einer ausreichenden Desinfektion in der Praxis ausgegangen [Perez, J. *et al.*, 2005]. P.N. Humphreys [2011] sieht dagegen neben dem praxisfernen Volumen die Rückgewinnung der Sporen von der Stahlfläche als kritisch an. Des Weiteren berichtet P.N. Humphreys von stark variierenden interlaboratorischen Ergebnissen, die er unter anderem auf eine unzureichende Rückgewinnbarkeit zurückführt. Die inadäquate Rückgewinnung belegt er mit rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen. Die Problematik der Rückgewinnung könnte durch die stete Verwendung von Glasperlen, so wie beispielsweise in der DGHM-Methode vorgeschrieben [Gebel, J. *et al.*, 2001], minimiert werden. Ähnliche Versuchsmodelle wie der OECD-Test, wo die Flüssigkeitsmenge etwa 637 ml/m² entspricht, sehen die Verwendung von Glasperlen zur Rückgewinnung der Mikroorganismen nicht vor [ASTM, 2011]. Darüber hinaus könnten durch das Eingießen der Stahlträger in Nährmedium mögliche, verbliebene germinationsfähige Sporen auf dem Stahlträger nachgewiesen werden [CEN, 2001].

Eine Anpassung der Sporizidieprüfung an das bestehende Testmodell ist grundsätzlich möglich und praktikabel, dass Einbeziehen von quantitativen Suspensionsversuchen zur Bewertung eines sporiziden Desinfektionsmittels, so wie es der VAH vorsieht [Gebel, J. *et al.*, 2001], ist jedoch dringend zu empfehlen.

4.3.2.1 Flächendesinfektion mit Mechanik (Phase 2, Stufe 2 Test)



Abbildung 48: Flächendesinfektion mit Mechanik

Dieses Testmodell wird von der DGHM [Gebel, J. *et al.*, 2001] bereits langjährig als quantitativer Keimträgertest eingesetzt und sieht als Testoberfläche Keramikfliesen vor. Die Testsuspension wird mit einer entsprechenden organischen Belastung großflächig auf dem Keimträger aufgetragen und nach dem Antrocknen mit Desinfektionsmittel überschichtet. Eine Verteilung des Desinfektionsmittels erfolgt hier mit einem Glasspatel zur annähernden Simulation des mechanischen Effekts bei einem üblichen Wischvorgang. Die aufgetragene Flüssigkeitsmenge entspricht etwa 100 ml/m². Wie in Kapitel 3.4 dargestellt korrelierten auch hier die erzielten Reduktionsfaktoren mit den geprüften Konzentrations-Zeit-Abstufungen und dem Einfluss der Belastungssubstanzen (siehe S. 106, Tabelle 38 und Tabelle 41). Die Validität des Testmodells war durch die hohe Reproduzierbarkeit und die gültigen Versuchskontrollen wie in den voran beschriebenen Testmodellen gegeben. In der WSH-Kontrolle sollte bei diesem Testmodell, aufgrund des Aufbringens von 100 µl Testsuspension, etwa 1/10 der Ausgangskonzentration (N) zurückgewonnen werden können (siehe S. 108, Tabelle 41).

Im Vergleich zu dem Flächentest ohne Mechanik (siehe Kapitel 4.3.2) fiel auf, dass die Anforderungen an das Prüfprodukt mit diesem Testmodell, durch die geringeren Reduktionsfaktoren, stets höher als im quantitativen Suspensionsversuch waren (siehe S. 106, Tabelle 37 u. Tabelle 38). Obwohl bei dieser Methode ein zusätzlicher mechanischer Effekt simuliert wird, führte dieses Testmodell bei gleichen Konzentrations-Zeit-Relationen zu geringeren Reduktionen als im Flächentest ohne Mechanik (siehe S. 108, Tabelle 40 u. Tabelle 41). Dies ist mit aller Wahrscheinlichkeit auf die stark unterschiedlichen Volumenverhältnisse zurückzuführen. Während im Flächentest ohne Mechanik ein Volumenverhältnis von ca. 320 ml/m² simuliert wird, liegt dies im Flächentest mit Mechanik relativ praxisnah bei ca. 100 ml/m². Die Aussage, dass eine Dekontamination im quantitativen Suspensionsversuch stets leichter ist [Springthorpe, V. S. & Sattar, S. A., 2005], ist nach den hier erhaltenen Erkenntnissen mit bakteriellen Sporen differenziert zu betrachten und hängt von der entsprechenden Prüfmethode ab. Praxisnahe Testmodelle mit relativ praxisfernen Volumenverhältnissen, wie z.B. im OECD-Test (ca. 640 ml/m²) oder auch im Flächentest ohne Mechanik (ca. 320 ml/m²), lassen nicht uneingeschränkt den Schluss zu, dass sie höhere Anforderungen stellen als der Suspensionsversuch.

Der Flächentest mit Mechanik spiegelt ein praxisnahes Volumenverhältnis wieder und stellt im Vergleich zu den Suspensionsversuchen, nach den hier gewonnenen Erkenntnissen, stets höhere Anforderungen an das Prüfprodukt. Eine Anpassung der Sporizidieprüfung an das bestehende Testmodell ist auch hier möglich und praktikabel.

4.3.3 4-Felder Test (Phase 2, Stufe 2 Test)

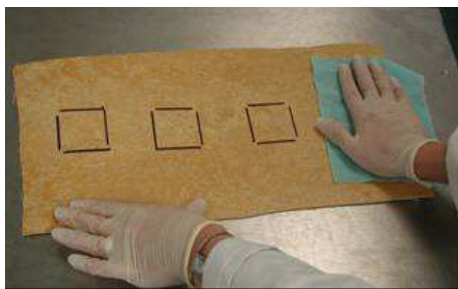


Abbildung 49: 4- Felder Test

Bei dem 4-Felder Test handelt es sich um ein sehr praxisnahes Testmodell auf PVC-freiem Bodenbelag, das von J. Gebel und M. Exner beschrieben wurde [Exner, M. *et al.*, 2004; Gebel, J. *et al.*, 2004]. Das 1. Testfeld wird kontaminiert und nach dem Antrocknen erfolgt ein Wischvorgang mit einem desinfektionsmittelgetränktem Tuch. Die durchschnittliche Volumenabgabe liegt bei etwa 10 ml/m² [Gebel,

J. *et al.*, 2004] und kommt damit der Volumenabgabe in der Praxis sehr nahe. Neben der Reduktion kann auch die Verteilung von Mikroorganismen ins Umfeld überprüft werden. Parallel zu dem Wischvorgang mit Desinfektionsmittel erfolgt stets zur Kontrolle ein Wischvorgang mit Wasser standardisierter Härte (WSH). Die WSH-Kontrollen verdeutlichen gleichzeitig, wie hoch das Steuerungsrisiko der Sporen ins Umfeld bei Einsatz eines inadäquaten Desinfektionsmittels oder Reinigungslösung sein kann (siehe S. 104, Tabelle 35). Die Streuung der Sporen ins Umfeld (Testfeld 2, 3 und 4) wird als Akkumulationsfaktor

(AF) angegeben. **Im vorliegenden Beispiel (siehe Tabelle 35) wurde ohne Einsatz von Desinfektionsmittel ein AF von 2,8 log₁₀-Stufen ermittelt, was bedeutet, dass im Mittel 631 *C. difficile*-Sporen auf die umliegenden Testfeldern (25 cm²) verteilt wurde (631 KBE/25 cm²).** Bei Verwendung des Produkts F10, konnte bei einer Konzentrations-Zeit-Relation von 1% - 30 min die Verteilung der Sporen ins Umfeld erfolgreich vermieden werden (AF=0). Bei Betrachtung der Reduktionen auf Testfeld 1 fällt auf, dass unter Einsatz eines Desinfektionsmittels eine nahezu vollständige Reduktion um 4,22 log₁₀-Stufen erzielt wurde, während bei dem Wischvorgang ohne Desinfektionsmittel (WSH-Kontrolle) lediglich ein Reduktion um 1,54 log₁₀-Stufen erfolgte (siehe S. 104, Tabelle 35). Ein unzureichendes Desinfektionsmittel oder eine Reinigungslösung führt somit eindeutig zur Verschleppung von Sporen ins Umfeld. Diese Beobachtung stützen auch ähnliche Studien mit Viren und Bakterien [Barker, J. *et al.*, 2004; Gebel, J. *et al.*, 2004]. T.D. Lawley [2010] zeigte in einem Experiment mit Mäusen, dass bereits fünf bis zehn *C. difficile*-Sporen pro cm² (125 - 250 KBE/25 cm²) ausreichen, um 50% der Mäuse innerhalb von eine Stunde zu infizieren (ID 50). Vor diesem Hintergrund ist eine praxisnahe Betrachtung einer möglichen Verteilung von *C. difficile*-Sporen ins Umfeld dringend erforderlich und kann mit dem 4-Felder Test sehr gut dargestellt werden (siehe S. 104, Tabelle 35). Die Anforderungen an die Desinfektionsmittel sind dabei im 4-Felder Test in der Regel noch einmal höher als in den voran beschriebenen Flächentests mit bzw. ohne Mechanik. Diese erhöhten Anforderungen konnten beispielsweise auch bei Produkt F19 beobachtet werden. Im quantitativen Suspensionsversuch und Flächentest ohne Mechanik zeigte das Produkt unter hoher organischer Belastung bei 2% - 30 min eine vollständig Reduktion. Im 4-Felder Test erzielte es dagegen zwar mit 3,86 log₁₀-Stufen eine ausreichende Reduktion (> 3 log₁₀-Stufen) auf Testfeld 1, führte jedoch zu einer Verschleppung der Sporen von 1,14 log₁₀-Stufen (14 KBE/25 cm²). Somit war nach den hier festgelegten Akzeptanzkriterien das Streuungsrisiko zu hoch, das 0,5 log₁₀-Stufen (3 KBE/25 cm²) nicht überschreiten sollte. Derzeit wird im CEN TC 216 der WG1 im Bereich der Bakterizidie ein Ringversuch mit dem 4-Felder Test durchgeführt, der unter anderem dazu dienen soll, die Akzeptanzkriterien insbesondere hinsichtlich der Verschleppung noch einmal zu prüfen. Ob gegebenenfalls eine Lockerung der Akzeptanzkriterien möglich ist, wird im Rahmen der Expertengremien diskutiert werden. Um die Praktikabilität und Plausibilität des 4-Felder Tests zu prüfen, erfolgten weitere Untersuchungen mit unterschiedlichen Belastungssubstanzen, unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen und Volumina.

Wie aus Tabelle 42 (S. 109) ersichtlich, ist der Einfluss von Belastungssubstanzen darstellbar und nimmt abhängig vom Prüfprodukt und dem entsprechenden Wirkstoff einen mehr oder minder großen Einfluss [Bloomfield, S. F. & Uso, E. E., 1985; McDonnell, G. & Russell, A. D., 1999; Russell, A. D., 1999; Shetty, N. *et al.*, 1999]. Die Korrelation der

Ausgangskontamination mit der Verschleppung ins Umfeld geht aus Tabelle 45 (B+C) auf Seite 111 hervor. Eine Sporizidieprüfung mit Ausgangssuspensionen von $1,46 \times 10^8$ KBE/ml (siehe Tabelle 45 B), was einer Sporenfracht auf der Fläche von 7.300.000 KBE/ 25 cm² entspricht, wurde nur zu Vergleichszwecken herangezogen. In der Routineprüfung ist eine derart hohe Sporenkontamination nicht praktikabel und auch nicht sinnvoll. Zum einen ist es sehr schwierig und aufwändig stets derart hohe Sporentiter zur Verfügung zu stellen und zum anderen sind auf den Oberflächen im Krankenhaus deutlich geringeren Kontaminationen zu erwarten [Buggy, B. P. *et al.*, 1983; Perez, J. *et al.*, 2005; Martirosian, G., 2006]. Einige Studien verifizieren dies und beschreiben, dass in der Regel in den Kulturproben von kontaminierten Flächen nicht mehr als 10 KBE von *C. difficile* gefunden werden, gleichwohl die Kontamination in Stuhlproben bei ca. $5,6 \pm 1,4 \log_{10}/g$ Stuhl liegen kann [Riggs, M. M. *et al.*, 2007]. Dies bestätigt den Konsens des CEN TC 216, dass die Anforderung an die Sporizidieprüfung mit einer Ausgangssuspension von $> 10^6$ germinationsfähigen Sporen (~ 100.000 KBE/cm²) und einer Reduktion um 3 log₁₀-Stufen [CEN, 2002] ein ausreichendes Sicherheitslevel bietet.

Der Einfluss des Desinfektionsvolumens wird in Tabelle 42 auf Seite 109 dargestellt und bestätigt erneut, dass das Desinfektionsvolumen neben den Faktoren wie Konzentration, Belastung und Einwirkzeiten einen entscheidenden Einfluss auf die Wirksamkeit hat.

