

Universität Ulm
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Steffen Stenger

Umgebungskontamination durch *Clostridium difficile* im Krankenhaus

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Susanne Etscheid
geb. in Trier

2017

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Heike von Baum
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Claus-Martin Muth
Tag der Promotion: 26.10.2017

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Abkürzungsverzeichnis | III |
| 1. Einleitung..... | 1 |
| 1.1 Die Gattung Clostridium..... | 1 |
| 1.2 Clostridium difficile | 1 |
| 1.3 Toxine | 2 |
| 1.4 Epidemiologie | 2 |
| 1.5 Risikofaktoren | 3 |
| 1.6 Clostridium-difficile-assoziierte Erkrankungen | 4 |
| 1.7 Diagnostik | 4 |
| 1.8 Therapie der C. difficile-Infektion | 5 |
| 1.9 Übertragung..... | 6 |
| 1.10 Zielsetzung dieser Arbeit | 7 |
| 2. Material und Methoden..... | 8 |
| 2.1 Ermittlung der Mindestkonzentration an KBE in einer Lösung zur Gewährleistung einer zuverlässigen kulturellen Anzucht..... | 8 |
| 2.2 Vergleich der Nachweisgrenzen von C. difficile für PCR und kulturelle Anzucht..... | 11 |
| 2.3 Testung potenzieller PCR-Hemmstoffe..... | 18 |
| 2.4 Oberflächenuntersuchung in Patientenzimmern | 20 |
| 2.5 Retrospektive Untersuchung der im direkten zeitlichen Zusammenhang in den untersuchten Zimmern untergebrachten Patienten | 27 |
| 2.6 Statistik | 27 |
| 3. Ergebnisse | 28 |
| 3.1 Ermittlung der Mindestkonzentration an KBE in einer Lösung zur Gewährleistung einer zuverlässigen kulturellen Anzucht..... | 28 |
| 3.2 Vergleich der Nachweisgrenzen von C. difficile für PCR und kulturelle Anzucht..... | 29 |

| | | |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.3 | Testung potenzieller Hemmstoffe | 31 |
| 3.4 | Oberflächenuntersuchung in Patientenzimmern | 31 |
| 3.4.1 | Probenkollektiv | 31 |
| 3.4.2 | Charakterisierung der C. difficile-infizierten Patienten..... | 31 |
| 3.4.3 | Ergebnisse der Umgebungsuntersuchung | 33 |
| 3.4.4 | Auswertung der Kontaminationshäufigkeit in Abhängigkeit von der Patientenmobilität..... | 38 |
| 3.4.5 | Auswertung der Kontaminationshäufigkeit der Zimmer in Bezug auf die Zeitspanne zwischen Diagnosestellung und Probennahme | 40 |
| 3.4.6 | Kultureller Nachweis einer C. difficile-Kontamination | 40 |
| 3.4.7 | Retrospektive Untersuchung der im direkten zeitlichen Zusammenhang in den untersuchten Zimmern untergebrachten Patienten | 41 |
| 3.4.8 | Einzelfallschilderung..... | 43 |
| 4. | Diskussion | 44 |
| 4.1 | C. difficile – ein vielseitiges Problem im Klinikalltag | 44 |
| 4.2 | Häufige Kontaktflächen bergen ein hohes Risiko für eine Kontamination... .. | 45 |
| 4.3 | Mit zunehmender Patientenmobilität steigt die Kontaminationsgefahr..... | 49 |
| 4.4 | Bestimmte Abteilungen haben eine höhere Grundkontamination | 50 |
| 4.5 | Für den individuellen Patienten besteht ein erhöhtes Risiko für eine Infektion bei unmittelbarem Kontakt zu einem symptomatischen Nachbarpatienten..... | 52 |
| 4.6 | Evaluation der Nachweismethoden | 54 |
| 4.7 | Maßnahmen zur Reduktion der Oberflächenkontamination mit C. difficile.. | 56 |
| 5. | Zusammenfassung | 59 |
| 6. | Literaturverzeichnis | 61 |
| 7. | Danksagung | 70 |
| 8. | Lebenslauf..... | 71 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| % | Prozent |
| ≥ | größer oder gleich |
| °C | Grad Celsius |
| µg | Mikrogramm |
| µl | Mikroliter |
| µm | Mikrometer |
| Abb. | Abbildung |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| BD-MAX | vollautomatisches PCR-Gerät der Firma BD |
| BHI | Brain Heart Infusion Broth |
| bzgl. | bezüglich |
| bzw. | beziehungsweise |
| ca. | circa |
| CDAD | Clostridium-difficile-assozierte Diarrhoe |
| CDI | Clostridium-difficile-Infektion |
| C. difficile | Clostridium difficile |
| CO ₂ | Kohlenstoffdioxid |
| DNA | Deoxyribonucleic Acid |
| EIA | Enzymimmunoassay |
| et al. | et alii |
| Fa. | Firma |
| FRET | Fluoreszenz-/Förster-Resonanz- Energietransfer |
| g | Gramm |
| ggf. | gegebenenfalls |
| IMC | Intermediate Care |
| IND | Ergebnis der Polymerase-Kettenreaktion bei Vorliegen eines Gerätefehlers |
| i.v. | intravenös |
| KBE | koloniebildende Einheit |

| | |
|-------|-----------------------------------------------------------------------------|
| KMT | Knochenmarktransplantation |
| l | Liter |
| ml | Milliliter |
| mm | Millimeter |
| MRSA | Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus |
| NAAT | Nukleinsäure-Amplifikationstest |
| NaCl | Natriumchlorid |
| Nr. | Nummer |
| OD | optische Dichte |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| pH | potentia hydrogenii |
| SCS | Schaedler-Agar |
| u. | und |
| u. a. | unter anderem |
| UNR | Ergebnis der Polymerasekettenreaktion bei Störung in der Probenverarbeitung |
| u. U. | unter Umständen |
| Tab. | Tabelle |
| tcdA | Clostridium difficile Toxin A |
| tcdB | Clostridium difficile Toxin B |
| v. a. | vor allem |
| WC | Water Closet |
| z. B. | zum Beispiel |
| z. T. | zum Teil |

1. Einleitung

1.1 Die Gattung Clostridium

Zur Gattung Clostridium gehören verschiedene grampositive (z. T. auch gramlabile) stäbchenförmige Bakterien. Sie besitzen die Fähigkeit zur Endosporenbildung, woraus eine hohe Widerstandsfähigkeit gegenüber verschiedener Umweltbedingungen resultiert. Die meisten Subspezies sind obligat anaerob, viele zählen zu den Toxinbildnern.

Von den mehr als 200 bekannten Subspezies werden mindestens 30 als humanpathogen angesehen. Hierzu zählen beispielsweise Clostridium tetani (Wundstarrkrampf), Clostridium perfringens (clostridiale Myonekrose, Lebensmittelvergiftung), Clostridium botulinum (Lebensmittelvergiftung, Wund-, Säuglingsbotulismus) und Clostridium difficile (CDAD, Pseudomembranöse Colitis).

1.2 Clostridium difficile

Morphologisch handelt es sich bei dieser Subspezies um ein grampositives Stäbchenbakterium mit endständigen Endosporen und einer Größe von 9-16,9 x 0,5-1,9 µm. Man findet es ubiquitär in der Umwelt und im Darmtrakt von Tieren und Menschen. (al Saif u. Brazier 1996)

Bereits 1935 erfolgte die Erstbeschreibung des Erregers durch Hall und O'Toole, die C. difficile in der physiologischen Darmflora von Neugeborenen entdeckten. Zu diesem Zeitpunkt wurde das Bakterium allerdings noch nicht als pathogen eingestuft. (Hall u. O'Toole 1935) Es dauerte noch bis Ende der siebziger Jahre, bis die C. difficile-Toxine mit dem Auftreten der pseudomembranösen Colitis in Zusammenhang gebracht wurden. (Bartlett et al. 1978) Heute gilt C. difficile als die häufigste Ursache der Antibiotika-assoziierte Diarrhoe. (Bartlett 2002)

1.3 Toxine

Als Hauptvirulenzfaktoren von *C. difficile* werden die Toxine A und B angesehen, die vom TcdA- bzw. TcdB-Gen codiert werden. Diese Gene befinden sich zusammen mit positiven und negativen Regulatoren für ihre Expression in einem 19,6 Kilobasen großen DNA-Abschnitt, dem sogenannten Pathogenitätslokus (PaLoc). (Voth u. Ballard 2005) Die meisten Stämme produzieren beide Toxine, es existieren allerdings auch pathogene Stämme, die lediglich Toxin B bilden. Umgekehrt wurden bisher aber keine natürlich vorkommenden pathogenen Stämme beschrieben, die ausschließlich Toxin A produzieren, obwohl dies theoretisch auch denkbar wäre. (Kuehne et al. 2010) Einige *C. difficile*-Stämme produzieren zusätzlich ein binäres Toxin in Form einer ADP-Ribosyltransferase. (Popoff et al. 1988). Welche Rolle dieses Toxin in der Pathogenese der Erkrankung spielt, ist bisher allerdings nicht vollständig geklärt. (Barbut et al. 2005)

Die Toxine A und B wirken enterotoxisch und proinflammatorisch. Sie greifen die Epithelbarriere der Darmschleimhaut an, indem sie die Tight junctions zerstören. Dadurch können die Toxine diese Barriere überwinden und zur Lamina propria vordringen. Dort können sie u. a. durch ihre Wirkung auf Makrophagen und Monozyten komplexe inflammatorische Prozesse triggern. Außerdem induzieren sie selbst oder synergistisch mit anderen Mediatoren den Apoptoseweg und die Entstehung von Nekrosen. (Feltis et al. 2000; Sun et al. 2010)

1.4 Epidemiologie

Die Zahlen zur Prävalenz asymptomatischer Träger von *C. difficile* bei Krankenhausaufnahme schwanken sehr stark. Eine aktuelle amerikanische Metaanalyse kommt zu dem Ergebnis, dass mehr als 8% der Patienten bei Krankenhausaufnahme bereits asymptomatische Träger eines toxinbildenden *C. difficile* sind. Diese kolonisierten Patienten haben in der Folge ein fast sechsmal höheres Risiko eine Infektion zu entwickeln als nicht kolonisierte Patienten. (Zacharioudakis et al. 2015)

Weltweit steigt die Zahl der CDI an. (Rupnik et al. 2009) Auch für Teile Deutschlands konnte eine generelle Zunahme der *C. difficile*-Infektionen über die letzten Jahre

beobachtet werden. Flächendeckende Zahlen fehlen jedoch, da es hier, mit Ausnahme des Bundeslandes Sachsen, lediglich eine Arztmeldepflicht für schwer verlaufende CDI gibt. Während in den Jahren 2002/2003 noch 1,7-3,8 CDI-Fälle pro 100.000 Einwohner in Sachsen auftraten, stieg die Zahl im Jahr 2006 bereits bis auf 14,8 Fälle pro 100.000 Einwohner an. (Burckhardt et al. 2008) Die Daten, die aus der seit 2007 bestehenden Arztmeldepflicht für schwere Verläufe hervorgehen, lassen außerdem auf eine Zunahme schwerer CDI schließen. (Weiß 2014)

Eine 2011 veröffentlichte Studie aus den USA zeigt, dass *C. difficile* mittlerweile sogar MRSA als häufigsten Erreger krankenhausessoziierter Infektionen abgelöst hat. (Miller et al. 2011) Zu einem ähnlichen Ergebnis kam eine Untersuchung in deutschen Krankenhäusern, in der die ermittelte Inzidenz für CDI doppelt so hoch lag wie die Inzidenz für MRSA. (Meyer et al. 2012) Außerdem gilt *C. difficile* heute als die häufigste Ursache letal verlaufender Gastroenteritiden. (Hall et al. 2012)

1.5 Risikofaktoren

Die Einnahme bestimmter Antibiotikaklassen, v. a. von Fluorchinolonen und Cephalosporinen, ist einer der Hauptrisikofaktoren für die Entwicklung einer CDAD. (Loo et al. 2005; Talpaert et al. 2011) Das Risiko für eine neuauftretende *C. difficile*-Infektion ist unter einer solchen antibiotischen Therapie und im ersten Monat danach um das 7-10fache höher als bei Patienten ohne Antibiotikaeinnahme. Insgesamt besteht in den ersten drei Monaten nach einer Antibiotikatherapie ein erhöhtes Risiko für die Entstehung einer CDI. Außerdem steigt das Risiko mit zunehmender Dauer der Antibiotikaeinnahme sowie durch die Kombination mehrerer Antibiotikaklassen. (Hensgens et al. 2012) Auch ein hohes Patientenalter oder das Vorliegen schwerer Grunderkrankungen gelten als Risikofaktoren für die Entwicklung einer CDI. (Hull u. Beck 2004)

Weitere wichtige Risikofaktoren sind die Einnahme von Protonenpumpeninhibitoren, das Vorliegen eines Immundefektes bzw. einer Immunsuppression oder einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung. (Lübbert et al. 2013; Collini et al. 2012; Ananthkrishnan et al. 2010)

1.6 Clostridium-difficile-assoziierte Erkrankungen

Ein Teil der Patienten wird bei einer Exposition mit *C. difficile* lediglich zu asymptomatischen Trägern, während andere die Symptome einer Clostridium-difficile-assoziierten Diarrhoe (CDAD) entwickeln. Diese reichen von moderater Diarrhoe bis hin zur Entwicklung einer fulminanten pseudomembranösen Colitis oder eines toxischen Megacolons. (Hull u. Beck 2004; Kyne et al. 2000)

Zu den typischen Beschwerden einer symptomatischen *C. difficile*-Infektion gehören wässrige oder schleimige Durchfälle. Zum Teil treten außerdem Symptome wie krampfartigen Bauchschmerzen, Übelkeit und Erbrechen, Fieber oder eine Leukozytose auf. Eine extraintestinale Manifestation ist eher selten. Im Rahmen schwer verlaufender symptomatischer Infektionen können auch systemische Komplikationen wie Elektrolytverschiebungen, eine Dehydratation oder eine Hypalbuminämie auftreten. Bei schwerem Verlauf drohen außerdem Komplikationen wie eine Darmperforation, ein paralytischer Ileus oder ein toxisches Megacolon. Zudem kann es zu einer Sepsis bis hin zum septischen Schock mit Multiorganversagen kommen. (Hull u. Beck 2004)

Die 30-Tage-Mortalität der CDAD wird in verschiedenen Studien mit Werten zwischen 5,7 % und 6,9 % angegeben. Ein Risikofaktor für eine gesteigerte CDAD-assoziierte 30-Tage-Mortalität stellt ein erhöhtes Patientenalter dar. (Loo et al. 2005; Gravel et al. 2009; Kenneally et al. 2007) Weiterhin besteht ein Zusammenhang zwischen dem Ribotyp des Erregers und der Mortalität, welche beispielsweise im Vergleich zu anderen beim Ribotyp O27 erhöht ist. (Inns et al. 2013)

Insgesamt kann eine Zunahme der Mortalität aufgrund der steigenden Virulenz sowie einer steigenden Vulnerabilität der betroffenen Patienten beobachtet werden. (DuPont 2011)

1.7 Diagnostik

Da es, wie bereits erwähnt, auch asymptomatisch kolonisierte Patienten gibt, sollte eine Diagnostik nur bei symptomatischen Patienten aus dem ungeformten Stuhl erfolgen. (Cohen et al. 2010)

Als diagnostischer Goldstandard gilt weiterhin die Anzucht anaerober toxischer

Kulturen. Diese werden auch benötigt, um bei Bedarf eine Ribotypisierung und Resistenztestung des Erregers durchführen zu können. Da bei diesem Nachweisverfahren die ersten Ergebnisse jedoch erst nach einigen Tagen vorliegen, eignet es sich allerdings weniger für die Routinediagnostik.