Zusammenfassend stellte sich der 4-Felder Test als ein sehr praxisnahes und praktikables Testmodell für die Sporizidieprüfung dar, dass insbesondere bei akuten CDAD-Ausbrüchen ein zusätzliches Sicherheitsmaß bietet. Dieses Testmodell könnte somit beispielsweise auch einen wichtigen Beitrag zur Forderung von P. N. Humphreys liefern, der die Notwendigkeit nach einer praxisnahen Sporizidieprüfung mit Wischtüchern noch einmal hervorhebt [Humphreys, P. N., 2011].

4.3.4 Wirksame sporizide Flächendesinfektionsmittel

Welch entscheidenden Einfluss der Einsatz sporizid wirksamer Flächendesinfektionsmittel für die Unterbrechung von Infektionsketten bzw. die Infektionsprophylaxe spielt, konnte bereits in verschiedenen Studien belegt werden.

In zwei Feldstudien konnten beispielsweise durch den Einsatz ungepufferter 1/10 Hypochloritlösungen (5000 mg/l freiem Chlor) die Infektionsraten mit *C. difficile* signifikant um bis zu 50% reduziert werden [Mayfield, J. L. *et al.*, 2000; Apisarnthanarak, A. *et al.*, 2004]. Dem entsprechend belegen Umgebungsuntersuchungen eine deutliche Reduktion der Clostridien auf patientennahen Flächen um 48% [Hacek, D. M. *et al.*, 2010] bzw. 98% [Kaatz, G. W. *et al.*, 1988] nach einer regelmäßigen Raumdesinfektion mit einer Hypochloritlösung. Auch im Labor konnte die sporizide Wirksamkeit im quantitativen Keimträgertest mit 1000 mg/l bzw. 3000 mg/l freiem Chlor und Einwirkzeiten von 15 bis

25 min belegt werden [Perez, J. *et al.*, 2005]. Bei der Verwendung von Hypochloritlösung ist jedoch die geringe Stabilität, die Materialunverträglichkeit, die mangelnde Patientenzuträglichkeit und der hohe Wirksamkeitsverlust in Gegenwart von organischer Belastung zu beachten [Peters, J. & Spicher, G., 1988; Rutala, W. A. & Weber, D. J., 1997; Fawley, W. N. *et al.*, 2007; Fraise, A., 2010]. Auch in dieser Studie zeigte sich, dass eine Hypochloritlösung mit 3000 mg/l freiem Chlor bei einer Einwirkzeit von bis zu 30 min unter hoher organischer Belastung - entgegen den Untersuchungen von J. Perez *et al.* [2005] mit einer anderen Belastungssubstanz – eine unzureichende Wirksamkeit aufwies (siehe S. 95, Tabelle 28). Verschiedene Studien befürworten aus diesem Grund die Verwendung von Peressigsäure [Block, C., 2004; Wheeldon, L. J. *et al.*, 2008] oder Natriumdichloroisocyanurat (NaDCC) [Bloomfield, S. F. & Uso, E. E., 1985]. Handelsprodukte, mit dem Wirkstoff NaDCC (F1 und F13), zeigten auch in dieser Arbeit unter hoher organischer Belastung einen ausreichenden sporiziden Effekt (siehe S. 95, Tabelle 28). Derzeit liegen nur wenige Daten für alternative sporizide Desinfektionsmittel vor, die eine Wirksamkeit gegenüber *C. difficile*-Sporen belegen [Wullt, M. *et al.*, 2003; Fraise, A., 2010; Horejsh, D. & Kampf, G., 2010]. Nach den hier erhaltenen Erkenntnissen bieten sich für die routinemäßige Flächendesinfektion bei CDAD-Ausbrüchen jedoch auch gebräuchliche Desinfektionsmittel mit sporizider Aktivität an. Diese sollten jedoch qualitätsgesichert mit praxisnahen Prüfmodellen unter Berücksichtigung organischer Belastungen überprüft werden, da anderenfalls Wirksamkeitslücken im praktischen Einsatz zu erwarten sind [Büttgen, S. *et al.*, 2008b].

Die geprüften und wirksamen Handelsprodukte basierten auf einer Kombination von Aldehyden und quaternären Verbindungen, auf chlorabspaltende Verbindungen und auf Peroxidverbindungen (siehe S. 94, Kapitel 3.3.3) [Büttgen, S. *et al.*, 2008a; Büttgen, S. *et al.*, 2008b]. Die für wirksam befundenen Handelsprodukte entsprechen damit den allgemein bekannten sporiziden Wirkstoffen [Russell, A. D., 1990; McDonnell, G. & Russell, A. D., 1999; Setlow, P., 2006]. Deutlich wurde jedoch, dass von einer finalen Wirkstoffkonzentration nicht zwangsläufig auf eine sporizide Wirksamkeit geschlossen werden kann, da die genaue Wirkstoffzusammensetzung und die Hilfsstoffe Einfluss nehmen [Russell, A. D., 1990; 1994]. Erkennbar wurde dies unter anderem beim Vergleich von Produkt F19 (500 mg/l Peroxidverbindung) und F7 (8.000 mg/l Peroxidverbindung), wo nur mit Produkt F19 eine sporizide Wirksamkeit erzielt werden konnte (siehe S. 94, Kapitel 3.3.3 und S. 110, Kapitel 3.4.1.1).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte mit Hilfe des 2-Stufen-Modells und insgesamt drei praxisnahen Testmodellen eine sehr gute Abschätzung unterschiedlicher Handelprodukte erfolgen.

Dabei wurde erkennbar, dass der 4-Felder Test die höchsten Anforderungen an die Desinfektionsmittel stellt und somit ein hohes Sicherheitsmaß bietet (siehe Kapitel 4.3.1).

Von den drei detailliert vorgestellten Handelsprodukten (siehe S. 100, Kapitel 3.4.1.1) erwiesen sich insbesondere die Produkte F10 (1% - 30 min) und F19 (2% - 15 min) als sporizid wirksam, da diese auch im 4-Felder Test eine ausreichende sporizide Wirksamkeit zeigten. Das Produkt F16 (2% - 240 min) zeigte dagegen im 4-Felder Test erst nach einem zweimaligen Wischvorgang eine ausreichend sporizide Wirksamkeit. Durch die Prüfung verschiedener sporizid deklarierter Flächendesinfektionsmittel wurde deutlich, dass möglicherweise nicht alle Produkte im Markt eine ausreichende Wirksamkeit gegenüber *C. difficile* Ribotyp 027 aufweisen [Büttgen, S. *et al.*, 2008b]. Vergleicht man sporizid wirksame Konzentrations-Zeit-Relationen mit den in der VAH-Liste aufgeführten Konzentrationen der Desinfektionsmittel für die Bakterizidie oder Mykobakterizidie, so ergibt sich ebenfalls ein deutlicher Unterschied [VAH, 2009]. Dies verdeutlicht noch einmal die dringende Notwendigkeit einer sporiziden Wirksamkeitstestung mit standardisierten, praxisnahen Prüfmodellen und einer darauf aufbauenden qualitätsgesicherten Listung.

Von der Verwendung nicht sporizider Desinfektionsmittel wird bei Infektionen mit *C. difficile* nachdrücklich abgeraten, da diese die Sporulationsrate der Clostridien erhöhen können und durch eine zusätzliche Streuung der Sporen contraindiziert sind [Wilcox, M. H. *et al.*, 2003; Fawley, W. N. *et al.*, 2007].

4.4 Verwertungsplan

Die prophylaktische Flächendesinfektion mit sporizid wirksamen Desinfektionsmitteln zählt insbesondere bei *Clostridium-difficile*-Infektionen und CDAD-Ausbrüchen zu einer wichtigen Basishygienemaßnahme, um Infektketten zu unterbrechen [Kaatz, G. W. *et al.*, 1988; Cartmill, T. D. *et al.*, 1994; Schulster, L. & Chinn, R. Y., 2003; Exner, M., 2007]. Derzeit sind für die Prüfungen sporizider Flächendesinfektionsmittel keine einheitlichen, qualitätsgesicherten Prüfmethoden verfügbar, so dass der Anwender auf die Informationen der Hersteller angewiesen ist. Problematisch ist dabei, dass die in der Literatur beschriebenen sporiziden Prüfungen nicht standardisiert durchgeführt werden. Die Prüfungen basieren häufig - auf Grund fehlender Prüfvorschriften - auf unterschiedlichen Anreicherungsverfahren, Belastungssubstanzen und Prüfmethoden. Auf die damit einhergehenden Gefahren bzw. Probleme wurde mehrfach in aktuellen Veröffentlichungen hingewiesen [Fraise, A., 2010; Humphreys, P. N., 2011; Wilcox, M. H. *et al.*, 2011].

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein umfassendes Testverfahren zur standardisierten Überprüfung sporizider Flächendesinfektionsmitteln erarbeitet werden (siehe Kapitel 4). Auf

Basis dieser Ergebnisse wurde beim europäischen Normierungskomitee, dem CEN TC 216, ein Work Item für die Sporizidieprüfung von *C. difficile* im Phase 2, Stufe 1 –Test eingereicht [CEN, 2010a]. Die Prüfungen wurde bereits auf CEN TC Sitzungen innerhalb der Arbeitsgruppe des humanmedizinischen Bereichs (WG1) diskutiert [CEN, 2010d; c; b] und sollen noch in 2011 als Vorlage für einen Ringversuch dienen. Aktuell erfolgt noch eine Überarbeitung des bestehenden Work Items, indem die aktuellen Kenngrößen zur Validierung der Sporensuspensionen (siehe S. 128, Tabelle 52) und der zusätzliche Enzymschritt (siehe S. 59, Kapitel 2.5) aufgenommen werden sollen. Die Erfahrungen von drei Laboratorien (inkl. RKI), die diese Methode überprüft haben, sollen in das überarbeitete Dokument nach Möglichkeit ebenfalls einfließen. Auf Basis dieses Entwurfs soll im Sommer 2011 ein Ringversuch auf europäischer Ebene gestartet werden [DIN, 2011].

Sobald die *C. difficile*-Sporenpräparation im Rahmen des Ringversuchs überprüft wurde und ein Konsens gefunden wird, können Normvorschläge für die praxisnahen Versuchsmodelle nachgelegt werden. Der erarbeitete Normentwurf für den praxisnahen 4-Felder Test [CEN, 2011b] wird derzeit in einem Ringversuch mit neun Teilnehmern im Bereich der Bakterizidie auf seine Praktikabilität und Validität hin überprüft. Die Praktikabilität und Anpassungsfähigkeit der Prüfmodelle (inkl. 4-Felder Test) an die Sporizidieprüfung konnte in dieser Arbeit für den Bereich der Flächendesinfektion ausführlich dargestellt werden. Die Anpassung der Sporizidieprüfung an die Instrumentendesinfektion auf Glaskeimträgern wurde ebenfalls überprüft und Ergebnisse bereits veröffentlicht [Büttgen, S. *et al.*, 2008a].

Mit Hilfe dieser Untersuchungen konnte letztlich ein solides Fundament für die europäische Normierung im Bereich der Sporizidieprüfung gelegt werden. Die Prüfmethode sollen nach einem entsprechenden Konsens auch in das Methodenbuch des VAH aufgenommen werden, um möglichst zeitnah eine unabhängige und qualitätsgesicherte Leistung sporizider Desinfektionsmittel zu ermöglichen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Sporenbildende Bakterien wie *Clostridium difficile*, sind zur Ausbildung von Dauerformen, so genannten Endosporen, befähigt. Diese Sporen sind besonders umweltresistent und stellen erhöhte Anforderungen an Desinfektionsverfahren. Gegenwärtig zählen *Clostridium-difficile*-Infektionen in vielen europäischen Ländern aber auch in den USA und Kanada zu einer der bedeutsamsten nosokomialen Infektionen. Durch das Auftreten neuer Epidemiestämme, wie dem Ribotyp 027, wurde in den letzten Jahren ein signifikanter Anstieg der Morbidität- und Mortalitätsrate wahrgenommen. Ein wichtiger Bestandteil der Prävention und Kontrolle von *Clostridium-difficile*-Ausbrüchen ist die strikte Umsetzung von Standardhygienemaßnahmen, wie die Verwendung adäquater Flächendesinfektionsmittel. Die Schwierigkeit liegt im Auffinden qualitätsgesicherter sporizider Desinfektionsmittel, da standardisierte Prüfverfahren (EN-Normen) derzeit fehlen. Die Arbeitsgruppe der Humanmedizin (WG1), innerhalb des europäischen Komitees für Normung (CEN TC 216), hat aufgrund der steigenden Inzidenz die Etablierung einer Sporizidieprüfung gegenüber praxisrelevanten *C. difficile*-Sporen gefordert.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte diese Forderung bzw. Problematik aufgegriffen werden und ein normiertes Testverfahren zur Prüfung sporizider Flächendesinfektionsmittel bereitgestellt werden. Dabei wurden sowohl klinisch relevante aerotolerante *C. difficile*-Sporen als auch aerobe *B. subtilis*-Sporen mit in das Prüfdesign eingebunden. Insgesamt wurden vier Anreicherungsverfahren für aerobe und zwei Anreicherungsverfahren für anaerobe Sporenbildner geprüft und miteinander verglichen.