Hierfür werden Testverfahren mit kürzeren Befundlaufzeiten empfohlen, die im Rahmen eines mehrstufigen Algorithmus eingesetzt werden sollten. Als initialer Suchtest eignet sich der Glutamat-Dehydrogenase-EIA, welcher einen hohen negativen prädiktiven Wert besitzt. Da hiermit aber auch die nicht-toxinbildenden *C. difficile*-Stämme erfasst werden, muss im Anschluss an einen positiven Test eine gezielte Suche nach toxinbildenden Stämmen erfolgen. Hierfür empfiehlt sich ein Nukleinsäure-Amplifikationstest (NAAT) der Toxingene (z.B. PCR). Wahlweise kann zunächst auch ein Toxin-A- und Toxin-B-EIA erfolgen. Aufgrund dessen eingeschränkter Sensitivität sollte sich aber im Falle eines negativen Ergebnisses ein Toxingen-NAAT anschließen. (Lübbert et al. 2014; Surawicz et al. 2013)

Der Nachweis von *C. difficile*-Toxinen im Stuhl eines symptomatischen Patienten kann schließlich den Verdacht einer CDAD bestätigen. Die Toxinkonzentration selbst korreliert aber nicht mit der Schwere der Symptomatik. (Akerlund et al. 2006)

Kommt es im Rahmen einer CDI zum Auftreten einer pseudomembranösen Kolitis, ist diese in vielen Fällen so charakteristisch, dass die CDI auch anhand des makroskopischen Befundes im Rahmen einer Endoskopie (Koloskopie, Sigmoidoskopie) diagnostiziert werden kann, wenn auch die Sensitivität gegenüber den oben genannten Verfahren deutlich niedriger ist. (Cohen et al. 2010)

1.8 Therapie der *C. difficile*-Infektion

Bei leichten Verläufen mit einem klaren Bezug zu einer vorangegangenen bzw. laufenden Antibiotikatherapie kann es ausreichend sein, das auslösende Antibiotikum abzusetzen und den Patienten engmaschig zu überwachen. Ansonsten ist die orale Gabe von Metronidazol die erste Wahl zur Behandlung leichter *C. difficile*-Infektionen. Bei schweren Verläufen ist eine orale Therapie mit Vancomycin anzustreben. Zur Rezidivtherapie werden Vancomycin oder alternativ Fidaxomicin, jeweils oral appliziert, empfohlen. (Debast et al. 2014)

Die Therapie mit Tolevamier, einer toxinbindenden Substanz, war in Studien einer

antibiotischen Therapie mit Vancomycin oder Metronidazol unterlegen. (Johnson et al. 2014)

Kommt es trotz des Einsatzes einer etablierten Rezidivtherapie wiederholt zu Rezidiven, sollte eine Stuhltransplantation zur Wiederherstellung einer protektiven Darmflora in Erwägung gezogen werden. Die durch Auswertung mehrerer Studien ermittelte Erfolgsrate dieses Therapieansatzes liegt bei 89 %. Allerdings existieren bisher kaum Daten zu den möglichen Langzeitfolgen dieses Therapieverfahrens. (Lübbert et al. 2014; Khoruts et al. 2010)

Bei schweren Verläufen mit Komplikationen, wie beispielsweise einer Darmperforation, dem Auftreten eines toxischen Megacolons oder eines Ileus, können zusätzliche chirurgische Maßnahmen (z. B. eine Kolektomie) indiziert sein. (Wang et al. 2013)

1.9 Übertragung

Prinzipiell erfolgt die Übertragung fäkal-oral. Patienten, die mit *C. difficile* infiziert sind, scheiden die Sporen mit dem Stuhl aus und kontaminieren so auch die Oberflächen in ihrer Umgebung bzw. in den Krankenzimmern. Dort können die Sporen für mehrere Wochen überleben. (Sethi et al. 2010) In einer Untersuchung gelang nach gezielter Kontamination von Oberflächen in einigen Fällen noch nach fünf Monaten eine erneute Anzucht vegetativer Bakterien, was die hohe Umweltresistenz der Sporen verdeutlicht. (Kim et al. 1981) Nach oraler Aufnahme passieren die Sporen den Magen aufgrund ihrer Säurestabilität unbeschadet und können dann im Dün- und Dickdarm zu ihrer vegetativen Form heranreifen. (Wilson et al. 1985)

Neben den Sporen können auch die vegetativen Formen verschiedener Stämme einige Stunden unter aeroben Bedingungen auf feuchten Oberflächen überleben. Daher könnten Bereiche wie die Toilette, das Waschbecken oder sogar die Haut infizierter Patienten ein Reservoir für vegetative Formen von *C. difficile* sein. (Jump et al. 2007)

Bei mangelndem oder fehlerhaftem Hygieneverhalten spielen auch die Hände des Krankenhauspersonals eine wichtige Rolle für die Erregerübertragung. (Johnson et al. 1990) Eine unzureichende Einhaltung von Hygienebestimmungen könnte vor allem im Zusammenhang mit einer hohen Arbeitsbelastung des Personals stehen. So konnte gezeigt werden, dass das Risiko einer CDI bei einer Bettenauslastung von über 80 % signifikant ansteigt. Hier fördert außerdem der enge räumliche Kontakt unter den Patienten sowie zwischen den Patienten und dem Personal eine Ausbreitung der CDI. (Ahyow et al. 2013)

Da die Sporen von *C. difficile* sehr umweltresistent sind, müssen zudem auch gereinigte und aufbereitete Gegenstände wie Bettlaken als Infektionsquellen in Betracht gezogen werden. (Hellickson u. Owens 2007) Auch eine aerogene Übertragung und Umgebungskontamination wird diskutiert. (Best et al. 2010)

Als Ursache ambulant erworbener *C. difficile*-Infektionen stehen außerdem der Genuss von kontaminiertem Fleisch sowie der Umgang mit infizierten Haus- und Nutztieren im Verdacht. (Gould u. Limbago 2010)

1.10 Zielsetzung dieser Arbeit

C. difficile stellt ein ubiquitär vorkommendes Problem im klinischen Alltag dar. Die Inzidenz der CDI hängt dabei unter anderem vom Ausmaß der Umgebungskontamination ab. (Fawley et al. 2005) Zu den Zielen dieser Arbeit gehört daher

1. der Vergleich eines PCR-Verfahrens mit einem kulturellen Verfahren zum Nachweis von Oberflächenkontaminationen mit *C. difficile*,
2. die Ermittlung der allgemeinen Oberflächenkontaminationsrate in Zimmern des Uniklinikums Ulm,
3. die Untersuchung von Unterschieden bezüglich der Kontaminationsrate zwischen einzelnen Fachabteilungen,
4. die Analyse, ob eine Korrelation zwischen der Mobilität der Patienten und dem Ausmaß der Kontamination besteht sowie
5. die Untersuchung der Häufigkeit einer neuauftretenden CDI-Symptomatik bei Patienten, die direkten Kontakt zu *C. difficile*-positiven Patienten hatten oder im Anschluss an diese im gleichen Zimmer untergebracht wurden.

2. Material und Methoden

2.1 Ermittlung der Mindestkonzentration an KBE in einer Lösung zur Gewährleistung einer zuverlässigen kulturellen Anzucht

Material

Probenmaterial

Bei dem verwendeten *C. difficile*-Stamm handelte es sich um einen nicht näher definierten Patientenstamm, der in der Mikrobiologie der Uniklinik Ulm im Rahmen der Stuhldiagnostik eines symptomatischen Patienten isoliert wurde. Er wurde auf einem SCS-Agar für 48 Stunden bei 37 °C anaerob bebrütet.

Nährmedium

| SCS-Agar | bioMérieux |
|------------------|------------|
| Zusammensetzung: | in g/l |
| Caseinpepton | 5,7 |
| Sojapepton | 1 |
| Fleischpepton | 5 |
| Hefeextrakt | 5 |
| Glucose | 5,83 |
| NaCl | 1,7 |
| Tris aminomethan | 3 |
| Haemin | 0,01 |
| L-Cystin | 0,4 |
| Vitamin K3 | 0,0005 |
| Agar | 13,5 |
| Schafsblut | 50 ml/l |

Der Agar hat einen pH-Wert von $7,3 \pm 0,2$ und ist von blutroter Farbe.

Laborbedarf

| | |
|---------------------------------|-----------------|
| Platierungsspatel | Sarstedt |
| Impfschlingen 10 µl | Sarstedt |
| Anaerobierbeutel (GENbox anaer) | bioMérieux |
| Anaer indicator | bioMérieux |
| Anaerobiertopf | Merck Chemicals |
| Kochsalzlösung 0,9 % | Fresenius Kabi |
| Pipetten | Eppendorf |
| 10-100 µl | |
| 100-1000 µl | |
| Pipettenspitzen | Sarstedt |
| 100 µl | |
| 1000 µl | |
| Mehrzweckröhrchen 4,5 ml | greiner bio-one |
| Mikroreaktionsgefäße 1,5 ml | Eppendorf |
| Nitrilhandschuhe (Größe M) | Hygonorm |

Geräte

| | |
|--------------------------|-----------------------|
| Vortex Genie 2 | Scientific Industries |
| Brutschrank 36 °C ± 1 °C | Heraeus |
| Photometer | Eppendorf |

Methoden

Einzelsschritte:

1. Herstellung der zu untersuchenden Lösungen
2. Verarbeitung und Anzucht
3. Auswertung

Herstellung der zu untersuchenden Lösungen

Mittels einer Impfschlinge wurden C. difficile-Kolonien von einem SCS-Agar in ein Röhrchen mit 2 ml 0,9 % Kochsalzlösung überführt. Durch Vortexen verteilten sich die Bakterien gleichmäßig in der Lösung. Die Bestimmung der optischen Dichte

erfolgte mithilfe eines Photometers bei einer Wellenlänge von 600 nm. Es wurden so lange *C. difficile*-Kolonien hinzugegeben, bis eine OD von 2,6 erreicht war. Aus dieser Lösung wurde eine Verdünnungsreihe angelegt. Dazu wurden sechs sterile Reaktionsgefäße mit jeweils 0,9 ml NaCl 0,9 % vorbereitet. Aus der oben hergestellten Lösung wurden 100 µl in das erste Reaktionsgefäß pipettiert, um eine Verdünnung von 10^{-1} zu erreichen. Nach dem Vortexen wurden wiederum 100 µl aus diesem in das nächste Reaktionsgefäß überführt. Dieser Vorgang wurde wiederholt, bis Verdünnungen von 10^{-1} bis 10^{-7} vorlagen.

Verarbeitung und Anzucht

Zur Ermittlung der in selbst hergestellten Lösungen ungefähr enthaltenen KBE von *C. difficile* wurden je dreimal 100 µl der Verdünnungen 10^{-3} bis 10^{-7} auf jeweils drei SCS-Agar-Platten ausgespatelt. Die Platten wurden anschließend für 48 Stunden bei 37 °C anaerob bebrütet.

Auswertung

Bei erfolgreicher Anzucht zeigten sich 1-3 mm große graue Kolonien mit durchscheinendem Saum und unregelmäßiger Begrenzung. Als weiteres Erkennungsmerkmal galt der charakteristische Geruch.



Abb. 1: Schaedler-Agar (Firma bioMérieux), Reinkultur von *Clostridium difficile*

Die Auswertung erfolgte durch Auszählung der sichtbaren KBE pro Platte. Aus den Ergebnissen der drei pro Verdünnung vorliegenden Platten wurde der jeweilige Mittelwert bestimmt. Anhand dieses Wertes wurde auf die ungefähre Anzahl der KBE pro 100 µl der jeweiligen Ausgangslösung geschlossen.

2.2 Vergleich der Nachweisgrenzen von C. difficile für PCR und kulturelle Anzucht

Material

Probenmaterial

Da eigene Vorversuche vergleichbare Ergebnisse für eine Versuchsanlage auf Metall- und Kunststoffoberflächen zeigten, wurde der Versuch hier aus Gründen der Kosten und Praktikabilität nur auf Metall angelegt.