Das Verfahren entsprechend der Standardarbeitsanweisung (SOP 112) Bonn zeigte sich, neben dem modifizierten Verfahren gemäß EN 13704, als besonders geeignet für die Anreicherung von *B. subtilis*-Sporen.

Für die Anreicherung von *C. difficile*-Sporen konnte die SOP 156 Bonn so standardisiert werden, dass eine sichere Anreicherung von *C. difficile*-Sporen unterschiedlicher Herkunft möglich war. In enger Kooperation mit dem Labor von S. A. Sattar (Kanada) wurde ein Enzymschritt integriert, durch den die Reinheit der Sporensuspensionen weiter optimiert werden konnte. Ein weiterer entscheidender Schritt war die Implementierung von Taurocholat im Nährmedium, um eine nahezu hundertprozentige Wiederfindung der geernteten Sporen sicherzustellen. Ferner konnten durch die Validierung der Sporensuspensionen qualitätssichernde Parameter eingebaut werden. Diese sollen gewährleisten, dass zur Prüfung stets Sporen mit vergleichbarer chemischer Resistenz herangezogen werden. Als Inaktivierungsverfahren verbliebener vegetativer Sporen setzte

sich die Hitzeinaktivierung gegenüber einer Alkoholinaktivierung durch. Darüber hinaus konnte eine Mindestlagerung der *C. difficile*-Sporen von zwei Monaten festgelegt werden, um ruhende Sporen für die Sporizidieprüfung zu gewährleisten. Die Lagerung der *C. difficile*-Sporen in Wasser bei 4°C konnte für einen Zeitraum von 2 Jahren sichergestellt werden.

Die Sporizidieprüfung konnte letztlich sowohl an den quantitativen Suspensionsversuch (Phase 2, Stufe 1) als auch an drei praxisnahe Prüfmodelle (Phase 2, Stufe 2) angepasst werden und ermöglichte auf diese Weise eine gute Abschätzung und Beurteilung sporizider Desinfektionsmittel. Für eine umfassende Beurteilung von Handelsprodukten zeigte sich, dass sowohl ein quantitativer Suspensionsversuch als auch ein praxisnaher Versuch notwendig ist. Bei Vergleich der drei praxisnahen Versuche zeigte sich der 4-Felder Test mit den höchsten Anforderungen an die Prüfprodukte und macht somit die Einbeziehung dieses Prüfverfahrens notwendig.

Am 27.01.2010 wurde eine erste Entwurfsfassung (N-Dokument 569) beim europäischen Normierungskomitee, dem CEN TC 216, zur Prüfung anaerober Sporenbildner im Phase 2, Stufe 1-Test eingereicht. Die überarbeitete Fassung soll im Sommer 2011 für eine Versuchsreihe mit weiteren Laboratorien herangezogen werden.

Letztlich konnte im Rahmen dieser Arbeit eine gute Basis im Bereich der Sporizidieprüfung für die europäische Normierung gelegt werden. Aufbauend auf diesen Testdesigns wird es möglich sein, dass schon in Kürze auf europäischer und später auch auf nationaler Ebene ein praktikables und praxisnahes Testprozedere für sporizide Flächendesinfektionsmittel verfügbar ist. Es ist zu erwarten, dass hiermit Voraussetzungen gegeben sind, um durch Auswahl und Einsatz sporizider Flächendesinfektionsmittel die zunehmende bedrohliche Rate von *Clostridium-difficile*-Infektionen unter Kontrolle zu bringen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- ACHENBACH, B. (2001) Zur Wirksamkeitsprüfung verschiedener Desinfektionsmittel gegenüber Clostridium-Sporen. Inaugural Dissertation Thesis, Rheinische Friedrich-Wilhelms Universität zu Bonn.
- AKERLUND, T., PERSSON, I., UNEMO, M., NOREN, T., SVENUNGSSON, B., WULLT, M. & BURMAN, L.G. (2008) Increased sporulation rate of epidemic Clostridium difficile Type 027/NAP1. *J Clin Microbiol*, 46, 1530-1533.
- AKOACHERE, M., SQUIRES, R.C., NOUR, A.M., ANGELOV, L., BROJATSCH, J. & ABEL-SANTOS, E. (2007) Identification of an in vivo inhibitor of Bacillus anthracis spore germination. *J Biol Chem*, 282, 12112-12118.
- AL SAIF, N. & BRAZIER, J.S. (1996) The distribution of Clostridium difficile in the environment of South Wales. *J Med Microbiol*, 45, 133-137.
- ALLERBERGER, F., AYLIFFE, G., BASSETTI, M., BRAVENY, I., BUCHER, A., DAMANI, N., DASCHNER, F., DETTENKOFER, M., EZPELETA, C., GASTMEIER, P., GEFFERS, C., GIAMARELLOU, H., GOLDMAN, D., GRZESIOWSKI, P., GUBINA, M., HAANEN, P.E., HAYDOUCHKA, I., HUBNER, J., KALENIC, S., VAN KNIPPENBERG-GORDEBEKE, G., KRANENBURG, A.M., KRCMERY, V., KROPEC, A., KRUGER, W., LEMMEN, S., MAYHALL, C.G., MEESTER, M., MEHTAR, S., MUNZINGER, J., MUZLOVIC, I., OJAJARVI, J., RUDEN, H., SCOTT, G., SHAH, P., TAMBIC-ANDRASZEVIC, A., UNERTL, K., VOSS, A. & WEIST, K. (2002) Routine surface disinfection in health care facilities: should we do it? *Am J Infect Control*, 30, 318-319.
- ALVAREZ Z., A.-S.E. (2007) Potential use of inhibitors of bacteria spore germination in the prophylactic treatment of anthrax and Clostridium difficile-associated disease. *Expert Rev Anti Infect Ther.*, 5, 783-792.
- ANDERSSON, A., RONNER, U. & GRANUM, P.E. (1995) What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens Bacillus cereus and Clostridium perfringens? *Int J Food Microbiol*, 28, 145-155.
- APISARNTHANARAK, A., ZACK, J.E., MAYFIELD, J.L., FREEMAN, J., DUNNE, W.M., LITTLE, J.R., MUNDY, L.M. & FRASER, V.J. (2004) Effectiveness of environmental and infection control programs to reduce transmission of Clostridium difficile. *Clin Infect Dis*, 39, 601-602.
- ARROYO, L.G., ROUSSEAU, J., WILLEY, B.M., LOW, D.E., STAEMPFLI, H., MCGEER, A. & WEESE, J.S. (2005a) Use of a selective enrichment broth to recover Clostridium difficile from stool swabs stored under different conditions. *J Clin Microbiol*, 43, 5341-5343.
- ARROYO, L.G., ROUSSEAU, J.D., STAEMPFLI, H. & WEESE, J.S. (2005b) Clostridium difficile-associated disease. *J Vet Intern Med*, 19, 299.
- ARVAND, M., HAURI, A.M., ZAISS, N.H., WITTE, W. & BETTGE-WELLER, G. (2009) Clostridium difficile ribotypes 001, 017, and 027 are associated with lethal C. difficile infection in Hesse, Germany. *Euro Surveill*, 14.

- ASAI, K., TAKAMATSU, H., IWANO, M., KODAMA, T., WATABE, K. & OGASAWARA, N. (2001) The *Bacillus subtilis* yabQ gene is essential for formation of the spore cortex. *Microbiology*, 147, 919-927.
- ASSADIAN, O. & KRAMER, A. (2008a) Antiseptik. *Wallhäusers Praxis der Sterilisation, Desinfektion, Antiseptik und Konservierung*. O. Assadian & A. Kramer, Georg Thieme Verlag KG. Stuttgart. 6, 208-254.
- ASSADIAN, O. & KRAMER, A. (2008b) Desinfektion unbelebter Materialien. *Wallhäusers Praxis der Sterilisation, Desinfektion, Antiseptik und Konservierung*. A. Kramer & O. Assadian, Georg Thieme Verlag KG. Stuttgart. 6, 161-162.
- ASTM (2011) E2197 -11 Standard Quantitative Disk Carrier Test Method for Determining the Bactericidal, Virucidal, Fungicidal, Mycobactericidal and Sporocidal Activities of Liquid Chemical Germicides. *ASTM International*. West Conshohocken.
- ATRIH, A. & FOSTER, S.J. (1999) The role of peptidoglycan structure and structural dynamics during endospore dormancy and germination. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 75, 299-307.
- ATRIH, A., ZOLLNER, P., ALLMAIER, G. & FOSTER, S.J. (1996) Structural analysis of *Bacillus subtilis* 168 endospore peptidoglycan and its role during differentiation. *J Bacteriol*, 178, 6173-6183.
- BANERJEE, C., BUSTAMANTE, C.I., WHARTON, R., TALLEY, E. & WADE, J.C. (1988) *Bacillus* infections in patients with cancer. *Arch Intern Med*, 148, 1769-1774.
- BARKER, J., VIPOND, I.B. & BLOOMFIELD, S.F. (2004) Effects of cleaning and disinfection in reducing the spread of Norovirus contamination via environmental surfaces. *J Hosp Infect*, 58, 42-49.
- BARTLETT, J.G. (2002) Clinical practice. Antibiotic-associated diarrhea. *N Engl J Med*, 346, 334-339.
- BARTLETT, J.G., MOON, N., CHANG, T.W., TAYLOR, N. & ONDERDONK, A.B. (1978) Role of *Clostridium difficile* in antibiotic-associated pseudomembranous colitis. *Gastroenterology*, 75, 778-782.
- BEALL, B. & MORAN, C.P., JR. (1994) Cloning and characterization of spoVR, a gene from *Bacillus subtilis* involved in spore cortex formation. *J Bacteriol*, 176, 2003-2012.
- BEAMAN, T.C., PANKRATZ, H.S. & GERHARDT, P. (1971) Paracrystalline sheets reaggregated from solubilized exosporium of *Bacillus cereus*. *J Bacteriol*, 107, 320-324.
- BIOZIDGESETZ (2002) Gesetz zur Umsetzung der Richtlinie 98/8/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Februar 1998 über das Inverkehrbringen von Biozid-Produkten
- BIOZIDRICHTLINIE (1998) Richtlinie 98/8/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Februar 1998 über das Inverkehrbringen von Biozid-Produkten, Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften.
- BLOCK, C. (2004) The effect of Perasafe and sodium dichloroisocyanurate (NaDCC) against spores of *Clostridium difficile* and *Bacillus atrophaeus* on stainless steel and polyvinyl chloride surfaces. *J Hosp Infect*, 57, 144-148.

- BLOOMFIELD, S.F. & USO, E.E. (1985) The antibacterial properties of sodium hypochlorite and sodium dichloroisocyanurate as hospital disinfectants. *J Hosp Infect*, 6, 20-30.
- BMAS (2006) Technische Regeln für Gefahrstoffe (TRGS 900) Arbeitsplatzgrenzwerte. zuletzt berichtigt am 4.8.2010, Bundesministerium für Arbeit und Soziales (BMAS), 1-50.
- BODENSCHATZ, W. (2006) Kompaktwissen Desinfektion: Das Handbuch für Ausbildung und Praxis. Behr's Verlag, Hamburg.
- BORICK, P.M. (1968) Chemical sterilizers (chemosterilizers). *Adv Appl Microbiol*, 10, 291-312.
- BRAUN, M., MAYER, F. & GOTTSCHALK, G. (1981) Clostridium aceticum (Wieringa), a microorganism producing acetic acid from molecular hydrogen and carbon dioxide. *Arch Microbiol*, 128, 288-293.
- BRIGGS, A. & YAZDANY, S. (1974) Resistance of Bacillus spores to combined sporicidal treatments. *J Appl Bacteriol*, 37, 623-631.
- BRYANT, K. & McDONALD, L.C. (2009) Clostridium difficile infections in children. *Pediatr Infect Dis J*, 28, 145-146.
- BUGGY, B.P., HAWKINS, C.C. & FEKETY, R. (1985) Effect of adding sodium taurocholate to selective media on the recovery of Clostridium difficile from environmental surfaces. *J Clin Microbiol*, 21, 636-637.
- BUGGY, B.P., WILSON, K.H. & FEKETY, R. (1983) Comparison of methods for recovery of Clostridium difficile from an environmental surface. *J Clin Microbiol*, 18, 348-352.
- BUI, N.K., GRAY, J., SCHWARZ, H., SCHUMANN, P., BLANOT, D. & VOLLMER, W. (2009) The peptidoglycan sacculus of Myxococcus xanthus has unusual structural features and is degraded during glycerol-induced myxospore development. *J Bacteriol*, 191, 494-505.
- BURNS, D.A., HEAP, J.T. & MINTON, N.P. (2010) SleC is essential for germination of Clostridium difficile spores in nutrient-rich medium supplemented with the bile salt taurocholate. *J Bacteriol*, 192, 657-664.
- BÜTTGEN, S., GEBEL, J., HORNEI, B., ENGELHART, S., KOCH, O.N.J. & EXNER, M. (2008a) Vergleich der Chemoresistenz von Clostridium difficile Ribotyp 027- und Bacillus subtilis-Sporen gegenüber Desinfektionsmittel. *Hyg Med*, 33, 513-517.
- BÜTTGEN, S., GEBEL, J., VON RHEINBABEN, F., HORNEI, B., ENGELHART, S. & EXNER, M. (2008b) Wirksamkeit sporizid ausgelobter Flächen- und Instrumentendesinfektionsmittel gegenüber Sporen von Clostridium difficile Ribotyp 027. *Hyg Med*, 33, 194-200.
- CANO, R.J. & BORUCKI, M.K. (1995) Revival and identification of bacterial spores in 25- to 40-million-year-old Dominican amber. *Science*, 268, 1060-1064.
- CARTMILL, T.D., PANIGRAHI, H., WORSLEY, M.A., MCCANN, D.C., NICE, C.N. & KEITH, E. (1994) Management and control of a large outbreak of diarrhoea due to Clostridium difficile. *J Hosp Infect*, 27, 1-15.
- CATALANO, F.A., MEADOR-PARTON, J., POPHAM, D.L. & DRIKS, A. (2001) Amino acids in the Bacillus subtilis morphogenetic protein SpoIVA with roles in spore coat and cortex formation. *J Bacteriol*, 183, 1645-1654.

- CEN (2001) Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika - Quantitativer Oberflächen-Versuch nicht poröser Oberflächen zur Bestimmung der bakteriziden und/oder fungiziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel in den Bereichen Lebensmittel, Industrie, Haushalt und öffentliche Einrichtungen - Prüfverfahren ohne mechanische Behandlung und Anforderungen (Phase 2/Stufe 2). *EN 13697*. C. T. 216, European Committee for Standardization (CEN), 1-31.
- CEN (2002) Chemische Desinfektionsmittel - Quantitativer Suspensionversuch zur Bestimmung der sporiziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel in den Bereichen Lebensmittel, Industrie, Haushalt und öffentliche Einrichtungen - Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 1) *EN 13704*. C. T. 216, European Committee for Standardization (CEN), 1-38.
- CEN (2005) Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika - Sporizide Wirkung (Basistest)-Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 1) (deutsche Fassung). *EN 14347*. C. T. 216, European Committee for Standardization (CEN), 1-38.
- CEN (2007a) Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika - Anwendung Europäischer Normen für chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika. *EN 14885*. C. T. 216, European Committee for Standardization (CEN), 1-34.
- CEN (2007b) Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika - Aufbewahrung von Testorganismen für die Prüfung der bakteriziden, mykobakteriziden, sporiziden und fungiziden Wirkung. *EN 12353*. C. T. 216, European Committee for Standardization (CEN), 1-24.
- CEN (2008) Resolution of CEN/TC 216/WG 1 meeting held on 18th and 19th September in Berlin: Resolution 2-2008. *CEN/TC 216 N497*.
- CEN (2009) Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika - Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der bakteriziden Wirkung im humanmedizinischen Bereich - Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 1). *prEN 13727*. C. T. 216, European Committee for Standardization (CEN), 1-52.
- CEN (2010a) N 569 WI Phase2-Step1 anaerobic spores 2010-01-27., CEN TC 216, 1-52.
- CEN (2010b) N 570 Comments_draft_anaerobe [1], CEN TC 216, 1.
- CEN (2010c) N 595 Minutes of 43 meeting on 2010-04-15+16 at AFNOR - Annex B Method and results from tests *C.difficile* 2010-04-14, CEN TC 216, 1-16.
- CEN (2010d) N 628 minutes of 44 meeting on 2010-09-13+14 at Barcelona - Annex C Presentation from Bonn WG1 Meeting 2010-09-13, CEN TC 216, 1-19.
- CEN (2011a) N 590 Sporocidal Task Group 8th Meeting Report. , CEN TC 216 1-7.
- CEN (2011b) N 636 4-Field-Test Ring trial material 2011-02, CEN TC 216.
- CHIBAZAKURA, T., KAWAMURA, F., ASAI, K. & TAKAHASHI, H. (1995) Effects of *spo0* mutations on *spo0A* promoter switching at the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 177, 4520-4523.
- CIESLAK, T.J. & EITZEN, E.M., JR. (1999) Clinical and epidemiologic principles of anthrax. *Emerg Infect Dis*, 5, 552-555.

- CLABOTS, C.R., BETTIN, K.M., PETERSON, L.R. & GERDING, D.N. (1991) Evaluation of cycloserine-cefoxitin-fructose agar and cycloserine-cefoxitin-fructose broth for recovery of *Clostridium difficile* from environmental sites. *J Clin Microbiol*, 29, 2633-2635.
- COIGNARD, B., BARBUT, F., BLANCKAERT, K., THIOLET, J.M., POUJOL, I., CARBONNE, A., PETIT, J.C. & DESENCLOS, J.C. (2006) Emergence of *Clostridium difficile* toxinotype III, PCR-ribotype 027-associated disease, France, 2006. *Euro Surveill*, 11, E060914 060911.
- COZAD, A. & JONES, R.D. (2003) Disinfection and the prevention of infectious disease. *Am J Infect Control*, 31, 243-254.
- CUCCHI, A. & SANCHEZ DE RIVAS, C. (1995) ssp genes and spore osmotolerance in *Bacillus thuringiensis israelensis* and *Bacillus sphaericus*. *Curr Microbiol*, 31, 228-233.
- CUCCHI, A. & SANCHEZ DE RIVAS, C. (1998) SASP (small, acid-soluble spore proteins) and spore properties in *Bacillus thuringiensis israelensis* and *Bacillus sphaericus*. *Curr Microbiol*, 36, 220-225.
- DANIELSON, J.W. (1993) Evaluation of microbial loads of *Bacillus subtilis* spores on penicylinders. *J AOAC Int*, 76, 355-360.
- DELMEE, M., RAMBOER, I., VAN BROECK, J. & SUETENS, C. (2006) Epidemiology of *Clostridium difficile* toxinotype III, PCR-ribotype 027 associated disease in Belgium, 2006. *Euro Surveill*, 11, E060914 060912.
- DETTENKOFER, M. & SPENCER, R.C. (2007) Importance of environmental decontamination--a critical view. *J Hosp Infect*, 65 Suppl 2, 55-57.
- DGHM (2002) Anforderungskatalog für die Aufnahme von chemischen Desinfektionsverfahren in die Desinfektionsmittel-Liste der DGHM - Stand 4.2.2002. mhp-Verlag GmbH, Wiesbaden.
- DHARAN, S., MOURUGA, P., COPIN, P., BESSMER, G., TSCHANZ, B. & PITTET, D. (1999) Routine disinfection of patients' environmental surfaces. Myth or reality? *J Hosp Infect*, 42, 113-117.
- DI STEFANO, F., SIRIRUTTANAPRUK, S., MCCOACH, J. & BURGE, P.S. (1999) Glutaraldehyde: an occupational hazard in the hospital setting. *Allergy*, 54, 1105-1109.
- DIN (1997) DIN 10113-1, Bestimmung des Oberflächenkeimgehaltes auf Einrichtungs- und Bedarfsgegenständen im Lebensmittelbereich - Teil 1: Quantitatives Tupfverfahren. *Deutsches Institut für Normung*.
- DIN (2011) N 535 Tagesordnung 35. Sitzung 2011-03-21, NA 063 Normausschuss Medizin, 1-3.
- DONOVAN, W., ZHENG, L.B., SANDMAN, K. & LOSICK, R. (1987) Genes encoding spore coat polypeptides from *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol*, 196, 1-10.
- DONSKEY, C.J. (2004) The role of the intestinal tract as a reservoir and source for transmission of nosocomial pathogens. *Clin Infect Dis*, 39, 219-226.
- DRIKS, A. (2002) Overview: Development in bacteria: spore formation in *Bacillus subtilis*. *Cell Mol Life Sci*, 59, 389-391.

- DUBOUIX, A., BONNET, E., ALVAREZ, M., BENSAFI, H., ARCHAMBAUD, M., CHAMINADE, B., CHABANON, G. & MARTY, N. (2005) *Bacillus cereus* infections in Traumatology-Orthopaedics Department: retrospective investigation and improvement of healthcare practices. *J Infect*, 50, 22-30.
- DVG (2003) 12. Liste der nach den Richtlinien der DVG geprüften und als wirksam befundenen Desinfektionsmittel für die Tierhaltung (Handelspräparate). Stand Juli 2003. *Deutsches Tierärzteblatt*.
- DVV (1990) Richtlinie der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten e.V. zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren. *Zbl Hyg*, 554-562.
- DVV/RKI (2005) Leitlinie der DVV und des RKI zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln gegen Viren in der Humanmedizin (finale Fassung vom 01.11.2005). *Bundesgesundheitsblatt*, 48, 1420-1426.
- DWORKIN, J. & LOSICK, R. (2005) Developmental commitment in a bacterium. *Cell*, 121, 401-409.
- EGGERTSON, L. (2005) Quebec reports *C. difficile* mortality statistics. *CMAJ*, 173, 139.
- EICHENBERGER, P., FAWCETT, P. & LOSICK, R. (2001) A three-protein inhibitor of polar septation during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, 42, 1147-1162.
- EICHENBERGER, P., FUJITA, M., JENSEN, S.T., CONLON, E.M., RUDNER, D.Z., WANG, S.T., FERGUSON, C., HAGA, K., SATO, T., LIU, J.S. & LOSICK, R. (2004) The program of gene transcription for a single differentiating cell type during sporulation in *Bacillus subtilis*. *PLoS Biol*, 2, e328.
- ENGELHART, S., KRIZEK, L., GLASMACHER, A., FISCHNALLER, E., MARKLEIN, G. & EXNER, M. (2002) *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in a haematology-oncology unit associated with contaminated surface cleaning equipment. *J Hosp Infect*, 52, 93-98.
- ERRINGTON, J. (1993) *Bacillus subtilis* sporulation: regulation of gene expression and control of morphogenesis. *Microbiol Rev*, 57, 1-33.
- ERRINGTON, J. (2003) Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nat Rev Microbiol*, 1, 117-126.
- EXNER, M. (2007) Divergent opinions on surface disinfection: myths or prevention? A review of the literature. *GMS Krankenhhyg Interdiszip*, 2, Doc19.
- EXNER, M. & JUST, H.-M. (2009) Personelle und organisatorische Voraussetzung zur Prävention und Kontrolle nosokomialer Infektionen. *Bundesgesundheitsbl* 9 52, 889-890.
- EXNER, M., VACATA, V., HORNEI, B., DIETLEIN, E. & GEBEL, J. (2004) Household cleaning and surface disinfection: new insights and strategies. *J Hosp Infect*, 56, S70-75.
- EXNER, M., VOGEL, F. & HAMANN, R. (1982) Zur Flächendesinfektion auf einer medizinischen Intensivstation. *Intensivmed*, 19, 26-29.
- FAWCETT, P., MELNIKOV, A. & YOUNGMAN, P. (1998) The *Bacillus* SpoIIIGA protein is targeted to sites of spore septum formation in a SpoIIIE-independent manner. *Mol Microbiol*, 28, 931-943.