Die Proben wurden unter Laborbedingungen von vorher gezielt kontaminierten Metalloberflächen gewonnen. Zur Kontamination wurde der bereits unter Punkt 2.1 erwähnte C. difficile-Patientenstamm genutzt.

Nährmedien

| | |
|------------------------------------|------------|
| • Brain Heart Infusion Broth (BHI) | Oxoid |
| Zusammensetzung: | in g/l |
| Kalbshirninfusion | 12,5 |
| Rinderherzinfusion | 5,0 |
| Pepton | 10,0 |
| Glucose | 2,0 |
| NaCl | 5,0 |
| Dinatriumphosphat | 2,5 |
| Wasser | ad 1000 ml |

Die Bouillon hat einen pH-Wert von 7,6 ±0,2 und ist von klarer gelblicher Farbe.

- Flüssignährmedium (eigene Herstellung)

Zusammensetzung:

| | |
|-----------------------------------|--------------------------|
| 9 ml Brain Heart Infusion Broth | Oxoid |
| 90 µg Sodium Taurocholate hydrate | Sigma-Aldrich |
| 2,25 mg D-Cycloserine | Apli Chem GmbH |
| 80 µg Cefoxitin Sodium | Discovery Fine chemicals |
| 1,09 ml Aqua ad iniectabilia | Fresenius Kabi |

Es wurde eine Lösung aus 10 ml Aqua ad iniectabilia, 22,5 mg D-Cycloserine und 0,8 mg Cefoxitin frisch angesetzt. Von der hergestellten Lösung wurde 1 ml zur BHI gegeben.

1 g Taurocholat wurde in 10 ml Aqua ad iniectabilia gelöst. Hiervon wurden der BHI 90 µl zugesetzt.

- SCS-Agar-Platten

Laborbedarf

| | |
|-----------------------------------------|-----------------|
| BDMAX cdiff Sample Buffer Tube (1,5 ml) | BD |
| Platierungsspatel | Sarstedt |
| Impfeschlingen 10 µl | Sarstedt |
| Anaerobierbeutel (GENbox anaer) | bioMérieux |
| Anaer indicator | bioMérieux |
| Anaerobiertopf | Merck Chemicals |
| Desomed Rapid AF | Desomed |
| Kochsalzlösung 0,9 % | Fresenius Kabi |
| Pipetten | Eppendorf |
| 10-100 µl | |
| 100-1000 µl | |
| Pipettenspitzen | Sarstedt |
| 100 µl | |
| 1000 µl | |
| Mikroreaktionsgefäße 1,5 ml | Eppendorf |

| | |
|------------------------------------------------------------|---------------------------------------|
| Polywipes (Kratzschwämme) 50 cm ² in 0,9 % NaCl | Technical Service Consultants Ltd. |
| Universal-Probenbecher | Sarstedt |
| Mehrzweckröhrchen 15 ml | greiner bio-one |
| Metallboxen, unsteril | |
| Nitrilhandschuhe (Größe M) | Hygonorm |
| Pinzetten und Schere unsteril | |
| schwarzer Filzstift | Edding |

Geräte

| | |
|------------------------------------------------|-----------------------|
| Abzughaube und Spritzschutz (Lamin Air HB244B) | Heraeus |
| Vortex Genie 2 | Scientific Industries |
| BD-MAX | BD |
| Kühlschrank 6-8 °C | Liebherr |
| Kühlschrank 4-8 °C | Alpenino |
| Brutschrank 36 °C ± 1 °C | Heraeus |
| Waage | Sartorius |
| Photometer | Eppendorf |

Methoden

Einzelsschritte

1. Gezielte Oberflächenkontamination
2. Probengewinnung
3. Probenverarbeitung
 - PCR
 - Kulturelle Anzucht
4. Auswertung

Gezielte Oberflächenkontamination

Als Oberflächen dienten die inneren Bodenflächen von Metallboxen. Auf diese wurden mit einem Filzstift Felder der Größe 7 cm x 11 cm eingezeichnet. Anschließend wurden die Flächen wischdesinfiziert.

Nach dem bereits unter Punkt 2.1 beschriebenen Verfahren wurde in der Zwischenzeit eine Verdünnungsreihe bis zu einer Konzentration von 10^{-7} hergestellt. Je 100 µl der Verdünnungen 10^{-1} bis 10^{-7} wurden auf den definierten Feldern ausgespatelt und bei Raumluft trocknen gelassen. Pro Verdünnung wurden insgesamt je fünf Felder angelegt. Die Metallboxen wurden mit verschlossenem Deckel bis zur Probennahme bei Raumtemperatur im Labor gelagert.

Probengewinnung

Nach einer Stunde, nach 24 Stunden, nach 48 Stunden sowie am 4. und 7. Tag nach Versuchsanlage wurden Proben über gründliches Abwischen der entsprechenden Felder mit Krätzschwämmen gewonnen und in sterilen Probenbechern zwischengelagert. Nach jeder Probennahme erfolgte ein Wechsel der Schutzhandschuhe, um eine mögliche Kontamination der nachfolgenden Probe zu verhindern.

Probenverarbeitung

Unmittelbar nach der letzten Probennahme wurden die nahezu rechteckigen Schwämme unter der Flow entlang der langen Seite in sechs gleich breite Streifen geschnitten. Dies erleichterte das Überführen in das Pufferröhrchen bzw. in die Nährlösung. Einer der beiden mittleren Streifen kam in ein BDMAX-Pufferröhrchen, die anderen fünf Streifen in das vorbereitete Flüssignährmedium.

Vorbereitung der PCR

Die Pufferröhrchen wurden bei 4 °C im Kühlschrank über Nacht zwischengelagert, bevor sie am nächsten Tag zusammen mit Proben der klinischen Routinediagnostik im BD-MAX analysiert wurden. Dieses wirtschaftlich günstigere Vorgehen wurde gewählt, da laut Angaben des Herstellers BD bei Lagerung im Kühlschrank eine Probenanalyse ohne Verfälschung des Ergebnisses bis zu fünf Tage nach der Probennahme möglich ist.

Um den Ablauf der PCR nicht zu stören, mussten die Krätzschwämme kurz vor der Analyse wieder unter der Flow aus den Pufferröhrchen entfernt werden. Nach dreiminütigem Vortexen wurden die Schwämme aus den Röhrchen entfernt und mithilfe von zwei Pinzetten mehrfach ausgedrückt. Die dabei austretende

Flüssigkeit wurde wieder in den Probenröhrchen aufgefangen, um möglichst wenig des Probenmaterials zu verlieren. Die Schwämme wurden im Anschluss verworfen. Die anschließende PCR im BD-MAX erfolgte vollautomatisch.

PCR-Ablauf

Probenlyse und DNA-Extraktion

Die zu analysierende Probe wird aus dem Pufferröhrchen in ein Extraktionsröhrchen pipettiert und von diesem wiederum in das Reaktionsröhrchen transferiert. Durch Erhitzung kommt es zur Freisetzung der DNA. Diese bindet an die proprietäre DNA-Affinitätsmatrix, mit der die im Reaktionsröhrchen vorliegenden magnetischen Perlen beschichtet sind. Durch Anheben eines Stabmagneten werden die Perlen immobilisiert, sodass der DNA-freie Überstand aspiriert werden kann. Nach Senken des Stabmagneten wird mithilfe eines Waschpuffers das unspezifisch gebundene Material entfernt und bei erneut angehobenem Stabmagneten abgesaugt. Das Ablösen der DNA von der Affinitätsmatrix erfolgt physikalisch mittels Erhitzen und chemisch durch Zugabe eines Puffers mit dem pH 13. Durch den angehobenen Stabmagneten werden die Magnetperlen nun fixiert, sodass die extrahierte DNA in ein anderes Röhrchen überführt werden kann, wo sie mittels einer Reaktionslösung neutralisiert wird.

PCR-Quantifizierung

Die zu replizierende Original-DNA wird bei ca. 96 °C thermisch in ihre Einzelstränge aufgetrennt. Die Primerhybridisierung am 3'-Ende der Gensequenz erfolgt bei ca. 68 °C, die Elongation mithilfe der Taq-Polymerase bei ca. 72 °C.

Der BD-MAX nutzt zur Analyse die Echtzeit-PCR mit fluoreszenzmarkierten Sonden. Beim sogenannten TaqMan-Assay liegt eine doppelt markierte Oligonukleotidsonde vor. Das 5'-Ende ist mit einem fluoreszierenden Reporter-Farbstoff markiert. Am 3'-Ende befindet sich ein Quencher-Farbstoff mit einem Phosphatrest, der die Nutzung der Sonde als Primer verhindert.

Die Sonde bindet sequenzspezifisch an einen DNA-Einzelstrang. Wenn die intakte Sonde bei einer bestimmten Wellenlänge zur Fluoreszenz angeregt wird, verhindert der sogenannte Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer die Fluoreszenz des

Reporter-Farbstoffs. Ursache ist die strahlungslose Energieübertragung auf den in unmittelbarer Nähe liegenden Quencher. Trifft die Taq-Polymerase nun im Rahmen der Elongationsphase des komplementären DNA-Strangs auf die Sonde, wird diese durch die 5'-3'-Exonucleaseaktivität der Taq-Polymerase hydrolysiert. Die räumliche Nähe der beiden Fluoreszenzfarbstoffe wird somit aufgehoben und die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoff kann erfasst werden. Das Reportersignal steigt daher, in Abhängigkeit von der Anzahl freigesetzter Reportermoleküle, mit jedem PCR-Zyklus an.

Da freie nicht-hybridisierte Sonden nicht hydrolysiert werden, verhalten sich die Fluoreszenzintensität und die Konzentration der Amplifikationsprodukte direkt proportional zueinander. Der BDMAX wertet die Probe als positiv, wenn bei einer Wellenlänge von 475/520 nm der Schwellenwert für die unspezifische Fluoreszenzemission überschritten wird und somit ein eindeutig vom Reporter-Farbstoff ausgehendes Fluoreszenz-Signal detektiert werden kann. Ein positives Ergebnis ist mit dem Nachweis des *tcdB*-Gens gleichzusetzen. Ein negatives Ergebnis bedeutet, dass kein bzw. unzureichend *tcdB*-Gen nachgewiesen werden konnte.

Im Rahmen jeder Probenanalyse findet zusätzlich die sogenannte Sample Processing Control als interne Kontrolle statt. Überprüft werden hiermit der Vorgang der DNA-Extraktion, die PCR-Reaktion, die Funktionalität der verwendeten Reagenzien sowie die Anwesenheit von Inhibitoren. Die hierfür verwendete Sonde ist an ein anderes Fluorophor gekoppelt als die der eigentlichen Analyse.

Kulturelle Anzucht

Das selbst hergestellte Flüssignährmedium enthielt neben der BHI auch Taurocholol zur Förderung der Germination der *C. difficile*-Sporen. Der Antibiotikazusatz diente der selektiven Unterdrückung der Begleitflora, die auf den Oberflächen neben den gesuchten Sporen zu finden ist. Dies erleichterte die spätere Auswertung der Kulturen.

Die Nährlösung inklusive Schwämmchen wurde unter anaeroben Bedingungen im Anaerobiertopf für 72 Stunden bei 37 °C bebrütet. Schließlich wurden 100 µl der

gevoertexten Lösung auf einen SCS-Agar ausgespatelt. Nach erneuter anaerober Bebrütung bei 37 °C über 48 Stunden erfolgt eine Auswertung der Agarplatten bzgl. des Erfolgs bei der Anzucht und der Anzahl der Kolonien.

Auswertung

PCR-Ergebnisse

Folgende Testergebnisse sind bei einer PCR mit dem BD-MAX möglich:

Tab. 1: Übersicht möglicher Testergebnisse der Polymerasekettenreaktion im BD-MAX und ihre Interpretation

| Testergebnis | Auswertung |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| POS | positiv; in der Probe war tcdB-Gen-DNA nachweisbar |
| NEG | negativ; in der Probe war keine tcdB-Gen-DNA nachweisbar |
| UNR | ungelöste Probe; ein Hemmstoff in der Probe hat die korrekte Probenverarbeitung verhindert oder es liegt ein Reagenzienversagen vor |
| IND | nicht bestimmbar; technischer Fehler aufgrund von Versagen des BD MAX-Systems |

BD-MAX = vollautomatisches Gerät zur Durchführung von Polymerasekettenreaktionen der Firma BD; tcdB = Clostridium difficile Toxin B; DNA = Deoxyribonucleic Acid

Eine positive Kurve im BD-MAX wurde als Nachweis für eine ausreichende Kontamination der entsprechenden Oberfläche mit tcdB-produzierendem C. difficile angesehen. Ob es sich hierbei um vegetative oder bereits abgestorbene Bakterien handelte, lässt sich anhand der PCR nicht beurteilen, da diese lediglich den toxinbezogenen Genabschnitt detektiert.

Bei einem negativen Ergebnis lag die Bakterienzahl unterhalb der Nachweisgrenze. Dieses Ergebnis durfte allerdings nur dann als korrekt gewertet werden, wenn die interne Kontrolle gleichzeitig erfolgreich abgelaufen war. Hierfür musste die entsprechende Kontrollkurve einen deutlichen Kurvenanstieg aufweisen.

Kulturelle Anzucht

Bei erfolgreicher Anzucht zeigten sich die bereits beschriebenen 1-3 mm großen grauen Kolonien mit durchscheinendem Saum und unregelmäßiger Begrenzung.

2.3 Testung potenzieller PCR-Hemmstoffe

Für verschiedene Substanzen wurde ein inhibitorischer Effekt auf den korrekten PCR-Ablauf von Seiten des Herstellers beschrieben. Hier sind v. a. verschiedene in der Klinik eingesetzte Antazida zu nennen. Da deren Einsatz bei der Probennahme zuverlässig ausgeschlossen werden konnte und es dennoch regelmäßig zu fehlerhaften Analyseabläufen kam, wurde in diesem Versuchsaufbau der Einfluss verschiedener Desinfektionsmittel auf den PCR-Ablauf untersucht.