- FAWLEY, W.N., PARNELL, P., VERITY, P., FREEMAN, J. & WILCOX, M.H. (2005) Molecular epidemiology of endemic *Clostridium difficile* infection and the significance of subtypes of the United Kingdom epidemic strain (PCR ribotype 1). *J Clin Microbiol*, 43, 2685-2696.
- FAWLEY, W.N., UNDERWOOD, S., FREEMAN, J., BAINES, S.D., SAXTON, K., STEPHENSON, K., OWENS, R.C., JR. & WILCOX, M.H. (2007) Efficacy of hospital cleaning agents and germicides against epidemic *Clostridium difficile* strains. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 28, 920-925.
- FEKETY, R., KIM, K.H., BROWN, D., BATTS, D.H., CUDMORE, M. & SILVA, J., JR. (1981) Epidemiology of antibiotic-associated colitis; isolation of *Clostridium difficile* from the hospital environment. *Am J Med*, 70, 906-908.
- FRAISE, A. (2010) Currently available sporicides for use in healthcare, and their limitations. *J Hosp Infect*, 77, 210-212.
- GEBEL, J., HORNEI, B., VACATA, V., DIETLEIN, E. & M., E. (2004) Neue Erkenntnisse und Bewertung der Eigenschaften von Reinigungs- und Desinfektionsverfahren für die Fläche. *Hyg Med*, 29, 327-333.
- GEBEL, J., KIRSCH-ALTENA, A., BÜTTGEN, S. & EXNER, M. (2008a) Mikrobiologische Anforderungen an Flächen-, Instrumenten- und Wäschedesinfektion - eine Übersicht. *Hyg Med*, 33, 142-152.
- GEBEL, J., KIRSCH-ALTENA, A., EXNER, M. & SCHWEBKE, I. (2008b) Prüfung der Wirksamkeit chemischer Desinfektionsmittel. *Wallhäußers Praxis der Sterilisation, Desinfektion, Antiseptik und Konservierung*. A. Kramer & O. Assadian, Georg Thieme Verlag KG. Stuttgart. 6.
- GEBEL, J., WERNER, H., KIRSCH-ALTENA, A. & BANSEMIER, K. (2001) Standardmethoden der DGHM zur Prüfung chemischer Desinfektionsverfahren. *mhp Verlag*, 1-68.
- GEORGE, W.L., SUTTER, V.L., CITRON, D. & FINEGOLD, S.M. (1979) Selective and differential medium for isolation of *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol*, 9, 214-219.
- GEST, H. & MANDELSTAM, J. (1987) Longevity of microorganisms in natural environments. *Microbiol Sci*, 4, 69-71.
- GHOSH, S., ZHANG, P., LI, Y.Q. & SETLOW, P. (2009) Superdormant spores of *Bacillus* species have elevated wet-heat resistance and temperature requirements for heat activation. *J Bacteriol*, 191, 5584-5591.
- GOORHUIS, A., BAKKER, D., CORVER, J., DEBAST, S.B., HARMANUS, C., NOTERMANS, D.W., BERGWERFF, A.A., DEKKER, F.W. & KUIJPER, E.J. (2008) Emergence of *Clostridium difficile* infection due to a new hypervirulent strain, polymerase chain reaction ribotype 078. *Clin Infect Dis*, 47, 1162-1170.
- GOULD, G.W. (1984) Injury and repair mechanisms in bacterial spores. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser*, 199-220.
- GOULD, G.W. (2006) History of science--spores. *J Appl Microbiol*, 101, 507-513.

- GRAF, K., COHRS, A., GASTMEIER, P., KOLA, A., VONBERG, R.P., MATTNER, F., SOHR, D. & CHABERNY, I.F. (2009) An outbreak of *Clostridium difficile*-associated disease (CDAD) in a German university hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 28, 543-545.
- GRECZ, N., ANELLIS, A. & SCHNEIDER, M.D. (1962) Procedure for cleaning of *Clostridium botulinum* spores. *J Bacteriol*, 84, 552-558.
- GRENHA, R., RZECZORZEK, N.J., BRANNIGAN, J.A., DE JONG, R.N., AB, E., DIERCKS, T., TRUFFAULT, V., LADDS, J.C., FOGG, M.J., BONGIORNI, C., PEREGO, M., KAPTEIN, R., WILSON, K.S., FOLKERS, G.E. & WILKINSON, A.J. (2006) Structural characterization of Spo0E-like protein-aspartic acid phosphatases that regulate sporulation in bacilli. *J Biol Chem*, 281, 37993-38003.
- GUILLOT, C. & MORAN, C.P., JR. (2007) Essential internal promoter in the spoIIIA locus of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 189, 7181-7189.
- HACEK, D.M., OGLE, A.M., FISHER, A., ROBICSEK, A. & PETERSON, L.R. (2010) Significant impact of terminal room cleaning with bleach on reducing nosocomial *Clostridium difficile*. *Am J Infect Control*, 38, 350-353.
- HACHISUKA, Y., KOZUKA, S. & TSUJIKAWA, M. (1984) Exosporia and appendages of spores of *Bacillus* species. *Microbiol Immunol*, 28, 619-624.
- HALL, I.C. & DUFFETT, N.D. (1935) The Identification of von Hible's "Bacillus VI" as *Bacillus carnis* (Klein). *J Bacteriol*, 29, 269-291.
- HALL, I.C. & O'TOLLE, E. (1935) Intestinal flora in new-born infants: with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis*. *Am J Dis Child* 49, 390-402.
- HARALDSEN, J.D. & SONENSHEIN, A.L. (2003) Efficient sporulation in *Clostridium difficile* requires disruption of the sigmaK gene. *Mol Microbiol*, 48, 811-821.
- HENRIQUES, A.O. & MORAN, C.P., JR. (2000) Structure and assembly of the bacterial endospore coat. *Methods*, 20, 95-110.
- HENSGENS, M.P., GOORHUIS, A., NOTERMANS, D.W., VAN BENTHEM, B.H. & KUIJPER, E.J. (2009) Decrease of hypervirulent *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 in the Netherlands. *Euro Surveill*, 14.
- HILBERT, D.W. & PIGGOT, P.J. (2004) Compartmentalization of gene expression during *Bacillus subtilis* spore formation. *Microbiol Mol Biol Rev*, 68, 234-262.
- HOCH, J.A. (1993) The phosphorelay signal transduction pathway in the initiation of *Bacillus subtilis* sporulation. *J Cell Biochem*, 51, 55-61.
- HODGES, N.A., MELLING, J. & PARKER, S.J. (1980) A comparison of chemically defined and complex media for the production of *Bacillus subtilis* spores having reproducible resistance and germination characteristics. *J Pharm Pharmacol*, 32, 126-130.
- HOREJSH, D. & KAMPF, G. (2010) Efficacy of three surface disinfectants against spores of *Clostridium difficile* ribotype 027. *Int J Hyg Environ Health*.
- HUMPHREYS, P.N. (2011) Testing standards for sporicides. *J Hosp Infect*, 77, 193-198.
- IBRAHIM, K.H., BROWN, G., WRIGHT, D.H. & ROTSCHAFER, J.C. (1999) *Bacillus anthracis*: medical issues of biologic warfare. *Pharmacotherapy*, 19, 690-701.

- IFSG (2001) Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen (Infektionsschutzgesetz - IfSG); vom 20. Juli 2000 (BGBl. I S. 1045), zuletzt geändert durch Gesetze vom 17. Juli 2009 (BGBl. I S. 1990 und S. 2091) Verlag Reckinger, Siegburg.
- IHPH (2004) SOP 112: Anreicherung *B. subtilis*-Sporen modifiziert nach Schaeffer, Institut für Hygiene und Öffentliche Gesundheit (IHPH) - Desinfektionsmitteltestung, 1-4.
- IHPH (2010) SOP 156: Anreicherung von *C. difficile*-Sporen, Institut für Hygiene und Öffentliche Gesundheit (IHPH) - Desinfektionsmitteltestung, 1-4.
- IMAMURA, D., KOBAYASHI, K., SEKIGUCHI, J., OGASAWARA, N., TAKEUCHI, M. & SATO, T. (2004) spoIVH (ykvV), a requisite cortex formation gene, is expressed in both sporulating compartments of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 186, 5450-5459.
- INDRA, A., HUHULESCU, S., HASENBERGER, P., SCHMID, D., ALFERY, C., WUERZNER, R., FILLE, M., GATTRINGER, K., KUIJPER, E. & ALLERBERGER, F. (2006) First isolation of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 in Austria. *Euro Surveill*, 11, E060914 060913.
- INDRA, A., HUHULESCU, S., KERNBICHLER, S., KUO, H.W., FEIERL, G., HOLLER, A., SKRABAL, F., TUCEK, G. & ALLERBERGER, F. (2008) First cases of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 acquired in Austria. *Euro Surveill*, 13.
- INGLESBY, T.V., HENDERSON, D.A., BARTLETT, J.G., ASCHER, M.S., EITZEN, E., FRIEDLANDER, A.M., HAUER, J., MCDADE, J., OSTERHOLM, M.T., O'TOOLE, T., PARKER, G., PERL, T.M., RUSSELL, P.K. & TONAT, K. (1999) Anthrax as a biological weapon: medical and public health management. Working Group on Civilian Biodefense. *JAMA*, 281, 1735-1745.
- JACOBS, J.A. & STOBBERINGH, E.E. (1992) Infection due to a contaminated thoracic drainage system. *J Hosp Infect*, 24, 23-28.
- JOHNSON, R.Y. & WHITE, D. (1972) Myxospore formation in *Myxococcus xanthus*: chemical changes in the cell wall during cellular morphogenesis. *J Bacteriol*, 112, 849-855.
- JOSEPH, R., DEMEYER, D., VANRENTERGHEM, D., VAN DEN BERG, R., KUIJPER, E. & DELMEE, M. (2005) First isolation of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027, toxinotype III in Belgium. *Euro Surveill*, 10, E051020 051024.
- KAATZ, G.W., GITLIN, S.D., SCHABERG, D.R., WILSON, K.H., KAUFFMAN, C.A., SEO, S.M. & FEKETY, R. (1988) Acquisition of *Clostridium difficile* from the hospital environment. *Am J Epidemiol*, 127, 1289-1294.
- KAKSONEN, A.H., SPRING, S., SCHUMANN, P., KROPPENSTEDT, R.M. & PUHAKKA, J.A. (2008) *Desulfotomaculum alcoholivorax* sp. nov., a moderately thermophilic, spore-forming, sulfate-reducer isolated from a fluidized-bed reactor treating acidic metal- and sulfate-containing wastewater. *Int J Syst Evol Microbiol*, 58, 833-838.
- KALPOE, J.S., HOGENBIRK, K., VAN MAARSEVEEN, N.M., GESINK-VAN DER VEER, B.J., KRAAKMAN, M.E., MAARLEVELD, J.J., VAN DER REYDEN, T.J., DIJKSHOORN, L. & BERNARDS, A.T. (2008) Dissemination of *Bacillus cereus* in a paediatric intensive care unit traced to insufficient disinfection of reusable ventilator air-flow sensors. *J Hosp Infect*, 68, 341-347.
- KAMPF, G. (2008) *Clostridium difficile* - was ist für eine effektive Desinfektion zu beachten? *Hyg Med*, 33, 153-159.

- KAMPF, G., SHAFFER, M. & HUNTE, C. (2005) Insufficient neutralization in testing a chlorhexidine-containing ethanol-based hand rub can result in a false positive efficacy assessment. *BMC Infect Dis*, 5, 48-50.
- KAPLAN, I. & WILLIAMS, J.W. (1941) Spore Formation among the Anaerobic Bacteria: I. The Formation of Spores by *Clostridium sporogenes* in Nutrient Agar Media. *J Bacteriol*, 42, 265-282.
- KARAS, J.A., ENOCH, D.A. & ALIYU, S.H. (2010) A review of mortality due to *Clostridium difficile* infection. *J Infect*, 61, 1-8.
- KEIJSER, B.J., TER BEEK, A., RAUWERDA, H., SCHUREN, F., MONTIJN, R., VAN DER SPEK, H. & BRUL, S. (2007) Analysis of temporal gene expression during *Bacillus subtilis* spore germination and outgrowth. *J Bacteriol*, 189, 3624-3634.
- KELLY, C.P. & LAMONT, J.T. (2008) *Clostridium difficile*--more difficult than ever. *N Engl J Med*, 359, 1932-1940.
- KILLICK, K.A. (1981) Purification of *Dictyostelium discoideum* spores by centrifugation in Percoll density gradients with retention of morphological and biochemical integrity. *Anal Biochem*, 114, 46-52.
- KIM, K.H., FEKETY, R., BATTS, D.H., BROWN, D., CUDMORE, M., SILVA, J., JR. & WATERS, D. (1981) Isolation of *Clostridium difficile* from the environment and contacts of patients with antibiotic-associated colitis. *J Infect Dis*, 143, 42-50.
- KLEINKAUF, N., WEISS, B., JANSEN, A., ECKMANNS, T., BORNHOFEN, B., KUEHNEN, E., WEIL, H.P. & MICHELS, H. (2007) Confirmed cases and report of clusters of severe infections due to *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 in Germany. *Euro Surveill*, 12, E071115 071112.
- KNOTT, A.G., DANCER, B.N., HANN, A.C. & RUSSELL, A.D. (1997) Non-variable sources of pure water and the germination and outgrowth of *Bacillus subtilis* spores. *J Appl Microbiol*, 82, 267-272.
- KRAMER, A., SCHWEBKE, I. & KAMPF, G. (2006) How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infectious Diseases*, 6.
- KUIJPER, E.J., BARBUT, F., BRAZIER, J.S., KLEINKAUF, N., ECKMANNS, T., LAMBERT, M.L., DRUDY, D., FITZPATRICK, F., WIUFF, C., BROWN, D.J., COIA, J.E., PITUCH, H., REICHERT, P., EVEN, J., MOSSONG, J., WIDMER, A.F., OLSEN, K.E., ALLERBERGER, F., NOTERMANS, D.W., DELMEE, M., COIGNARD, B., WILCOX, M., PATEL, B., FREI, R., NAGY, E., BOUZA, E., MARIN, M., AKERLUND, T., VIROLAINEN-JULKUNEN, A., LYYTIKAINEN, O., KOTILA, S., INGEBRETSEN, A., SMYTH, B., ROONEY, P., POXTON, I.R. & MONNET, D.L. (2008) Update of *Clostridium difficile* infection due to PCR ribotype 027 in Europe, 2008. *Euro Surveill*, 13.
- KUIJPER, E.J., COIGNARD, B., BRAZIER, J.S., SUETENS, C., DRUDY, D., WIUFF, C., PITUCH, H., REICHERT, P., SCHNEIDER, F., WIDMER, A.F., OLSEN, K.E., ALLERBERGER, F., NOTERMANS, D.W., BARBUT, F., DELMEE, M., WILCOX, M., PEARSON, A., PATEL, B.C., BROWN, D.J., FREI, R., AKERLUND, T., POXTON, I.R. & TULL, P. (2007) Update of *Clostridium difficile*-associated disease due to PCR ribotype 027 in Europe. *Euro Surveill*, 12, E1-2.