Material

Probenmaterial

Die Proben stammten von vorher gezielt desinfizierten Kunststoffoberflächen. Dieses Material wurde gewählt, da das Desinfektionsmittel Descogen Liquid nicht zur Nutzung auf Metalloberflächen geeignet ist. Die vier Desinfektionsmittel Sterilium, Aseptoman, Descogen Liquid und Desderman wurden getestet, da sie allgemein häufig im Uniklinikum Ulm auf den Stationen und auch im Speziellen in der Umgebung von C. difficile-Isolationszimmern eingesetzt werden.

Laborbedarf

| | |
|------------------------------------------------------------|-------------------|
| BDMAX cdiff Sample Buffer Tube (1,5 ml) | BD |
| Platierungsspatel | Sarstedt |
| Descogen Liquid | Antiseptica |
| Desomed Rapid AF | Desomed |
| Aseptoman | Desomed |
| Sterilium | BODE Chemie |
| Pipette 100 µl | Eppendorf |
| Pipettenspitzen 100 µl | Sarstedt |
| Polywipes (Kratzschwämme) 50 cm ² in 0,9 % NaCl | Technical Service |

| | |
|-------------------------------|-----------------------|
| Universal-Probenbecher | Consultants Ltd. |
| Plastiktablets unsteril | Sarstedt |
| Stoppuhr | Fastime |
| Pinzetten und Schere unsteril | |
| schwarzer Filzstift | Edding |
| | |
| <u>Geräte</u> | |
| Vortex Genie 2 | Scientific Industries |
| BD-MAX | BD |

Methoden

Einzelsschritte

1. Gezielte Oberflächenkontamination
2. Probengewinnung
3. Probenverarbeitung
4. Auswertung

Gezielte Oberflächenkontamination

Auf einem Plastiktablett wurden mit einem Filzstift acht Felder der Größe 7 x 10 cm eingezeichnet. Auf vier Feldern wurden jeweils 100 µl eines der vier Desinfektionsmittel Sterilium, Aseptoman, Descogen Liquid und Desderman ausgespatelt. Dann wurde der Versuchsansatz, abgedeckt von einem weiteren Plastiktablett, für 12 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Fünf Minuten vor der Probennahme wurden auf den übrigen vier Feldern ebenfalls je 100 µl eines der vier Desinfektionsmittel aufgetragen.

Probengewinnung

Die Probengewinnung erfolgte durch mehrfaches Abwischen der Oberflächen mit einem Kratzschwamm, welcher anschließend in einem Probenbecher zwischengelagert wurde.

Probenverarbeitung

Jeder Schwamm wurde entlang der langen Seite halbiert. Von einer Hälfte wurde das mittlere Drittel abgeschnitten und in ein Pufferröhrchen gegeben. Dies entsprach der Schwammgröße, die auch in allen anderen Versuchen für die PCR genutzt wurde. Der Rest des Schwammes wurde verworfen. Nach dreiminütigem Vortexen mussten die Kratzschwämme mit zwei Pinzetten wieder aus dem Pufferröhrchen entfernt werden. Hierzu wurden sie mehrfach sorgfältig ausgedrückt, um möglichst wenig der Flüssigkeit mit den Schwämmen zu verwerfen. Anschließend konnten die Proben im BDMAX auf einen reibungslosen Ablauf der PCR-Reaktion hin überprüft werden, da trotz fehlender *C. difficile*-Kontamination die interne Kontrolle des Gerätes problemlos ablaufen sollte.

Der Ablauf der PCR wurde bereits unter Punkt 2.2 beschrieben.

Auswertung

War nach der Analyse eine ansteigende Kurve der geräteinternen Kontrolle vorhanden, hatte dort eine störungsfreie PCR-Reaktion stattgefunden.

2.4 Oberflächenuntersuchung in Patientenzimmern

Material

Probenmaterialien

Die Proben stammten aus den Zimmern isolierter Patienten mit nachgewiesener *C. difficile*-Infektion. Der Infektionsnachweis erfolgte mittels PCR aus Stuhlproben im Rahmen der Routinediagnostik bei symptomatischen Patienten. Ausgeschlossen wurden asymptomatische Patienten, deren *C. difficile*-Kolonisation lediglich als Zufallsbefund erfasst worden war.

Die Probennahme erfolgte von folgenden vorher definierten Oberflächen:

- von der Gesamtoberfläche der Bettklingsel der erkrankten Patienten
- der kompletten Spültaste der Toilette, welche von den symptomatischen Patienten benutzt wurde

alternativ: von den Armlehnen des Toilettenstuhls, wenn dieser stattdessen von den Patienten genutzt wurde

- von der gesamten inneren Türklinke der Tür zwischen Patientenzimmer und Stationsflur

Diese Probenorte wurden als repräsentativ erachtet, da die Spültaste/der Toilettenstuhl sowie die Bettklingel Hinweise auf die vom Patienten ausgehende Erregerverbreitung geben. Die Türklinke spiegelt eher das Hygieneverhalten des Personals und der Besucher wider. Alle gewählten Oberflächen stellen potenzielle Infektionsquellen für nachfolgende Patienten dar.

Bei bettlägerigen Patienten entfiel die Probe des WCs bzw. des Toilettenstuhls, da diese dann nicht genutzt wurden. Auf eine Untersuchung der Bettpfannen wurde verzichtet, da diese meistens sofort in die Spülmaschine gegeben werden und somit eine sichere Zuordnung zu einzelnen Patienten nicht mehr möglich war.

Laborbedarf

| | |
|-----------------------------------------|-----------------|
| BDMAX cdiff Sample Buffer Tube (1,5 ml) | BD |
| Platierungsspatel | Sarstedt |
| Impfeschlingen 10 µl | Sarstedt |
| Anaerobierbeutel (GENbox anaer) | bioMérieux |
| Anaer indicator | bioMérieux |
| Anaerobiertopf | Merck Chemicals |
| Descogen Liquid | Antiseptica |
| Desomed Rapid AF | Desomed |
| Aseptoman | Desomed |
| Pipetten | Eppendorf |
| 10-100 µl | |
| 100-1000 µl | |
| Pipettenspitzen | Sarstedt |
| 100 µl | |
| 1000 µl | |
| Objektträger | VWR |
| Abdeckgläser | Menzel |

| | |
|------------------------------------------------------------|---------------------------------------|
| Polywipes (Kratzschwämme) 50 cm ² in 0,9 % NaCl | Technical Service Consultants Ltd. |
| Universal-Probenbecher | Sarstedt |
| Nitrilhandschuhe (Größe M) | Hygonorm |
| Einwegschutzkittel | Asid Bonz |
| Pinzetten und Schere unsteril | |
| schwarzer Filzstift | Edding |
| Erfassungsbogen/Kugelschreiber | |

Geräte

| | |
|------------------------------------------------|-----------------------|
| Abzughaube und Spritzschutz (Lamin Air HB244B) | Heraeus |
| Vortex Genie 2 | Scientific Industries |
| BD-MAX | BD |
| Mikroskop | Zeiss |
| Kühlschrank 6-8 °C | Liebherr |
| Kühlschrank 4-8 °C | Alpenino |
| Brutschrank 36 °C ± 1 °C | Heraeus |
| Waage | Sartorius |

Methoden

Einzelsschritte

1. Probengewinnung
2. Probenverarbeitung
 - PCR
 - Kulturelle Anzucht
3. Auswertung
4. Datenerfassung

Probengewinnung

Mit je einem Schwämmchen wurden die definierten Oberflächen mehrfach abgewischt. Nach jeder Probennahme erfolgte ein Wechsel der Schutzhandschuhe. Die Zwischenlagerung sowie der Transport ins Labor erfolgten in sterilen

Probenbechern.

Probenverarbeitung

Diese erfolgte unmittelbar nach der letzten Probennahme im Labor nach dem in Punkt 2.2 bereits beschriebenen Vorgehen.

PCR-Analyse

Diese erfolgte nach dem schon in Abschnitt 2.2 beschriebenen Vorgehen.

Kulturelle Anzucht

Parallel zur PCR wurde aus jeder Probe eine wie unter Punkt 2.2 beschriebene Kultur angelegt.

Bei Vorliegen von Kolonien, die in Aussehen und Geruch den Charakteristika von *C. difficile* entsprachen, wurden diese anschließend zur Sicherung des Befundes mikroskopiert. Hier mussten die entsprechenden Stäbchenbakterien mit endständigen Endosporen sichtbar sein.

Aus keiner der Oberflächenproben der ersten 50 untersuchten Zimmer gelang bei negativem PCR-Ergebnis eine kulturelle Anzucht. Aufgrund der bekannten hohen Sensitivität der PCR bei gleichzeitig geringer Sensitivität der Anzucht aus Oberflächenproben wurde daher ab dem 51. Patienten aus Kostengründen auf eine Anzucht verzichtet, wenn ein negatives PCR-Ergebnis vorlag.

Auswertung

PCR:

Eine positive Kurve im BDMAX wurde als Nachweis für eine Kontamination der entsprechenden Oberfläche mit tcdB-produzierendem *C. difficile* angesehen. Wie bereits erwähnt, ließ das Ergebnis keine Rückschlüsse zu, ob es sich um die vegetative oder abgestorbene Form des Erregers handelte.

Bei einem negativen Ergebnis und entsprechender positiver Kontrollkurve wurde die Oberfläche als nicht kontaminiert gewertet. Die Ergebnisse „UNR“ und „IND“ ließen keine Aussage zur Oberflächenkontamination zu.

Kulturelle Anzucht

Ein positives Ergebnis lag vor, wenn eine kulturelle Anzucht von Kolonien mit makro- und mikroskopisch passendem Aussehen und Geruch gelang. Die Anzahl der Kolonien pro Platte wurde nicht separat erfasst.

Datenerfassung

Zur Datenerhebung diente ein standardisierter selbst entworfener Erfassungsbogen, der alle Daten und Merkmale berücksichtigte, die im Rahmen der Umgebungsuntersuchung erfasst werden sollten. Eine diesbezügliche Stellungnahme der Ethikkommission liegt vor (siehe Anhang).

Stammdaten

Hier wurden Name, Alter und Geschlecht des Patienten vermerkt. Außerdem erfolgte die Zuordnung einer fortlaufenden Nummer, mit deren Hilfe die Anonymität der Patienten bei der weiteren Datenverarbeitung und -auswertung gewährleistet werden konnte. Des Weiteren wurden die Station und Zimmernummer des Patienten erfasst.

Zeitliche und kausale Zusammenhänge

Neben dem Aufnahmedatum, dem Diagnosedatum der *C. difficile*-Infektion (Diagnose anhand des positiven PCR-Ergebnisses) wurde hier der Zeitpunkt der Probennahme vermerkt. Außerdem wurde erfasst, zu welchem Zeitpunkt die *C. difficile*-assoziierte Symptomatik erstmals aufgetreten war. Aus diesen Daten ließ sich herleiten, ob es sich um eine nosokomiale oder ambulante Infektion handelte, was ebenfalls im Erfassungsbogen abgefragt wurde. Als entscheidendes Symptom galt der wässrige Durchfall, ggf. in Verbindung mit dem charakteristischen Geruch.

Eine CDI wurde als nosokomial gewertet, wenn die ersten Symptome ab 48 Stunden nach Krankenhausaufnahme bis einschließlich vier Wochen nach der Entlassung auftraten. Als ambulant erworben galten alle Infektionen, deren Symptomatik bereits vor oder innerhalb der ersten 48 Stunden nach Krankenhausaufnahme auftrat und denen kein Krankenhausaufenthalt in den letzten vier Wochen vorausgegangen war.

Eine dritte Kategorie bildeten die Rückfälle. Hierunter wurden die Rezidive und Reinfektionen zusammengefasst, da in der Praxis nicht sicher zwischen diesen beiden Ereignissen unterschieden werden kann. Als Rückfall wurden alle symptomatischen CDI gewertet, die innerhalb von zwei Monaten nach einer früheren Episode auftraten.

Außerdem wurde erfasst, ob innerhalb der letzten zwei Wochen vor Symptombeginn eine Antibiotikaeinnahme stattgefunden hatte, da dies ein bekannter und häufig vorkommender Risikofaktor für die C. difficile-assoziierte Diarrhoe darstellt. Aufgrund der Vielzahl der z. T. auch gleichzeitig bei Patienten eingesetzten Antibiotika sowie der häufig nur ungenauen Angaben von Seiten der Patienten wurde auf eine weitere Klassifizierung in verschiedene Antibiotikagruppen verzichtet. Auch die aktuelle Einnahme von Antibiotika zur Therapie der CDI wurde dokumentiert. Da diese immer leitliniengerecht mit den Antibiotika Metronidazol, Vancomycin oder Fidaxomicin erfolgte, wurde bei der Erfassung auf eine Unterscheidung zwischen den Medikamenten verzichtet.

Schließlich wurde noch die Einnahme der Antazida CaCo₃ (z.B. TUMS) und AL(OH)₃ (z.B. Maalox) ausgeschlossen, da diese vom Hersteller des BDMAX als mögliche Inhibitoren der PCR-Reaktion bei Stuhlproben identifiziert wurden. Es ist daher nicht klar, ob und welchen Einfluss diese Substanzen auch auf die Analyse von Oberflächenproben haben.

Alle hier erfassten Informationen konnten aus der Patientenkurve, durch Befragung des betreuenden medizinischen Personals oder des Patienten ermittelt werden.

Probenbezogene Daten

Hier wurde vermerkt, ob der Patient in einem Einzel- oder Doppelzimmer untergebracht war.

Die Erfassung der Mobilität des Patienten in den Kategorien „bettlägerig“ oder „mobil im Zimmer“ erfolgte, um mögliche Zusammenhänge bezüglich des Ausmaßes der Zimmerkontamination und der Patientenmobilität untersuchen zu können.

Nach erfolgter Verarbeitung und Auswertung der PCR- und Kultur-Ergebnisse wurde im Erfassungsbogen für jeden Probenort dokumentiert, ob ein

Erregernachweis gelungen war. Für die PCR wurde im Falle eines positiven Ergebnisses außerdem festgehalten, in welchen PCR-Zyklus die Fluoreszenz erstmals eindeutig nachweisbar war, d. h. im wievielten Zyklus es zu einem Anstieg der PCR-Kurve kam.

Tab. 2: Übersicht aller in dieser Untersuchung erfasster Parameter

| | |
|----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Patientendaten | <ul style="list-style-type: none"> • Name • zugeteilte Fallnummer • Alter • Geschlecht • Station + Zimmernummer • Patientenmobilität |
| Zeitliche Parameter | <ul style="list-style-type: none"> • Datum der stationären Aufnahme • Zeitpunkt der Symptomentwicklung, Unterscheidung prästationär und stationär • Diagnosezeitpunkt • Datum der Probennahme |
| Anamnestische Daten | <ul style="list-style-type: none"> • Antibiotika-Einnahme in den vorangegangenen zwei Wochen • aktuelle Einnahme von Antibiotika oder Antazida • Einteilung der Infektion in die Kategorie nosokomial, ambulant oder Rückfall |
| Zimmerbezogene Daten | <ul style="list-style-type: none"> • Anzahl der aktuell in diesem Zimmer untergebrachten Patienten • CDI-Status des/der Vorpatienten |
| Probenbezogene Daten | <ul style="list-style-type: none"> • Probenorte • PCR-Ergebnisse und Zyklus, in dem der Kurvenanstieg bei positivem Ergebnis erfolgte • Ergebnisse der kulturellen Anzucht |

CDI = Clostridium-difficile-Infektion, PCR = Polymerase-Kettenreaktion

2.5 Retrospektive Untersuchung der im direkten zeitlichen Zusammenhang in den untersuchten Zimmern untergebrachten Patienten

Mithilfe der klinikinternen elektronischen Patientenverwaltung wurden retrospektiv die Patienten ermittelt, die, neben den diagnostizierten CDI-Patienten, in engem zeitlichem Zusammenhang in den untersuchten Zimmern untergebracht waren. Eine Stellungnahme der zuständigen Ethikkommission hierzu liegt vor (Siehe Anhang).

Eingeschlossen wurden die Patienten, die unmittelbar vor einem Patienten mit nosokomialer Infektion im beprobten Zimmer gelegen hatten, alle Bettnachbarn der positiv auf *C. difficile* getesteten Patienten sowie alle Patienten, die innerhalb der nächsten fünf Tage nach Entlassung oder Verlegung der CDI-Patienten im selben Zimmer untergebracht waren.

Bei diesen Patienten wurde nach mikrobiologischen Befunden gesucht, die eine Kontamination oder Infektion mit *C. difficile* bestätigten oder ausschlossen. Die Erhebung der Daten erfolgte fünf Monate nach Abschluss der Oberflächenuntersuchung. Berücksichtigt wurden alle zu diesem Zeitpunkt für die untersuchten Patienten klinikintern vorliegenden Befunde.

2.6 Statistik

Anhand der erhobenen Daten wurde eine Berechnung von prozentualen Anteilen und Mittelwerten durchgeführt.

Zur Beurteilung der Ergebnisse, die für zwei unterschiedliche Patientengruppen erzielt wurden, erfolgte die Berechnung von p-Werten mittels Chi-Quadrat-Test bzw. Fisher's Exact Test. Als Signifikanzniveau wurde jeweils 0,05 gewählt.

3. Ergebnisse

3.1 Ermittlung der Mindestkonzentration an KBE in einer Lösung zur Gewährleistung einer zuverlässigen kulturellen Anzucht

Aus jeweils 100 µl einer Lösung mit einer OD von 2,6 (Wellenlänge 600 nm) gelang die Anzucht auf SCS-Agarplatten bis zu einer Verdünnung von 10^{-5} zuverlässig. In zwei von drei Fällen war eine Anzucht bei einer Verdünnung von 10^{-6} ebenfalls erfolgreich. Bei einer Verdünnung von 10^{-7} gelang unter Laborbedingungen keine Anzucht mehr.

Tab. 3: Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KBE) pro Schaedler-Agar nach Aufbringen von je 100 µl einer selbst hergestellten Verdünnung (Ausgangslösung: C. difficile-Suspension, OD 2,6; Wellenlänge 600 nm) und 48-stündiger Bebrütung

| Verdünnung | KBE 1. Agar | KBE 2. Agar | KBE 3. Agar | Durchschnitt |
|------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| 10^{-3} | 390 | 415 | 404 | 403 |
| 10^{-4} | 38 | 41 | 42 | 40 |
| 10^{-5} | 4 | 6 | 4 | 5 |
| 10^{-6} | 1 | 2 | 0 | 1 |
| 10^{-7} | 0 | 0 | 0 | 0 |

C. difficile = Clostridium difficile, µl = Mikroliter, OD = optische Dichte, mm = Millimeter

Anhand der ermittelten Werte ist von einer KBE-Konzentration von mindestens 400000 KBE je 100 µl der Ausgangslösung auszugehen. Bei einer Verdünnung von 10^{-3} enthalten 100 µl daher ungefähr 403 KBE des Bakteriums Clostridium difficile. Die Verdünnung 10^{-4} enthält dementsprechend ungefähr noch ein Zehntel (ca. 40 KBE), die Verdünnung 10^{-5} ein Hundertstel (ca. 5 KBE) der Menge an KBE.

Bei einer weiteren Verdünnung gelang lediglich die Anzucht einzelner KBE, jedoch kein zuverlässiger Nachweis mehr.

Somit liegt die Grenze für einen zuverlässigen kulturellen Nachweis unter idealisierten Laborbedingungen bei mindestens 4-5 KBE je 100 µl einer Lösung.

3.2 Vergleich der Nachweisgrenzen von C. difficile für PCR und kulturelle Anzucht

PCR:

5 von 7 Proben der ersten Stunde waren bzgl. der PCR-Ergebnisse nicht beurteilbar. Abgesehen von einem weiteren nicht beurteilbaren Ergebnis am 4. Tag und zwei negativen Ergebnissen konnte eine Kontamination mit C. difficile auch noch bei einer Verdünnung von 10^{-7} nachgewiesen werden, was dem Nachweis einzelner KBE entspricht. Außerdem war prinzipiell für alle getesteten Verdünnungen ein Kontaminationsnachweis bis zum 7. Tag nach erfolgter Kontamination möglich. Da selbst am 7. Tag in der höchsten Verdünnung ein DNA-Nachweis gelang, wurden die beiden negativen Testresultate (10^{-5} nach einer Stunde und 10^{-4} nach 4 Tagen) als falsch negative Ergebnisse gewertet.

Tab. 4: Darstellung der PCR-Ergebnisse für Proben von Metalloberflächen, die zuvor mit verschiedenen selbst hergestellte Verdünnungen (Ausgangslösung: C. difficile-Suspension, OD 2,6; Wellenlänge 600 nm) kontaminiert worden waren, in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Probennahme nach erfolgter Oberflächenkontamination

| Verdünnung | 1 Stunde | 24 Stunden | 48 Stunden | 4. Tag | 7. Tag |
|------------|----------|------------|------------|---------|---------|
| 10^{-1} | UNR | positiv | positiv | positiv | positiv |
| 10^{-2} | positiv | positiv | positiv | positiv | positiv |
| 10^{-3} | UNR | positiv | positiv | UNR | positiv |
| 10^{-4} | UNR | positiv | positiv | negativ | positiv |
| 10^{-5} | negativ | positiv | positiv | positiv | positiv |
| 10^{-6} | UNR | positiv | positiv | positiv | positiv |
| 10^{-7} | UNR | positiv | positiv | positiv | positiv |

PCR = Polymerasekettenreaktion, C. difficile = Clostridium difficile, µl = Mikroliter, OD = optische Dichte, mm = Millimeter, UNR = nicht auswertbar aufgrund von Hemmstoffen in der Probe oder aufgrund von Reagenzienversagen

Kultur:

Innerhalb der ersten 48 Stunden nach erfolgter Kontamination gelang für alle Proben bis zu einer Verdünnung von 10^{-4} (entspricht ca. 40 KBE) der kulturelle Nachweis von *C. difficile*.

Am 4. Tag nach Versuchsanlage gelang dies nur noch bis zu einer Verdünnung von 10^{-3} , was ungefähr 403 KBE pro Testfeld entspricht. Am 7. Tag lag die Nachweisgrenze bereits bei einer Verdünnung von 10^{-2} .

Somit lag die zuverlässige kulturelle Nachweisgrenze in vivo mit 10^{-4} um ein Zehnfaches höher als im Vorversuch unter idealisierten Bedingungen. Bei einer Zunahme der Zeitspanne zwischen Kontamination und Probennahme kam es schließlich zu einer weiteren Abnahme der Sensitivität um den Faktor 10 (nach 4 Tagen) bzw. 100 (nach 7 Tagen).

Tab. 5: Darstellung der Kulturergebnisse für Proben von Metalloberflächen, die zuvor mit verschiedenen selbst hergestellte Verdünnungen (Ausgangslösung: *C. difficile*-Suspension, OD 2,6; Wellenlänge 600 nm) kontaminiert worden waren, in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Probennahme nach erfolgter Oberflächenkontamination

| Verdünnung | 1 Stunde | 24 Stunden | 48 Stunden | 4.Tag | 7. Tag |
|------------|----------|------------|------------|---------|---------|
| 10^{-1} | positiv | positiv | positiv | positiv | positiv |
| 10^{-2} | positiv | positiv | positiv | positiv | positiv |
| 10^{-3} | positiv | negativ | positiv | positiv | negativ |
| 10^{-4} | positiv | positiv | positiv | negativ | negativ |
| 10^{-5} | negativ | negativ | negativ | n. a. | n. a. |
| 10^{-6} | negativ | negativ | negativ | n. a. | n. a. |
| 10^{-7} | negativ | negativ | negativ | n. a. | n. a. |

C. difficile = Clostridium difficile, μl = Mikroliter, OD = optische Dichte, mm = Millimeter, n.a. = nicht angelegt

Vergleicht man die beiden getesteten Methoden direkt miteinander, so erwies sich die PCR als sensitivere Methode, da sie bereits eine Kontamination mit deutlich

geringeren Dosen detektierte. Außerdem blieb im Gegensatz zur Kultur die Sensitivität über den gesamten getesteten Zeitraum von 7 Tagen konstant.

3.3 Testung potenzieller Hemmstoffe

In allen gewonnenen Proben lief die PCR der geräteinternen Kontrolle fehlerfrei ab. Weder die Rückstände der zwölf Stunden zuvor aufgetragenen Desinfektionsmittel noch die frische Kontamination vor der Probennahme hatten einen Einfluss auf den Analyseablauf. Das regelmäßige Auftreten fehlerhafter Analysen kann also nicht durch eine Probenverunreinigung mit den Desinfektionsmitteln Sterilium, Aseptoman, Descogen Liquid oder Desderman erklärt werden.

3.4 Oberflächenuntersuchung in Patientenzimmern

3.4.1 Probenkollektiv

Im Zeitraum zwischen dem 08.01.2014 und dem 18.06.2015 wurden definierte Oberflächen in den Zimmern von 100 Patienten untersucht, die zuvor einen positiven PCR-Nachweis auf *C. difficile* im Stuhl hatten.

3.4.2 Charakterisierung der *C. difficile*-infizierten Patienten

In die Untersuchung wurden insgesamt 54 weibliche und 46 männliche Patienten einbezogen. Das durchschnittliche Patientenalter betrug 65,82 Jahre, wobei die jüngste Patientin 9 Jahre und die älteste Patientin zum Zeitpunkt der Probengewinnung 92 Jahre alt war.

76 Patienten hatten innerhalb der letzten zwei Wochen vor Auftreten der Symptome ein Antibiotikum i.v. oder oral erhalten. 19 Patienten hatten kein Antibiotikum eingenommen und bei 5 Patienten blieb unklar, ob eine Antibiotika-Therapie vorangegangen war.

Zum Untersuchungszeitpunkt wurde die *C. difficile*-Infektion bei 96 Patienten

antibiotisch mit den Standardantibiotika Vancomycin oder Metronidazol behandelt. Eine Patientin erhielt Fidaxomicin, 3 Patienten wurden zum Untersuchungszeitpunkt nicht antibiotisch behandelt. Antazida, die zu den Störsubstanzen des hier eingesetzten PCR-Verfahrens gehören, wurden von keinem der Patienten eingenommen.

Bei der Erstaufnahme im Uniklinikum Ulm bzw. bei der Verlegung aus einer anderen Klinik litten bereits 42 der 100 Patienten an Diarrhoe, bei 57 Patienten trat dieses Symptom erst im Laufe des stationären Aufenthalts auf. Bei einem Patienten war zum Untersuchungszeitpunkt nicht mehr nachvollziehbar, ob bei der Aufnahme bereits eine Symptomatik bestanden hatte.

Tab 6: Zuordnung der Symptomatik von CDI-Patienten bei Aufnahme im Universitätsklinikum Ulm zum Infektionsweg (2014-2015)

| Symptomatik Aufnahmetag | Infektionsweg | | | | Gesamt |
|----------------------------|---------------|------------|-----------|-----------|---------------|
| | Ambulant | Nosokomial | Rezidiv | Unbekannt | |
| keine Diarrhoe | 2 | 48 | 7 | | 57 |
| Diarrhoe | 21 | 11 | 8 | 2 | 42 |
| Unbekannt | | 1 | | | 1 |
| Gesamt | 23 | 60 | 15 | 2 | 100 |

CDI = Clostridium-difficile-Infektion

Bei den 100 diagnostizierten C. difficile-Infektionen handelte es sich in 60 Fällen um eine nosokomiale Infektion. Nur 23 Patienten erfüllten die Kriterien einer ambulant erworbenen Infektion und in 15 Fällen handelte es sich um ein Rezidiv oder eine Reinfektion. Zweimal war der genaue Infektionsweg nicht mehr eruierbar.