- KUIJPER, E.J., COIGNARD, B. & TULL, P. (2006a) Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe. *Clin Microbiol Infect*, 12 Suppl 6, 2-18.
- KUIJPER, E.J., VAN DEN BERG, R.J., DEBAST, S., VISSER, C.E., VEENENDAAL, D., TROELSTRA, A., VAN DER KOOI, T., VAN DEN HOF, S. & NOTERMANS, D.W. (2006b) *Clostridium difficile* ribotype 027, toxinotype III, the Netherlands. *Emerg Infect Dis*, 12, 827-830.
- LABBE, R.G. & CHANG, C.A. (1995) Recovery of heat-injured spores of *Clostridium perfringens* types B, C and D by lysozyme and an initiation protein. *Lett Appl Microbiol*, 21, 302-306.
- LAWLEY, T.D., CLARE, S., DEAKIN, L.J., GOULDING, D., YEN, J.L., RAISEN, C., BRANDT, C., LOVELL, J., COOKE, F., CLARK, T.G. & DOUGAN, G. Use of purified *Clostridium difficile* spores to facilitate evaluation of health care disinfection regimens. *Appl Environ Microbiol*, 76, 6895-6900.
- LAWLEY, T.D., CLARE, S., DEAKIN, L.J., GOULDING, D., YEN, J.L., RAISEN, C., BRANDT, C., LOVELL, J., COOKE, F., CLARK, T.G. & DOUGAN, G. (2010) Use of purified *Clostridium difficile* spores to facilitate evaluation of health care disinfection regimens. *Appl Environ Microbiol*, 76, 6895-6900.
- LEE, J.K., MOVAHEDI, S., HARDING, S.E., MACKAY, B.M. & WAITES, W.M. (2007) Effect of small, acid-soluble proteins on spore resistance and germination under a combination of pressure and heat treatment. *J Food Prot*, 70, 2168-2171.
- LEE, K.S., BUMBACA, D., KOSMAN, J., SETLOW, P. & JEDRZEJAS, M.J. (2008) Structure of a protein-DNA complex essential for DNA protection in spores of *Bacillus* species. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 2806-2811.
- LEMMEN, S. (2009) Hygienemaßnahmen auf der Intensivstation. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 134, 2064-2068.
- LEWERIN, S.S., ELVANDER, M., WESTERMARK, T., HARTZELL, L.N., NORSTROM, A.K., EHRS, S., KNUTSSON, R., ENGLUND, S., ANDERSSON, A.C., GRANBERG, M., BACKMAN, S., WIKSTROM, P. & SANDSTEDT, K. (2010) Anthrax outbreak in a Swedish beef cattle herd--1st case in 27 years: Case report. *Acta Vet Scand*, 52, 7.
- LOGAN, N.A. (1988) *Bacillus* species of medical and veterinary importance. *J Med Microbiol*, 25, 157-165.
- LOO, V.G., POIRIER, L., MILLER, M.A., OUGHTON, M., LIBMAN, M.D., MICHAUD, S., BOURGAULT, A.M., NGUYEN, T., FRENETTE, C., KELLY, M., VIBIEN, A., BRASSARD, P., FENN, S., DEWAR, K., HUDSON, T.J., HORN, R., RENE, P., MONCZAK, Y. & DASCAL, A. (2005) A predominantly clonal multi-institutional outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea with high morbidity and mortality. *N Engl J Med*, 353, 2442-2449.
- MACCANNELL, D.R., LOUIE, T.J., GREGSON, D.B., LAVERDIERE, M., LABBE, A.C., LAING, F. & HENWICK, S. (2006) Molecular analysis of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 isolates from Eastern and Western Canada. *J Clin Microbiol*, 44, 2147-2152.
- MADIGAN, M.T., MARTINKO J.M., PARKER, P. (2001) Brock Mikrobiologie. Spektrum Akademischer Verlag.

- MAGGE, A., GRANGER, A.C., WAHOME, P.G., SETLOW, B., VEPACHEDU, V.R., LOSHON, C.A., PENG, L., CHEN, D., LI, Y.Q. & SETLOW, P. (2008) Role of dipicolinic acid in the germination, stability, and viability of spores of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 190, 4798-4807.
- MAGILL, N.G., LOSHON, C.A. & SETLOW, P. (1990) Small, acid-soluble, spore proteins and their genes from two species of *Sporosarcina*. *FEMS Microbiol Lett*, 60, 293-297.
- MAJCHER, M.R., BERNARD, K.A. & SATTAR, S.A. (2008) Identification by quantitative carrier test of surrogate spore-forming bacteria to assess sporicidal chemicals for use against *Bacillus anthracis*. *Appl Environ Microbiol*, 74, 676-681.
- MARRE, R., MERTENS, T., TRAUTMANN, M. & VANEK, E. (2000) *Klinische Infektiologie*. Urban & Fischer Verlag.
- MARTIN, M. (2010). Spezifische Unterschiede bei der sporiziden Wirksamkeit von Desinfektionsmittel gegenüber klinischen Isolaten von *Clostridium difficile*. 10. Internationaler Kongress der Deutschen Gesellschaft für Krankenhaushygiene (DGKH), HygMed.
- MARTIN, U., SONNTAG, A.-K., NEUHAUS, B. & KARCH, H. (2004) Flächendesinfektion in Pflegeheimen, was geschieht wirklich? Studie zur Erfolgskontrolle in drei Duisburger Pflegeheimen. *Gesundh.-Wes.*, 66, 682-687.
- MARTIROSIAN, G. (2006) Recovery of *Clostridium difficile* from hospital environments. *J Clin Microbiol*, 44, 1202-1203.
- MAYFIELD, J.L., LEET, T., MILLER, J. & MUNDY, L.M. (2000) Environmental control to reduce transmission of *Clostridium difficile*. *Clin Infect Dis*, 31, 995-1000.
- MCDONALD, L.C., KILLGORE, G.E., THOMPSON, A., OWENS, R.C., JR., KAZAKOVA, S.V., SAMBOL, S.P., JOHNSON, S. & GERDING, D.N. (2005) An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. *N Engl J Med*, 353, 2433-2441.
- MCDONALD, L.C., OWINGS, M. & JERNIGAN, D.B. (2006) *Clostridium difficile* infection in patients discharged from US short-stay hospitals, 1996-2003. *Emerg Infect Dis*, 12, 409-415.
- MCDONNELL, G. & RUSSELL, A.D. (1999) Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev*, 12, 147-179.
- MCFARLAND, L.V. (2002) What's lurking under the bed? Persistence and predominance of particular *Clostridium difficile* strains in a hospital and the potential role of environmental contamination. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 23, 639-640.
- MCFARLAND, L.V., MULLIGAN, M.E., KWOK, R.Y. & STAMM, W.E. (1989) Nosocomial acquisition of *Clostridium difficile* infection. *N Engl J Med*, 320, 204-210.
- MERRIGAN, M., VENUGOPAL, A., MALLOZZI, M., ROXAS, B., VISWANATHAN, V.K., JOHNSON, S., GERDING, D.N. & VEDANTAM, G. (2010) Human hypervirulent *Clostridium difficile* strains exhibit increased sporulation as well as robust toxin production. *J Bacteriol*, 192, 4904-4911.

- MILLER, J.J., SCOTT, I.U., FLYNN, H.W., JR., SMIDDY, W.E., MURRAY, T.G., BERROCAL, A. & MILLER, D. (2008) Endophthalmitis caused by *Bacillus* species. *Am J Ophthalmol*, 145, 883-888.
- MILLER, M.A., HYLAND, M., OFNER-AGOSTINI, M., GOURDEAU, M. & ISHAK, M. (2002) Morbidity, mortality, and healthcare burden of nosocomial *Clostridium difficile*-associated diarrhea in Canadian hospitals. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 23, 137-140.
- MOIR, A. (2006) How do spores germinate? *J Appl Microbiol*, 101, 526-530.
- MOIR, A. & SMITH, D.A. (1990) The genetics of bacterial spore germination. *Annu Rev Microbiol*, 44, 531-553.
- MOLIN, G. (1977) Dry-heat resistance of *Bacillus subtilis* spores in contact with serum albumin, carbohydrates or lipids. *J Appl Bacteriol*, 42, 111-116.
- MÜLLER, M., TILKES, F. & WILLE, B. (2008) Hygiene von A-Z. B. Behr's verlag GmbH & Co. KG
- NAKAMURA, L.K., ROBERTS, M.S. & COHAN, F.M. (1999) Relationship of *Bacillus subtilis* clades associated with strains 168 and W23: a proposal for *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* subsp. nov. and *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* subsp. nov. *Int J Syst Bacteriol*, 49 Pt 3, 1211-1215.
- NAKAMURA, S., YAMAKAWA, K., IZUMI, J., NAKASHIO, S. & NISHIDA, S. (1985) Germinability and heat resistance of spores of *Clostridium difficile* strains. *Microbiol Immunol*, 29, 113-118.
- NAZINA, T.N. & PIVOVAROVA, T.A. (1979) [Submicroscopic organization and spore formation of *Desulfotomaculum nigrificans*]. *Mikrobiologiya*, 48, 302-306.
- NICHOLSON, W.L. & GALEANO, B. (2003) UV resistance of *Bacillus anthracis* spores revisited: validation of *Bacillus subtilis* spores as UV surrogates for spores of *B. anthracis* Sterne. *Appl Environ Microbiol*, 69, 1327-1330.
- NICHOLSON, W.L. & SETLOW, P. (1990) Molecular biological methods for *Bacillus*: Sporulation, germination and outgrowth. John Wiley and Sons, New York.
- NORTHFIELD, T.C. & MCCOLL, I. (1973) Postprandial concentrations of free and conjugated bile acids down the length of the normal human small intestine. *Gut*, 14, 513-518.
- NRZ (2010) Surveillance Protokoll: *Clostridium difficile* assoziierte Dirrhö in Krankenhäusern. *CDAD-KISS Protokoll, Stand: 06/2010*, 1-10.
- OECD (2008) Draft Sept-03-08: Guidance Document on OECD Guideline for evaluating microbiocides on surfaces (GEMS). *OECD Document des Ringversuchs 2008*, 1-26.
- ORMEROD, J.G., KIMBLE, L.K., NESBAKKEN, T., TORGERSEN, Y.A., WOESE, C.R. & MADIGAN, M.T. (1996) *Heliophilum fasciatum* gen. nov. sp. nov. and *Heliobacterium gestii* sp. nov.: endospore-forming heliobacteria from rice field soils. *Arch Microbiol*, 165, 226-234.
- OWENS, R.C., JR., DONSKEY, C.J., GAYNES, R.P., LOO, V.G. & MUTO, C.A. (2008) Antimicrobial-associated risk factors for *Clostridium difficile* infection. *Clin Infect Dis*, 46 Suppl 1, S19-31.