3.4.3 Ergebnisse der Umgebungsuntersuchung

68 der untersuchten Zimmer gehörten zu internistischen Abteilungen, 24 Zimmer befanden sich auf chirurgischen Stationen und 8 weitere in anderen Abteilungen.

In 23 der 100 untersuchten Zimmer fiel das PCR-Ergebnis für jeweils eine Probe positiv aus, in 9 Zimmern waren jeweils 2 Proben positiv. In 2 der 66 Zimmer, aus denen 3 Proben gewonnen werden konnten, gelang aus allen Proben ein DNA-Nachweis. Insgesamt konnte also in 34 der 100 untersuchten Zimmer eine Kontamination mit *C. difficile* durch mindestens ein positives PCR-Ergebnis nachgewiesen werden.

Die höchste Nachweisrate, was die Kontamination mindestens einer getesteten Oberfläche angeht, fand sich mit 37 % in den Zimmern internistischer Abteilungen. Hierbei fiel jedoch auf, dass die KMT-Station mit lediglich einem Nachweis aus 6 getesteten Zimmern (17 %) deutlich unter dem Durchschnitt der internistischen Zimmer im Speziellen (37 %), aber auch unter dem allgemeinen Durchschnitt (34 %) lag.

Die höchste Erfolgsquote für die Detektion mindestens einer kontaminierten Oberfläche hatte die Zimmeruntersuchung auf peripheren internistischen Stationen. Auf den hämatonkologischen Stationen konnte sogar in jedem zweiten untersuchten Zimmer eine Kontamination mit *C. difficile* nachgewiesen werden.

Tab. 7: Tabellarische Auflistung der Anzahl der untersuchten und der mit *C. difficile* kontaminierten Zimmer pro Abteilung des Universitätsklinikums Ulm (2014-2015)

| Abteilung | Untersuchte Zimmer | Zimmer mit <i>C. difficile</i> -Nachweis |
|---------------------------|--------------------|------------------------------------------|
| Innere Medizin | 68 | 25 (37 %) |
| Infektionsstation | 16 | 6 (38 %) |
| KMT-Station | 6 | 1 (17 %) |
| Intensivstation | 2 | 0 (0 %) |
| Periphere Stationen | 44 | 18 (41 %) |
| - Gastroenterologie | 16 | 5 (31 %) |
| - Kardio-/Pneumologie | 8 | 3 (38 %) |
| - Hämato-/Onkologie | 15 | 8 (53 %) |
| - andere | 5 | 2 (40 %) |
| Chirurgie | 24 | 7 (29 %) |
| Wachstation | 2 | 0 (0 %) |
| Sonstige Stationen | 22 | 7 (32 %) |
| Andere Abteilungen | 8 | 2 (25 %) |
| Urologie | 1 | 0 (0 %) |
| Gynäkologie | 2 | 1 (50 %) |
| Pädiatrie | 5 | 1 (20 %) |

C. difficile = Clostridium difficile; KMT = Knochenmarktransplantation

Toilette

Insgesamt konnten hier 66 Proben gewonnen werden. In den restlichen 34 Fällen waren die Patienten bettlägerig und nutzten eine Bettpfanne oder trugen eine Windel.

35 der 66 Proben (53 %) wurden von der Spültaste der Toilette gewonnen. In 9 der 35 Proben (26 %) konnte *tcdB*-DNA nachgewiesen werden. 4 Proben (11 %) konnten nicht korrekt analysiert werden (UNR). Die restlichen 22 Proben (63 %)

enthielten keine tcdB-DNA.

Aus 2 der positiven Proben (22 %) gelang im Anschluss eine kulturelle Anzucht. In beiden Fällen waren diese Proben innerhalb des ersten Tages nach Diagnosestellung gewonnen worden.



Abb.2: Anteil der mittels Polymerasekettenreaktion positiv getesteten Proben an allen untersuchten Proben für den Probenort Toilettenspültaste

Die restlichen 31 der 66 Proben (47 %) stammten von den Armlehnen an Toilettenstühlen. Hier konnte in 9 Fällen (29 %) C. difficile-DNA nachgewiesen werden. 2 Proben (6 %) waren nicht beurteilbar und 20 Proben (65 %) brachten ein negatives Ergebnis.

In einem Fall (11 %) konnte aus einer positiven Probe, die am ersten Tag nach Bekanntwerden der Diagnose genommen wurde, im Anschluss eine C. difficile-Kultur angezchtet werden.

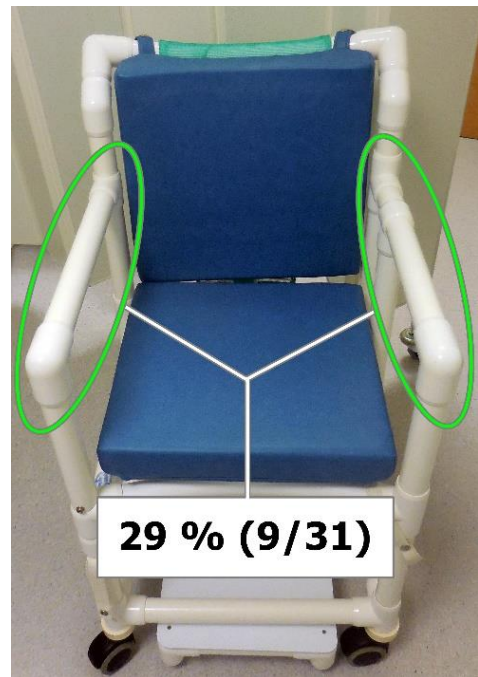


Abb. 3: Anteil der mittels Polymerasekettenreaktion positiv getesteten Proben an allen untersuchten Proben für den Probenort Toilettenstuhl

Insgesamt waren also 27 % (18 von 66) der Proben aus den Nasszellen der Patientenzimmer positiv auf tdcB-DNA. In 64 % der Proben (42 von 66) konnte keine tdcB-DNA nachgewiesen werden. 9 % der Proben (6 von 66) waren nicht beurteilbar.

Patientenklingel

99 Proben von Patientenklingeln konnten untersucht werden. Davon wurden 21 (21 %) positiv auf *C. difficile* getestet. In 7 Fällen (7 %) konnte die PCR-Reaktion nicht korrekt ablaufen (UNR) und einmal kam es zu einem Geräteversagen (1 %). In 70 Proben (71 %) konnte keine Kontamination mit *C. difficile* nachgewiesen werden. An diesem Probenort gelang aus einer PCR-positiven Probe, die einen Tag nach Diagnosestellung gewonnen wurde, eine kulturelle Anzucht.



Abb. 4: Anteil der mittels Polymerasekettenreaktion positiv getesteten Proben an allen untersuchten Proben für den Probenort Patientenklingsel

Türklinken

Hier wurden 8 von 100 Proben positiv auf *C. difficile* getestet. 76 Proben waren negativ, 15 Proben konnten nicht korrekt analysiert werden und in einem Fall kam es zu einem Geräteversagen. Damit lag die Rate nicht beurteilbarer Proben, die durch eine Störung des PCR-Verfahrens zustande kam, für diese Oberfläche mit 16 % deutlich über der Fehlerquote für die anderen getesteten Bereiche (Toilette 9 %, Patientenklingsel 8 %).



Abb. 5: Anteil der mittels Polymerasekettenreaktion positiv getesteten Proben an allen untersuchten Proben für den Probenort Türklinke

Insgesamt konnte *C. difficile*-DNA mittels PCR-Verfahren auf 18 % (47/265) aller untersuchter Oberflächen nachgewiesen werden.

Tab. 8: Übersicht der PCR-Ergebnisse der Oberflächenuntersuchung in Bezug auf die einzelnen Probenorte in den Patientenzimmern des Universitätsklinikums Ulm (2014-2015)

| Probenort | positiv | negativ | nicht beurteilbar | Gesamt |
|---------------|------------------|-------------------|-------------------|------------|
| Toilette | 18 (27 %) | 42 (64 %) | 6 (9 %) | 66 |
| Bettklingel | 21 (21 %) | 70 (71 %) | 8 (8 %) | 99 |
| Türklinke | 8 (8 %) | 76 (76 %) | 16 (16 %) | 100 |
| Gesamt | 47 (18 %) | 188 (71 %) | 30 (11 %) | 265 |

PCR = Polymerasekettenreaktion

3.4.4 Auswertung der Kontaminationshäufigkeit in Abhängigkeit von der Patientenmobilität

Da von den bettlägerigen Patienten keine WC-Proben vorlagen, konnten nur die Ergebnisse für die Proben von Bettklingeln und Türklinken hinsichtlich der Mobilität der Patienten ausgewertet werden. Als mobil wurden alle Patienten eingestuft, die das Bett eigenständig oder mithilfe von Angehörigen oder des Pflegepersonals verlassen konnten.

Bei den mobilen Patienten gelang in 23 % der Fälle ein *C. difficile*-Nachweis auf den Oberflächen der untersuchten Bettklingeln. Bei den bettlägerigen Patienten gelang dies in nur 17 % der Fälle und somit etwas seltener. Der hierzu mittels Chi-Quadrat-Test ermittelte p-Wert lag bei 0,431.

Tab. 9: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der Polymerasekettenreaktion (PCR) für die Proben der Bettklingeln in Bezug auf die Mobilität der in diesen Zimmern untergebrachten Patienten (Universitätsklinikum Ulm, 2014-2015)

| Patientenmobilität | PCR positiv | PCR negativ | nicht beurteilbar |
|----------------------|-------------|-------------|-------------------|
| mobil (n = 69) | 16 (23 %) | 47 (68 %) | 6 (9 %) |
| bettlägerig (n = 30) | 5 (17 %) | 23 (77 %) | 2 (6 %) |

Aus den Proben der Türklinken gelang in der Gruppe der mobilen Patienten in 10 % der Fälle der Nachweis des Toxingens. Bei den immobilen Patienten waren hingegen nur 3 % der Proben positiv. ($p = 0,42$, Fisher's Exact Test)

Tab. 10: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der Polymerasekettenreaktion (PCR) für die Proben der Türklinken in Bezug auf die Mobilität der in diesen Zimmern untergebrachten Patienten (Universitätsklinikum Ulm, 2014-2015)

| Patientenmobilität | PCR positiv | PCR negativ | nicht beurteilbar |
|----------------------|-------------|-------------|-------------------|
| mobil (n = 69) | 7 (10 %) | 51 (74 %) | 11 (16 %) |
| bettlägerig (n = 30) | 1 (3 %) | 25 (81 %) | 5 (16 %) |

Die beiden untersuchten Oberflächen zusammen wiesen somit mit 17 % gegenüber 10 % insgesamt bei mobilen Patienten eine höhere Kontaminationsrate auf als die Oberflächen in den Zimmern bettlägeriger Patienten ($p = 0,271$, Fishers Exact Test).

Tab. 11: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der Polymerasekettenreaktion (PCR) für die Proben aller untersuchter Oberflächen in Bezug auf die Mobilität der in diesen Zimmern untergebrachten Patienten (Universitätsklinikum Ulm, 2014-2015)

| Patientenmobilität | PCR positiv | PCR negativ | nicht beurteilbar |
|--------------------|-------------|-------------|-------------------|
| mobil | 23 (17 %) | 98 (71 %) | 17 (12 %) |
| bettlägerig | 6 (10 %) | 48 (79 %) | 7 (11 %) |

3.4.5 Auswertung der Kontaminationshäufigkeit der Zimmer in Bezug auf die Zeitspanne zwischen Diagnosestellung und Probennahme

In diese Auswertung wurden 96 der untersuchten Zimmer eingeschlossen. 4 Zimmer mit insgesamt 11 Proben konnten hinsichtlich der Fragestellung nicht vollständig zugeordnet werden und wurden daher von der Auswertung ausgeschlossen.

Tab. 12: Darstellung der PCR-Ergebnisse für alle untersuchten Oberflächen in Abhängigkeit von der Länge des Zeitraums zwischen Diagnosestellung und Probennahme (Universitätsklinikum Ulm, 2014-2015)

| | Toilette | | | Klingel | | | Tür | | | Gesamt | Positive Proben [%] |
|----------|--------------|----|-------|---------|----|-------|-----|----|-------|--------|---------------------|
| | PCR-Ergebnis | | | | | | | | | | |
| Zeitraum | + | - | n. b. | + | - | n. b. | + | - | n. b. | | |
| 0 d | 2 | 14 | 0 | 5 | 22 | 2 | 3 | 18 | 8 | 74 | 14 |
| 1 d | 11 | 14 | 3 | 10 | 20 | 5 | 3 | 30 | 3 | 99 | 24 |
| 2 d | 4 | 3 | 3 | 2 | 10 | 1 | 1 | 8 | 4 | 36 | 19 |
| 3 d | 0 | 6 | 0 | 2 | 9 | 0 | 0 | 10 | 0 | 27 | 7 |
| 4 d | 0 | 1 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 4 | 0 | 9 | 0 |
| ≥ 5 d | 0 | 2 | 0 | 1 | 2 | 0 | 0 | 3 | 1 | 9 | 11 |
| gesamt | 17 | 40 | 6 | 20 | 67 | 8 | 7 | 73 | 16 | 254 | 17 |

PCR = Polymerasekettenreaktion; d = Tag; + = positives Ergebnis; - = negatives Ergebnis; n. b. = nicht beurteilbares Ergebnis

209 der insgesamt 254 berücksichtigten Proben (82 %) wurden innerhalb der ersten 48 Stunden nach Diagnosestellung gewonnen. 20 % (41/209) dieser Proben lieferten ein positives PCR-Ergebnis für tcdB-DNA. Die höchste Nachweisrate für *C. difficile* lag mit 24 % positiven Testergebnissen am 1. Tag nach der Diagnosestellung.

Die restlichen 45 Proben (18 %), die in diese Untersuchung gingen, wurden in größerem zeitlichen Abstand zum Diagnosezeitpunkt gewonnen. Hier gelang lediglich noch in 7 % der Fälle (6/45) ein Kontaminationsnachweis.

3.4.6 Kultureller Nachweis einer *C. difficile*-Kontamination

In nur 4 von 47 Fällen (9 %) gelang im Anschluss an einen PCR-Nachweis auch

eine kulturelle Anzucht von *C. difficile* auf einem SCS-Agar. In allen Fällen war es in der vorangegangenen PCR zwischen dem 32. und 34. Zyklus zu einem Kurvenanstieg und somit zu einem als positiv zu wertenden Ergebnis gekommen. Zwei der kulturellen Nachweise gelangen aus Proben zweier WC-Spültasten, einmal stammte die Probe von den Griffen eines Toilettenstuhls und in einem Fall von einer Bettklingel. Alle Proben, aus denen eine Anzucht gelang, waren spätestens einen Tag nach Diagnosestellung gewonnen worden.

Obwohl in insgesamt 27 der 47 positiven Proben ein Anstieg der PCR-Kurve vor dem bzw. spätestens im 34. Zyklus erfolgte, war ein anschließender kultureller Erregernachweis aus den übrigen 23 Proben nicht möglich. Somit erlaubte der PCR-Kurvenverlauf keine Aussage über die Erfolgsaussichten einer kulturellen Anzucht.

3.4.7 Retrospektive Untersuchung der im direkten zeitlichen Zusammenhang in den untersuchten Zimmern untergebrachten Patienten

98 der 100 Zimmer konnten in der Untersuchung berücksichtigt werden. Bei den anderen beiden handelte es sich um Räume der Intensivstationen, bei denen rückwirkend die Belegung nicht mehr eindeutig nachvollziehbar war. Insgesamt wurden in diese Untersuchung 292 Patienten eingeschlossen, die unmittelbar vor, nach oder parallel zu einem symptomatischen *C. difficile*-Patienten in den untersuchten Räumen untergebracht waren.

In insgesamt 43 der 98 untersuchten Zimmer lagen Patienten, die die Kriterien einer nosokomial erworbenen *C. difficile*-Infektion erfüllten und diese nicht im Rahmen einer klinikinternen Verlegung oder einer Verlegung aus einer anderen Klinik mitgebracht hatten. Für 6 der 43 Patienten, die jeweils vorher in den entsprechenden Zimmern gelegen hatten, lag für eine Stuhlprobe ein negatives PCR-Ergebnis auf *C. difficile* vor. Die restlichen 37 Patienten waren nicht getestet worden. Da im Klinikalltag eine Testung üblicherweise nur bei symptomatischen Patienten vorgenommen wird, ist davon auszugehen, dass die überwiegende Mehrheit, wenn nicht sogar alle der übrigen 37 Patienten, keine Anzeichen einer CDI zeigten.

In dieser Untersuchung wurde also in keinem der 43 Fälle einer vorliegenden nosokomialen Infektion ein Hinweis darauf gefunden, dass sich die entsprechenden Patienten an von Vorpatienten kontaminierten Oberflächen neu infiziert hatten.

Es wurden insgesamt 73 Patienten ermittelt, die eine Zeit lang mit einem C. difficile-positiven Patienten in einem Zimmer gelegen hatten. 10 dieser Bettnachbarn wurden negativ auf C. difficile getestet. 5 Bettnachbarn lagen im Rahmen einer Kohortenisolation mit den symptomatischen Patienten in einem Zimmer. Dementsprechend lag hier jeweils ein positiver Toxinnachweis aus dem Stuhl vor. In einem Fall entwickelten eine Patientin und ihre Bettnachbarin jeweils kurz hintereinander eine CDAD mit positivem Toxinnachweis im Stuhl.

Bei den restlichen 57 Bettnachbarn wurde während des gesamten stationären Aufenthaltes keine Stuhldiagnostik durchgeführt.

Für die 98 beurteilbaren Zimmer wurden insgesamt 176 Patienten ermittelt, die im Zeitraum von fünf Tagen nach Entlassung bzw. Verlegung der C. difficile-positiven Patienten in den zuvor untersuchten Zimmern untergebracht wurden. 12 dieser Patienten wurden negativ auf eine Infektion mit C. difficile getestet, bei 161 Patienten wurde diesbezüglich während des gesamten Krankenhausaufenthaltes keine Diagnostik durchgeführt. In den drei übrigen Fällen handelte es sich bei einem Patienten um eine ambulant erworbene Infektion und zweimal um Patienten, die erst nach Entwicklung einer CDAD zum Zwecke der Isolation in diese Zimmer verlegt wurden.

Somit liegt für keinen der untersuchten 176 Patienten ein Hinweis auf eine nosokomiale Neuinfektion mit C. difficile aufgrund zuvor kontaminierter Oberflächen vor.

Tab. 13: PCR-Ergebnisse der Stuhluntersuchung der nachbeobachteten Patienten in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Unterbringung in den untersuchten Zimmern (Universitätsklinikum Ulm, 2014-2015)

| Unterbringung in getestetem Zimmer | nicht getestet | positiv | negativ | Gesamt |
|------------------------------------|----------------|---------|---------|---------------|
| davor | 37 | - | 6 | 43 |
| parallel | 57 | 1 + 5* | 10 | 73 |
| danach | 161 | 3** | 12 | 176 |
| Gesamt | 255 | 9 | 28 | 292 |

PCR = Polymerasekettenreaktion

* = 5x Kohortenisolation nach positivem PCR-Nachweis, 1x möglicherweise Übertragung

** = 1x ambulant erworbene Infektion, 2x Verlegung in Zimmer nach positivem PCR-Nachweis

3.4.8 Einzelfallschilderung

In einem Fall entwickelten zwei Patientinnen, die im gleichen Zimmer einer chirurgischen Station untergebracht waren, beide innerhalb von 24 Stunden Symptome einer CDI.

Patientin Nr. 71 der Untersuchung, die zuerst symptomatisch wurde, lag zum Zeitpunkt der Symptomentwicklung am 28.10.2014 bereits 19 Tage, unterbrochen durch einen postoperativen Tag auf der IMC-Station, in diesem Zimmer. Vier Tage zuvor, dem 24.10.2014, war Patientin Nr. 72 in das gleiche Zimmer verlegt worden. Diese entwickelte einen Tag nach Patientin 71 am 5. gemeinsam in diesem Zimmer verbrachten Tag ebenfalls eine Diarrhoe. Für beide Patientinnen gelang schließlich ein tcdB-DNA-Nachweis aus einer Stuhlprobe.

4. Diskussion

4.1 C. difficile – ein vielseitiges Problem im Klinikalltag

C. difficile-Infektionen stellen im Klinikalltag in vielerlei Hinsicht ein Problem dar. Zunächst ist hier eine relativ hohe 30-Tages-Mortalität von 5,7-6,9 % anzuführen. (Loo et al. 2005; Gravel et al. 2009; Kenneally et al. 2007). Außerdem bleibt der Therapieerfolg unter antibiotische Behandlung häufig aus. In einer großen Übersichtsarbeit wird die Misserfolgsrate für eine Therapie mit Metronidazol mit 22,4 % angegeben, für Vancomycin liegt sie bei 14,2 %. Zusätzlich muss, abhängig von verschiedenen Risikofaktoren wie Alter und Komorbiditäten, in ungefähr einem Viertel aller Fälle im Verlauf mit einem Rückfall gerechnet werden. (Vardakas et al. 2012)

Auch aus wirtschaftlicher Sicht spielt das Auftreten nosokomialer Infektionen eine große Rolle. Eine Studie von Eckmann et al. untersuchte den Zusammenhang zwischen einer im Krankenhaus neu aufgetretenen CDI und der Länge des daraus resultierenden stationären Aufenthaltes bei älteren Patienten mit bestimmten CDI-Risikofaktoren. Diese zeigte für Deutschland, dass Patienten, die im Laufe des Krankenhausaufenthaltes eine Infektion mit C. difficile entwickelten, im Durchschnitt ca. 2,5-mal länger in der Klinik verblieben, was ungefähr 15 zusätzlichen Krankenhaustagen entspricht. (Eckmann et al. 2013)

Da die Kosten einer nosokomialen Infektion generell in engem Zusammenhang mit der Anzahl an dadurch verursachten zusätzlichen Krankenhaustagen stehen, zeigt dies die hohe wirtschaftliche Relevanz dieser Erkrankung. (Graves et al. 2010) Die in Deutschland durchschnittlich zusätzlich anfallenden Kosten für einen CDI-Patienten im Vergleich zu einem nicht erkrankten Patienten wurden in einer Studie von Hübner et al. mit ungefähr 5.260 € angegeben, wobei der größte Kostenanteil mit über 2.550 € auch hier aufgrund der verlängerten Krankenhausverweildauer zustande kam. (Hübner et al. 2015)

Unterschieden werden muss zwischen einer Patientengruppe, die bereits bei Krankenhausaufnahme asymptomatisch mit C. difficile besiedelt ist, und denjenigen Patienten, die sich erst im Laufe des stationären Aufenthaltes neu infizieren.

Während für die erste Gruppe das Bestreben herrscht, das Risiko eines Krankheitsausbruchs zu minimieren, z. B. durch den rationalen Einsatz von Antibiotika, besteht für die zweite Gruppe das Ziel in der Verhinderung von Neuinfektionen durch effektive Präventionsmaßnahmen. (Dancer et al. 2013; Piacenti u. Leuthner 2013) Hierzu zählt beispielsweise die frühzeitige Isolation von bereits symptomatischen Patienten oder der Einsatz geeigneter Desinfektionsmittel. (Vonberg et al. 2008)

Die vorliegende Arbeit untersuchte das Ausmaß an Oberflächenkontaminationen und somit das davon ausgehende Risiko für eine C. difficile-Neuinfektion.

4.2 Häufige Kontaktflächen bergen ein hohes Risiko für eine Kontamination

In dieser Arbeit wurden Oberflächen untersucht, die der klinischen Erfahrung nach im Alltag häufig berührt werden und somit generell ein hohes Risiko zur Übertragung von Krankheitserregern bergen.

Die WC-Spültaste wurde als potenzielle Risikooberfläche gewählt, da sie vom Patienten oft unmittelbar nach einem potenziellen Kontakt mit C. difficile berührt wird, ohne dass vorher eine Reinigung oder Desinfektion der Hände erfolgt. Besonders problematisch sind jene Fälle, in denen die Diagnose einer CDI noch nicht gestellt wurde und die Nasszelle mit einem Bettnachbarn geteilt wird, der bei der WC-Nutzung die Spültaste ebenfalls berühren muss.

Der Probenort „Toilettenstuhl“ wurde als Alternative bei denjenigen Patienten untersucht, die aus verschiedenen Gründen, beispielsweise aufgrund eingeschränkter Mobilität, die Toilette nicht nutzen konnten. Die Armlehnen des Toilettenstuhls lassen keine eindeutige Unterscheidung zwischen einer Kontamination durch den Patienten oder das medizinische Personal zu. Das höchste Risiko für eine Kontamination durch den Patienten selbst besteht wahrscheinlich dann, wenn dieser den Toilettengang selbstständig absolviert, da aufgrund der Entfernung zur Nasszelle keine unmittelbare Möglichkeit zum Händewaschen oder zur Händedesinfektion gegeben ist. Bei Patienten, die auf pflegerische Hilfe angewiesen sind, ist von einer Kontamination der Handschuhe des betreffenden Personals mit C. difficile auszugehen. (Bobulsky et al. 2008) Fassen diese Personen nun an die Armlehnen, z. B. um den Toilettenstuhl zur Seite

zu schieben, erfolgt hierbei ebenfalls eine Übertragung des Erregers auf die Oberfläche.

Da die Bettklingel neben der Ruf- und Alarmfunktion u. a. auch zum An-/Abschalten des Lichtes dient, ist von einer relativ hohen Nutzungshäufigkeit durch den jeweiligen Patienten auszugehen. Obwohl es in Einzelfällen zusätzlich zu einem Anfassen der Patientenklingel durch medizinisches Personal kommt, spiegelt diese untersuchte Oberfläche hauptsächlich das Hygieneverhalten und die Kontaminationsgefahr wider, die von dem entsprechenden Patienten ausgeht. Da die Klingel nicht wie der Rest des Bettes zur Aufbereitung in die Bettenzentrale gebracht wird sondern im Zimmer verbleibt, stellt sie bei unzureichender Reinigung eine unmittelbare Infektionsquelle für nachfolgende Patienten dar.

Die inneren Türklinken der Zimmer der CDI-Patienten spiegeln vor allem das Hygieneverhalten des medizinischen Personals sowie der Besucher wieder. Da die infizierten Patienten nur in Einzelfällen das Zimmer verlassen durften und oft aufgrund eines schlechten Allgemeinzustandes auch nicht dazu in der Lage waren, ist davon auszugehen, dass die betroffenen Patienten nur in sehr wenigen Fällen unmittelbaren Kontakt zu dieser Oberfläche hatten. Vielmehr besteht die Problematik einer hier gefundenen positiven Probe darin, dass dies in den meisten Fällen die letzte Kontaktfläche des Personals oder der Besucher vor Verlassen des Zimmers ist. Wurde hier ein positives Ergebnis erzielt, so bestand die Gefahr, dass die verursachende Person den Erreger auch außerhalb des Zimmers auf weiteren Oberflächen verteilt hat.

Insgesamt fiel für diesen Probenort eine besonders hohe Rate an nicht verwertbaren Proben auf (16 %), sodass möglicherweise die wahre Kontaminationsrate für diese Oberfläche etwas höher ist als die hier ermittelte. Da in den Vorversuchen verschiedene Desinfektionsmittel als Störsubstanzen des PCR-Ablaufs ausgeschlossen werden konnten, muss es weitere bisher nicht bekannte hemmende Substanzen geben. In Anbetracht der Tatsache, dass sich diese Störsubstanzen scheinbar v. a. auf der Türklinke finden lassen, muss beispielsweise an verschiedene Inhaltsstoffe von Cremes oder Lotionen gedacht werden.