- PANESSA-WARREN, B.J., TORTORA, G.T. & WARREN, J.B. (1997) Exosporial membrane plasticity of *Clostridium sporogenes* and *Clostridium difficile*. *Tissue Cell*, 29, 449-461.
- PEPIN, J., VALIQUETTE, L. & COSSETTE, B. (2005) Mortality attributable to nosocomial *Clostridium difficile*-associated disease during an epidemic caused by a hypervirulent strain in Quebec. *CMAJ*, 173, 1037-1042.
- PEREZ, J., SPRINGTHORPE, V.S. & SATTAR, S.A. (2005) Activity of selected oxidizing microbicides against the spores of *Clostridium difficile*: relevance to environmental control. *Am J Infect Control*, 33, 320-325.
- PEREZ, J., SPRINGTHORPE, V.S. & SATTAR, S.A. (2011) Clospore: A liquid medium for producing high titers of semi-purified spores of *Clostridium difficile*. *Journal of AOAC International*, 94, 1-9.
- PETERS, J. & SPICHER, G. (1988) Zur Eignung von Natriumhypochlorit und Chloramin T für die Flächendesinfektion. *Bundesgesetzblatt*, 31, 330-335.
- PHILLIPS, Z.E. & STRAUCH, M.A. (2002) *Bacillus subtilis* sporulation and stationary phase gene expression. *Cell Mol Life Sci*, 59, 392-402.
- PIGGOT, P.J. (1996) Spore development in *Bacillus subtilis*. *Curr Opin Genet Dev*, 6, 531-537.
- PIGGOT, P.J. & COOTE, J.G. (1976) Genetic aspects of bacterial endospore formation. *Bacteriol Rev*, 40, 908-962.
- PIGGOT, P.J. & HILBERT, D.W. (2004) Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Curr Opin Microbiol*, 7, 579-586.
- PLÖßER, P. (2007) *Clostridium difficile*: Nachweis von Ribotyp 027 in Deutschland - *Clostridium difficile* im Überblick - Hygienemaßnahmen. *Hygiene und Medizin*, 32, 403-405.
- POPHAM, D.L., SENGUPTA, S. & SETLOW, P. (1995) Heat, hydrogen peroxide, and UV resistance of *Bacillus subtilis* spores with increased core water content and with or without major DNA-binding proteins. *Appl Environ Microbiol*, 61, 3633-3638.
- POPOFF, M.R., RUBIN, E.J., GILL, D.M. & BOQUET, P. (1988) Actin-specific ADP-ribosyltransferase produced by a *Clostridium difficile* strain. *Infect Immun*, 56, 2299-2306.
- PORTNOY, B.L., GOEPFERT, J.M. & HARMON, S.M. (1976) An outbreak of *Bacillus cereus* food poisoning resulting from contaminated vegetable sprouts. *Am J Epidemiol*, 103, 589-594.
- PORWAL, S., LAL, S., CHEEMA, S. & KALIA, V.C. (2009) Phylogeny in aid of the present and novel microbial lineages: diversity in *Bacillus*. *PLoS One*, 4, e4438.
- POUTANEN, S.M. & SIMOR, A.E. (2004) *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults. *CMAJ*, 171, 51-58.
- RAIBAUD, P., DUCLUZEAU, R., DUBOS, F. & SACQUET, E. (1972) Spore formation and germination of *Clostridium perfringens* in the digestive tract of holoxenic and axenic mice. *J Appl Bacteriol*, 35, 177-184.
- RANGHILD, M. (2003) Robert Koch und sein Nachlass in Berlin. Walter de Gruyter.

- RAVIS, S.M., SHAFFER, M.P., SHAFFER, C.L., DEHKHAGHANI, S. & BELSITO, D.V. (2003) Glutaraldehyde-induced and formaldehyde-induced allergic contact dermatitis among dental hygienists and assistants. *J Am Dent Assoc*, 134, 1072-1078.
- REDELINGS, M.D., SORVILLO, F. & MASCOLA, L. (2007) Increase in Clostridium difficile-related mortality rates, United States, 1999-2004. *Emerg Infect Dis*, 13, 1417-1419.
- REICHARDT, C., CHABERNY, I.F., KOLA, A., MATTNER, F., VONBERG, R.P. & GASTMEIER, P. (2007) Dramatischer Anstieg von Clostridium-difficile-assoziiierter Diarrhoe in Deutschland. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 132, 223-228.
- RIEDER, T. (2006) Sporulation und Glykogensynthese bei Clostridium acetobutylicum ATCC 824. Diplomarbeit Thesis, Universität Rostock.
- RIGGS, M.M., SETHI, A.K., ZABARSKY, T.F., ECKSTEIN, E.C., JUMP, R.L. & DONSKEY, C.J. (2007) Asymptomatic carriers are a potential source for transmission of epidemic and nonepidemic Clostridium difficile strains among long-term care facility residents. *Clin Infect Dis*, 45, 992-998.
- RILEY, T.V., ADAMS, J.E., O'NEILL, G.L. & BOWMAN, R.A. (1991) Gastrointestinal carriage of Clostridium difficile in cats and dogs attending veterinary clinics. *Epidemiol Infect*, 107, 659-665.
- RKI (2004) Anforderungen an die Hygiene bei der Reinigung und Desinfektion von Flächen. *Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz*, 51-61.
- RKI (2007a) Clostridium difficile Ribotyp 027: Bestätigte schwere Infektionen in Deutschland. *Epidemiologisches Bulletin*, 46, 424-425.
- RKI (2007b) Erster Nachweis von Clostridium difficile, Ribotyp 027 in Deutschland - Erreger mit hoher Virulenz (Kurzinformation). *Epidemiologisches Bulletin*, 41, 386.
- RKI (2007c) Schwer verlaufende Infektionen mit Clostridium difficile: Zur Meldepflicht. *Epidemiologisches Bulletin*, 46, 424.
- RKI (2007d) Vorwort zur Liste der vom Robert Koch-Institut geprüften und anerkannten Desinfektionsmittel und -verfahren. *Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz* 50, 1332-1334.
- RKI (2008a) Arbeitsanleitung: Herstellung einer Sporensuspension von *Cl. difficile* (RKI / modifiziert nach Dr. Gebel), Robert Koch-Institut, 1-2.
- RKI (2008b) Clostridium-difficile-assoziierte Diarrhö: Zunehmende Inzidenz in Deutschland. *Epidemiologisches Bulletin*, 15, 119.
- RKI (2008c) Clostridium difficile: Zum Stand der Meldungen schwer verlaufender Infektionen in Deutschland. *Epidemiologisches Bulletin*, 15, 117-119.
- RKI (2008d) Empfehlungen des Robert Koch- Institutes zu Hygienemaßnahmen bei Patienten mit Durchfällen aufgrund von toxinbildendem. *Erscheinungsdatum 11.12.2008*.
- RKI (2009) Clostridium difficile - RKI-Ratgeber Infektionskrankheiten - Merkblätter für Ärzte. *Epidemiologisches Bulletin*, 24, 233-239.

- RKI (2010) Clostridium-difficile-Infektionen: Übermittlungen gemäß IfSG von 01/2008 bis 12/2009. *Epidemiologisches Bulletin*, 10, 87-89.
- ROBERTS, T.A. & DERRICK, C.M. (1975) Sporulation of Clostridium putrefaciens and the resistance of the spores to heat, gamma-radiation and curing salts. *J Appl Bacteriol*, 38, 33-37.
- ROSE, R., SETLOW, B., MONROE, A., MALLOZZI, M., DRIKS, A. & SETLOW, P. (2007) Comparison of the properties of Bacillus subtilis spores made in liquid or on agar plates. *J Appl Microbiol*, 103, 691-699.
- ROUSSEAU, C., POILANE, I., DIAKITE, F., FEGHOUL, L., CRUAUD, P. & COLLIGNON, A. (2010) [Comparison of three Clostridium difficile culture media: interest of enhancing spore germination media?]. *Pathol Biol (Paris)*, 58, 58-61.
- RÜDEN, H. & DASCHNER, F. (2002) Should we routinely disinfect floors? *J Hosp Infect*, 51, 309; author reply 309-311.
- RUSSELL, A.D. (1990) Bacterial spores and chemical sporicidal agents. *Clin Microbiol Rev*, 3, 99-119.
- RUSSELL, A.D. (1994) Glutaraldehyde: current status and uses. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 15, 724-733.
- RUSSELL, A.D. (1998) Assessment of sporicidal efficacy. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 41, 281-287.
- RUSSELL, A.D. (1999) Bacterial resistance to disinfectants: present knowledge and future problems. *J Hosp Infect*, 43, S57-68.
- RUTALA, W.A. & WEBER, D.J. (1997) Uses of inorganic hypochlorite (bleach) in health-care facilities. *Clin Microbiol Rev*, 10, 597-610.
- RYTER, A. (1965) [Morphologic Study of the Sporulation of Bacillus Subtilis.]. *Ann Inst Pasteur (Paris)*, 108, 40-60.
- SADOFF, H.L. (1975) Encystment and germination in Azotobacter vinelandii. *Bacteriol Rev*, 39, 516-539.
- SAMORE, M.H., VENKATARAMAN, L., DEGIROLAMI, P.C., ARBEIT, R.D. & KARCHMER, A.W. (1996) Clinical and molecular epidemiology of sporadic and clustered cases of nosocomial Clostridium difficile diarrhea. *Am J Med*, 100, 32-40.
- SCHLOTTMANN, R., KAUP, B., KAASE, M., TANNAPFEL, A., SCHMIDT, W.E. & SCHMITZ, F. (2007) Clostridium difficile-assoziierte Erkrankungen. *Springer Medizin Verlag GmbH*, 2, 53-63.
- SCHNEIDER, T., ECKMANNS, T., IGNATIUS, R., WEIST, K. & LIESENFELD, O. (2007) Clostridium-difficile-assoziierte Diarrhö - Ein zunehmendes klinisches Problem durch neue hochvirulente Erreger. *Deutsches Ärzteblatt*, 104, A 1588-1594.
- SEHULSTER, L. & CHINN, R.Y. (2003) Guidelines for environmental infection control in health-care facilities. Recommendations of CDC and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). *MMWR Recomm Rep*, 52, 1-42.

- SERRANO, M., ZILHAO, R., RICCA, E., OZIN, A.J., MORAN, C.P., JR. & HENRIQUES, A.O. (1999) A *Bacillus subtilis* secreted protein with a role in endospore coat assembly and function. *J Bacteriol*, 181, 3632-3643.
- SETLOW, B. & SETLOW, P. (1988) Decreased UV light resistance of spores of *Bacillus subtilis* strains deficient in pyrimidine dimer repair and small, acid-soluble spore proteins. *Appl Environ Microbiol*, 54, 1275-1276.
- SETLOW, B. & SETLOW, P. (1995) Small, acid-soluble proteins bound to DNA protect *Bacillus subtilis* spores from killing by dry heat. *Appl Environ Microbiol*, 61, 2787-2790.
- SETLOW, B. & SETLOW, P. (1996) Role of DNA repair in *Bacillus subtilis* spore resistance. *J Bacteriol*, 178, 3486-3495.
- SETLOW, P. (1988) Small, acid-soluble spore proteins of *Bacillus* species: structure, synthesis, genetics, function, and degradation. *Annu Rev Microbiol*, 42, 319-338.
- SETLOW, P. (2001) Resistance of spores of *Bacillus* species to ultraviolet light. *Environ Mol Mutagen*, 38, 97-104.
- SETLOW, P. (2003) Spore germination. *Curr Opin Microbiol*, 6, 550-556.
- SETLOW, P. (2006) Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *J Appl Microbiol*, 101, 514-525.
- SHAKER, L.A., FURR, J.R. & RUSSELL, A.D. (1988) Mechanism of resistance of *Bacillus subtilis* spores to chlorhexidine. *J Appl Bacteriol*, 64, 531-539.
- SHETTY, N., SRINIVASAN, S., HOLTON, J. & RIDGWAY, G.L. (1999) Evaluation of microbicidal activity of a new disinfectant: Sterilox 2500 against *Clostridium difficile* spores, *Helicobacter pylori*, vancomycin resistant *Enterococcus* species, *Candida albicans* and several *Mycobacterium* species. *J Hosp Infect*, 41, 101-105.
- SIMON, A., BIERBAUM, G., ENGELHART, S., EXNER, M., KRAMER, M., BODE, U., FLEISCHHACK, G. & 2001, S.O. (2007) Nosokomiale *Clostridium-difficile*-assoziierte Erkrankungen bei pädiatrisch-onkologischen Patienten - Ergebnisse einer prospektiven Surveillancestudie. *Hyg Med*, 32, 170-176.
- SORG, J.A. & SONENSHEIN, A.L. (2008) Bile salts and glycine as cogermnants for *Clostridium difficile* spores. *J Bacteriol*, 190, 2505-2512.
- SORG, J.A. & SONENSHEIN, A.L. (2009) Chenodeoxycholate is an inhibitor of *Clostridium difficile* spore germination. *J Bacteriol*, 191, 1115-1117.
- SPENCER, R.C. (2003) *Bacillus anthracis*. *J Clin Pathol*, 56, 182-187.
- SPRINGTHORPE, V.S. & SATTAR, S.A. (2005) Carrier tests to assess microbicidal activities of chemical disinfectants for use on medical devices and environmental surfaces. *J AOAC Int*, 88, 182-201.
- STABLER, R.A., HE, M., DAWSON, L., MARTIN, M., VALIENTE, E., CORTON, C., LAWLEY, T.D., SEBAIHIA, M., QUAIL, M.A., ROSE, G., GERDING, D.N., GIBERT, M., POPOFF, M.R., PARKHILL, J., DOUGAN, G. & WREN, B.W. (2009) Comparative genome and phenotypic analysis of *Clostridium difficile* 027 strains provides insight into the evolution of a hypervirulent bacterium. *Genome Biol*, 10, R102.

- SUETENS, C. (2008) Clostridium difficile: summary of actions in the European Union. *Euro Surveill*, 13.
- SUNDE, E.P., SETLOW, P., HEDERSTEDT, L. & HALLE, B. (2009) The physical state of water in bacterial spores. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 19334-19339.
- TACHON, M., CATTOEN, C., BLANCKAERT, K., POUJOL, I., CARBONNE, A., BARBUT, F., PETIT, J.C. & COIGNARD, B. (2006) First cluster of C. difficile toxinotype III, PCR-ribotype 027 associated disease in France: preliminary report. *Euro Surveill*, 11, E060504 060501.
- TAKAMATSU, H., KODAMA, T., IMAMURA, A., ASAI, K., KOBAYASHI, K., NAKAYAMA, T., OGASAWARA, N. & WATABE, K. (2000) The Bacillus subtilis yabG gene is transcribed by SigK RNA polymerase during sporulation, and yabG mutant spores have altered coat protein composition. *J Bacteriol*, 182, 1883-1888.
- TALLENIRE, A. & CHIORI, C.O. (1963) Heat and Gamma-Radiation Resistance of Bacillus Megaterium Spores. *J Pharm Pharmacol*, 15, SUPPL 148-149.
- TEDESCO, F.J. & ALPERS, D.H. (1974) Editorial: Pseudomembranous colitis. *West J Med*, 121, 499-500.
- TEDESCO, F.J., BARTON, R.W. & ALPERS, D.H. (1974) Clindamycin-associated colitis. A prospective study. *Ann Intern Med*, 81, 429-433.
- TINDALL, B.J. & GARRITY, G.M. (2008) Should we alter the way that authorship of a subspecies name that is automatically created under Rule 40d of the Bacteriological Code is cited? *Int J Syst Evol Microbiol*, 58, 1991-1992.
- TITUS, J.A., REED, W.M., PFISTER, R.M. & DUGAN, P.R. (1982) Exospore formation in Methylosinus trichosporium. *J Bacteriol*, 149, 354-360.
- TURNER, A.J., GALVIN, J.W., RUBIRA, R.J. & MILLER, G.T. (1999) Anthrax explodes in an Australian summer. *J Appl Microbiol*, 87, 196-199.
- UHLIG, S., SIMON, K., ANTONI, S. & KUNATH, K. (2009) Ergebnisbericht 2009: Quantitativer Suspensionsversuch nach DGHM. *quodata Gesellschaft für Qualitätsmanagement und Statistik mbH*, 1-84.
- UHLIG, S., SIMON, K. & KUNATH, K. (2010) Ergebnisdarstellung Methodenringversuch VAH 2010. *quodata Gesellschaft für Qualitätsmanagement und Statistik mbH* 1-23.
- VAH-MITTEILUNG (2007) Stellungnahme der Desinfektionsmittel- Kommission im Verbund für Angewandte Hygiene (VAH) zur Äquivalenz von Prüfungen gemäß den "Standardmethoden der DGHM zur Prüfung chemischer Desinfektionsverfahren" und Prüfungen gemäß europäischer Normen (CEN TC 216). *Hyg Med*, 32, 128-129.
- VAH (2009) Desinfektionsmittel-Liste des VAH - Stand 01.09.2009: Liste der von der Desinfektionsmittel-Kommission im Verbund für Angewandte Hygiene (VAH) e.V. in Zusammenarbeit mit den Fachgesellschaften bzw. Berufsverbänden DGHM, DGKH, GHUP, DVG, BVÖGD und BDH auf der Basis der Standardmethoden der DGHM zur Prüfung chemischer Desinfektionsverfahren geprüften und als wirksam befundenen Verfahren für die prophylaktische Desinfektion und die hygienische Händewaschung. mhp-Verlag, Wiesbaden.

- VAN DER ZWET, W.C., PARLEVIET, G.A., SAVELKOUL, P.H., STOOFF, J., KAISER, A.M., VAN FURTH, A.M. & VANDENBROUCKE-GRAULS, C.M. (2000) Outbreak of *Bacillus cereus* infections in a neonatal intensive care unit traced to balloons used in manual ventilation. *J Clin Microbiol*, 38, 4131-4136.
- VAN STEENBERGEN, J., DEBAST, S., VAN KREGTEN, E., VAN DEN BERG, R., NOTERMANS, D. & KUIJPER, E. (2005) Isolation of *Clostridium difficile* ribotype 027, toxinotype III in the Netherlands after increase in *C. difficile*-associated diarrhoea. *Euro Surveill*, 10, E050714 050711.
- VASUDEVAN, P., WEAVER, A., REICHERT, E.D., LINNSTAEDT, S.D. & POPHAM, D.L. (2007) Spore cortex formation in *Bacillus subtilis* is regulated by accumulation of peptidoglycan precursors under the control of sigma K. *Mol Microbiol*, 65, 1582-1594.
- VERITY, P., WILCOX, M.H., FAWLEY, W. & PARNELL, P. (2001) Prospective evaluation of environmental contamination by *Clostridium difficile* in isolation side rooms. *J Hosp Infect*, 49, 204-209.
- VONBERG, R.P., SCHWAB, F. & GASTMEIER, P. (2007) *Clostridium difficile* in discharged inpatients, Germany. *Emerg Infect Dis*, 13, 179-180.
- VOTAVA, M. & SLITROVA, B. (2009) [Comparison of susceptibility of spores of *Bacillus subtilis* and Czech strains of *Clostridium difficile* to disinfectants]. *Epidemiol Mikrobiol Imunol*, 58, 36-42.
- WACLAWSKI, E.R., MCALPINE, L.G. & THOMSON, N.C. (1989) Occupational asthma in nurses caused by chlorhexidine and alcohol aerosols. *BMJ*, 298, 929-930.
- WANG, S.T., SETLOW, B., CONLON, E.M., LYON, J.L., IMAMURA, D., SATO, T., SETLOW, P., LOSICK, R. & EICHENBERGER, P. (2006) The forespore line of gene expression in *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol*, 358, 16-37.
- WARTH, A.D. & STROMINGER, J.L. (1969) Structure of the peptidoglycan of bacterial spores: occurrence of the lactam of muramic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 64, 528-535.
- WARTH, A.D. & STROMINGER, J.L. (1972) Structure of the peptidoglycan from spores of *Bacillus subtilis*. *Biochemistry*, 11, 1389-1396.
- WHEELDON, L.J., WORTHINGTON, T., HILTON, A.C., LAMBERT, P.A. & ELLIOTT, T.S. (2008) Sporicidal activity of two disinfectants against *Clostridium difficile* spores. *Br J Nurs*, 17, 316-320.
- WILCOX, M.H., FAWLEY, W.N. & PARNELL, P. (2000) Value of lysozyme agar incorporation and alkaline thioglycollate exposure for the environmental recovery of *Clostridium difficile*. *J Hosp Infect*, 44, 65-69.
- WILCOX, M.H., FAWLEY, W.N., WIGGLESWORTH, N., PARNELL, P., VERITY, P. & FREEMAN, J. (2003) Comparison of the effect of detergent versus hypochlorite cleaning on environmental contamination and incidence of *Clostridium difficile* infection. *J Hosp Infect*, 54, 109-114.
- WILCOX, M.H., FRAISE, A.P., BRADLEY, C.R., WALKER, J. & FINCH, R.G. (2011) Sporicides for *Clostridium difficile*: the devil is in the detail. *J Hosp Infect*, 77, 187-188.
- WILSON, K.H. (1983) Efficiency of various bile salt preparations for stimulation of *Clostridium difficile* spore germination. *J Clin Microbiol*, 18, 1017-1019.

- WILSON, K.H., SHEAGREN, J.N. & FRETER, R. (1985) Population dynamics of ingested *Clostridium difficile* in the gastrointestinal tract of the Syrian hamster. *J Infect Dis*, 151, 355-361.
- WIRTZ, R. (1908) Eine einfache Art der Sporenfärbung. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig.* 46, 727- 728.
- WULLT, M., ODENHOLT, I. & WALDER, M. (2003) Activity of three disinfectants and acidified nitrite against *Clostridium difficile* spores. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 24, 765-768.
- WYANT, Z.N. & NORMINGTON, R. (1920) The Influence of Various Chemical and Physical Agencies upon *Bacillus botulinus* and Its Spores: I. Resistance to Salt. *J Bacteriol*, 5, 553-557.
- YUDKIN, M. (1993) Spore formation in *Bacillus subtilis*. *Sci Prog*, 77 (Pt 1-2), 113-130.
- ZHENG, L.B. & LOSICK, R. (1990) Cascade regulation of spore coat gene expression in *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol*, 212, 645-660.

ANHANG

- A. Desinfektionsmittel und die verwendeten Neutralisatoren

Produkt	Wirkstoffbasis	Neutralisator
F1	Chlorabspaltende Verbindung	TSH-Thio
F2	Peroxidverbindung	TSH-Thio
F3	Aldehyde	Na-Thio
F4	Chloramid	TSH-Thio
F5	Chloramid	Na-Thio
F6	Peroxidverbindung, organische Säure	TSH-Thio
F7	Peroxidverbindung	TSH-Thio
F8	Chlorabspaltende Verbindung	Na-Thio
F9	Quaternäre Verbindung, Alkylaminderivat	β-Cyclodextrin
F10	Peroxidverbindung	TSH-Thio
F11	Quaternäre Verbindung, Alkylaminderivat	TSH-Thiot
F12	Aldehyd, quaternäre Verbindung	Glycin
F13	Chlorabspaltende Verbindung	TSH-Thio
F14	Aldehyde, quaternäre Verbindung	TSH-Thio
F15	Chlorabspaltende Verbindung	Na-Thio
F16	Peroxidverbindung	TSH-Thio
F17	Aldehyde, quaternäre Verbindung	Na-Thio
F18	Aldehyde	TLH-Glycin
F19	Peroxidverbindung	Na-Thio + 0,01% Katalase
F20	Peroxidverbindung	Na-Thio
F21	Peroxidverbindung	Na-Thios
F22	Quaternäre Verbindungen	TL-SDS
F23	Quaternäre Verbindungen	TL-SDS
F24	Alkohole, quaternäre Verbindung	TL-SDS
F25	Chloramid	Na-Thio
F26	Quaternäre Verbindungen, Aldehyde	TLC-Thio
F27	Chloramid	Na-Thio
GA	Glutaraldehyd Standard	Glycin
PAA	Peressigsäure Standard	Na-Thio

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. med. M. Exner möchte ich ganz besonders für die Überlassung dieses interessanten Forschungsthemas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und sein stetes Vertrauen danken. Außerdem möchte ich mich für sein fortwährendes Interesse und seine konstruktiven Anregungen während der gesamten Bearbeitungszeit bedanken. Nicht zuletzt dadurch wurde mir die Relevanz dieser Arbeit stets verdeutlicht.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. H.-G. Sahl danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats und die Bereitschaft, als Zweitbetreuer aus der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen-Fakultät einzutreten.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. J. Gebel für die uneingeschränkte Unterstützung in allen fachlichen Belangen, die stetige Hilfsbereitschaft und Motivation während dieser Arbeit. Durch ihn und seinen enormen Optimismus ist es mir letztlich gelungen die Arbeit fertig zu stellen. Gleichzeitig möchte ich mich für seinen Rückhalt und die wertvollen Einblicke und Einarbeitungen in sämtliche Themenbereiche bedanken.

Im Labor möchte ich mich bei Frau S. Koch, Frau L. Zeppenfeld und Frau S. Biebersdorf für die Diskussionsbereitschaft bei diversen Fragestellungen, die stetige Hilfsbereitschaft und vor allem die angenehme Zusammenarbeit im Laboralltag bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Dr. J. Lenz und Herrn S. Linke bedanken, die mir insbesondere in der Endphase der Arbeit mit konstruktiver Kritik eine große Hilfe waren.

Ferner danke ich Frau G. Henkel und allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Hygiene und öffentliche Gesundheit für die freundliche Zusammenarbeit und die prompte Unterstützung bei verschiedenen Fragestellungen.

Frau Dr. I. Schwebke des Robert Koch-Instituts und Herrn Prof. Dr. S. Sattar sowie den Mitarbeitern des Centre for Research on Environmental Microbiology (CREM) danke ich für den fachlichen Austausch, der auch sicherlich über diese Arbeit hinaus fortgeführt werden wird.

Ganz besonders möchte ich an dieser Stelle meinem Ehemann, meinen Eltern, meiner Schwester und meinen Freunden danken, die mich während meiner Dissertation uneingeschränkt unterstützten, motivierten und mir enormen Rückhalt gaben.