Die Probenorte wurden gewählt, da sie allgemein bekannte häufige Kontaktflächen darstellen. Möglicherweise hat aber gerade das dazu geführt, dass diese Oberflächen von Reinigungskräften zum Teil häufiger oder gründlicher gereinigt wurden als andere Bereiche des Zimmers. Es ist daher vorstellbar, dass es weitere in dieser Arbeit nicht untersuchte Oberflächen gibt, die eine höhere Keimlast aufweisen und somit ebenfalls zu den Risikooberflächen zählen.

Da die Probengewinnung nicht in Absprache mit dem Reinigungspersonal erfolgte, ist es außerdem denkbar, dass in Einzelfällen eine Probennahme unmittelbar nach der Reinigung des entsprechenden Zimmers erfolgte. Dies führte möglicherweise zu einer niedrigeren Detektionsrate und damit zu einer Unterschätzung der tatsächlichen Kontamination. Vereinzelt kann es außerdem zu nicht erfassten Verlegungen von Patienten in andere Zimmer gekommen sein. Dadurch ist es möglich, dass einzelne Patienten zum Zeitpunkt der maximalen Symptomatik, in der das größte Kontaminationsrisiko bestand, in einem anderen als dem untersuchten Zimmer gelegen haben und die Nachweisrate dadurch insgesamt etwas niedriger ausfiel.

Bereits in der Vergangenheit wurden Oberflächen als potenzielles Reservoir von *C. difficile* im Rahmen verschiedener Studien untersucht. Zur besseren Einordnung der in dieser Untersuchung erzielten Ergebnisse können zwei aktuelle Studien dienen: Ali et al. verglichen zwei kulturelle Nachweismethoden zur Detektion einer Oberflächenkontamination mit *C. difficile*. (Ali et al. 2015) In einer anderen Studie untersuchten Blakney et al., ebenfalls mit einem kulturellen Nachweisverfahren, das Ausmaß und Verteilungsmuster der Kontamination in Abhängigkeit von der Patientenmobilität. (Blakney et al. 2015)

Tab. 14: Gegenüberstellung der Clostridium-difficile-Nachweisrate verschiedener Studien für unterschiedliche Probenorte

| Oberfläche | positive Proben [%] | positive Proben/Gesamtzahl Proben |
|------------------|---------------------|-----------------------------------|
| WC-Spültasten | | |
| • Ali et al. | 16,7 | 1/6 |
| • Blakney et al. | 3,4 | 1/n. a. |
| • diese Arbeit | 26 | 9/35 |
| Patientenklingel | | |
| • Ali et al. | 81,8 | 9/11 |
| • Blakney et al. | 16,7 | 4/n. a. |
| • diese Arbeit | 21 | 21/99 |
| Türklinke innen | | |
| • Ali et al. | 60,0 | 3/5 |
| • Blakney et al. | 0 | 0/n. a. |
| • diese Arbeit | 8 | 8/100 |

n. a. = nicht angegeben (insgesamt 30 beprobte Zimmer in dieser Arbeit); et al = et alii

Obwohl die Toilettenstühle mit 29 % positiven Probenergebnissen ebenfalls ein ernstzunehmendes Erregerreservoir und daraus resultierend eine potenzielle Infektionsquelle darstellen, konnten für den Vergleich lediglich die Proben der Spültaste herangezogen werden, da die Vergleichsstudien für den Probenort „Toilettenstuhl“ kein entsprechendes Äquivalent beinhalteten.

Die vorliegende Untersuchung konnte mit 26 % positiven tcdB-DNA-Nachweisen von Spültasten in jedem vierten Fall eine C. difficile-Kontamination nachweisen. Damit lag die Detektionsrate hier über der für die beiden oben genannten Studien (16,7 % bzw. 3,4 %).

Auf den Bettklingeln konnte in 21 % der Fälle das Vorhandensein von C. difficile-DNA nachweisen. Zu einem ähnlichen Ergebnis kommen Blakney et al (16,7 %). In der Studie von Ali et al. wurde hingegen eine sehr hohe Kontaminationsrate von 81,8 % angegeben. Da das dort angewendete kulturelle Nachweisverfahren in den

in-vitro-Versuchen eine Stunde nach erfolgter Kontamination eine ähnliche Sensitivität wie das in dieser Arbeit verwendete PCR-Verfahren aufwies und für verschiedene Probenorte bei Ali et al. sehr hohe Nachweisraten vorliegen, könnte das Ergebnis durch insgesamt schlechtere Hygienebedingungen in den dort untersuchten Zimmern zustande gekommen sein.

Die Proben von den inneren Türklinken der Patientenzimmer zeigten in dieser Arbeit in 8 von 100 Fällen ein positives PCR-Ergebnis. In einem Fall konnte *C. difficile* auf der Türklinke eines Zimmers mit bettlägerigem Patienten nachgewiesen werden, was entweder auf eine Erregerverbreitung durch Dritte oder eine bereits länger vorbestehende Kontamination schließen lässt. Vergleichend dazu fanden Blakney et al. hier keine Oberflächenkontamination. Bei Ali et al. wurden 60 % der Türklinken positiv getestet, jedoch war die Anzahl der Proben mit nur 5 getesteten Oberflächen sehr niedrig.

In dieser Arbeit wurden insgesamt 18 % aller Proben (47/265) positiv auf *tcdB*-DNA getestet. Aufgrund der Wahrscheinlichkeit, dass in den 11 % (30/265) nicht verwertbarer Proben weitere potenziell positive Proben enthalten waren, liegt die Kontaminationsrate real vermutlich etwas höher.

Ali et al. konnte im Vergleich dazu auf insgesamt 29 % (87/301) aller untersuchten Oberflächen den Nachweis von *C. difficile* erbringen, bei Blakney et al. gelang dies in 11 % der Fälle (37/322). Eine Einschränkung in der Vergleichbarkeit entsteht allerdings dadurch, dass in beiden Studien wesentlich mehr Oberflächen je Zimmer untersucht wurden. Zusätzlich sind, neben der Anwendung unterschiedlicher Analyseverfahren, viele weitere Faktoren denkbar, die die Ergebnisse der drei ausgeführten Untersuchungen beeinflusst haben und somit zur Erklärung der unterschiedlichen Resultate beitragen könnten. Dazu gehören beispielsweise der Einsatz verschiedener Desinfektionsmittel oder Unterschiede in der Schulung des Reinigungs- und Pflegepersonals.

4.3 Mit zunehmender Patientenmobilität steigt die Kontaminationsgefahr

Bereits die Studie von Blakney et al. untersuchte den Zusammenhang zwischen der Mobilität von CDI-Patienten und der Oberflächenkontamination in den zugehörigen

Isolationszimmern. Diese kam zu dem Schluss, dass das Risiko einer Besiedelung mit *C. difficile* für weiter vom Patientenbett entfernte Oberflächen bei mobilen Patienten höher ist. (Blakney et al. 2015) Da es sich bei den Türklinken definitionsgemäß um eine patientenbettferne Oberfläche handelt, konnte in dieser Arbeit ein ähnliches Ergebnis erzielt werden. Allerdings konnte bei mobilen Patienten ebenfalls eine erhöhte Kontaminationsrate für die Bettklingel festgestellt werden. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass bettlägerige Patienten oftmals demenz oder in einem sehr schlechten Allgemeinzustand sind und daher häufig die Bettklingel gar nicht benutzen. Da sie außerdem vom Pflegepersonal versorgt und gewaschen werden, ist die Wahrscheinlichkeit einer Kontamination ihrer Hände und somit der potenziellen Erregerübertragung auf andere Gegenstände vermutlich geringer.

Insgesamt erfolgten auf Bettklingel und Türklinken zusammen mehr *tcdB*-DNA-Nachweise in den Zimmern mobiler Patienten. Auch wenn die Ergebnisse nicht signifikant waren, lässt sich dennoch eine Tendenz erkennen, sodass von diesen Zimmern möglicherweise ein größeres Infektionsrisiko für nachfolgende Patienten ausgeht als von Zimmern immobiler Patienten.

4.4 Bestimmte Abteilungen haben eine höhere Grundkontamination

Die höchste Nachweisrate für *C. difficile* fand sich in dieser Arbeit mit einem Anteil von 37 % kontaminierten Zimmern in den Fachabteilungen der Inneren Medizin.

Die geringste Erfolgsrate aller internistischer Stationen bezüglich eines Erregernachweises ergab sich für die Zimmer der KMT-Station (17 %). Eine Erklärung könnten die hier herrschenden besonders hohen Hygienestandards sein. Es ist davon auszugehen, dass neben dem medizinischen Personal auch die Patienten aufgrund der vorherrschenden Immunsuppression bezüglich verschiedener Hygienemaßnahmen sensibilisiert sind und so möglicherweise auch von den Patienten eine geringere Kontaminationsgefahr ausgeht.

Obwohl die Infektionsstation ebenfalls mit speziellen Zimmern und geschultem und routiniertem Personal ausgestattet ist, lag hier mit 38 % positiven Proben eine der höchsten Kontaminationsraten vor. Dies kann möglicherweise dadurch erklärt

werden, dass besonders schwer verlaufende und langwierige CDI-Fälle von den peripheren Stationen hierher verlegt werden. Da in den Zimmern der Infektionsstation außerdem insgesamt häufiger Patienten mit CDAD untergebracht werden, ist bei einem Auftreten von Lücken im Dekontaminationsprozess zudem ein gewisser additiver Effekt bezüglich der Sporenlast auf den untersuchten Oberflächen denkbar. (Carling et al. 2010; Hayden et al. 2006)

Dieser Effekt ist möglicherweise auch auf anderen Stationen zu beobachten, da im Laufe der Auswertung auffiel, dass bestimmte Zimmer, vermutlich aus logistischen Gründen, überdurchschnittlich häufig als Isolationszimmer für CDI-Patienten genutzt wurden.

Die Kontaminationsrate der gastroenterologischen Stationen lag mit einer Nachweisquote von 31 % unter dem für alle peripheren internistischen Stationen ermittelten Durchschnitt von 41 %. Dies war zunächst so nicht erwartet worden, da aufgrund des hier vertretenen Krankheitsspektrums auf diesen Stationen relativ häufig Patienten mit Diarrhoen unterschiedlicher Pathogenese untergebracht sind. Daher war zunächst vermutet worden, dass bei dieser Symptomatik aufgrund ihrer Unspezifität zum Teil erst verzögert eine *C. difficile*-Diagnostik sowie entsprechende Isolations- und Hygienemaßnahmen eingeleitet werden würden. Eine Erklärung für die abweichenden Ergebnisse könnte allerdings sein, dass das Personal aufgrund der Häufigkeit des Auftretens von Diarrhoen auf diesen Stationen diesbezüglich besser geschult ist und schneller und adäquater reagiert, z. B. symptomatische Patienten früher testet und isoliert. Außerdem ist denkbar, dass Patienten schneller von ihren Symptomen berichten, da sie diese als Teil ihres Krankheitsbildes betrachten.

Im Gegensatz dazu werden solche Beschwerden von onkologischen Patienten möglicherweise eher als Therapie Nebenwirkung interpretiert, sodass sie erst mit einer gewissen Latenz davon berichten und so erst verzögert eine CDI-Diagnostik durchgeführt wird. Dies könnte dazu beigetragen haben, dass die Rate an *C. difficile*-positiv getesteten Zimmern auf hämatoonkologischen Stationen mit 53 % überdurchschnittlich hoch war.

Unterschiede bezüglich der Kontaminationsraten einzelner Stationen können weiterhin allgemein daraus entstanden sein, dass einzelne Mitarbeiter des

Reinigungspersonals unterschiedlich gut geschult sind und daraus Unterschiede in der Qualität der Zimmerreinigung entstehen.

Die vorliegende Untersuchung lässt keine Aussage über die Gesamtzahl an kontaminierten Zimmern einer einzelnen Abteilung zu, da lediglich die Zimmer positiv getesteter Patienten untersucht wurden und keine Vergleichsdaten über die Grundkontamination in den Zimmern C. difficile-negativer Patienten für das Uniklinikum Ulm vorliegen. Allerdings scheinen Unterschiede in der Kontaminationsrate der Isolationszimmer verschiedener Fachrichtungen zu bestehen. Dies würde bedeuten, dass für nachfolgende Patienten je nach Station ein unterschiedlich hohes Grundrisiko einer Neuinfektion durch besiedelte Oberflächen besteht.

4.5 Für den individuellen Patienten besteht ein erhöhtes Risiko für eine Infektion bei unmittelbarem Kontakt zu einem symptomatischen Nachbarpatienten

Die meisten positiven Ergebnisse wurden innerhalb der ersten zwei Tage nach Diagnosestellung erzielt, wobei die höchste Nachweisrate mit 24 % bei denjenigen Proben vorlag, die ungefähr einen Tag nach Diagnosestellung gewonnen wurden. Es ist davon auszugehen, dass mit Bekanntwerden der CDI bestimmte Vorkehrungen getroffen wurden. Dazu zählt im Uniklinikum Ulm unter anderem die Initiierung einer Kittel-Handschuh-Pflege, was bei korrekter Durchführung zu einem Rückgang an täglichen Neukontaminationen führen sollte. Inzwischen erfolgt zudem die standardmäßige Unterbringung der betroffenen Patienten in Einzelzimmern mit eigener Nasszelle. Außerdem findet die Umstellung auf ein geeignetes sporozides Desinfektionsmittel statt, was eine deutliche Verminderung der Keimlast auf den gereinigten Oberflächen zur Folge hat. (Vohra u. Poxton 2011) Da mit Bekanntwerden der Diagnose in der Regel außerdem eine antibiotische Therapie eingeleitet wird, kommt es bei Wirkeintritt dieser Maßnahme über die Zeit zu einem Rückgang der CDI-Symptomatik und somit in gewissem Umfang auch zu einer Abnahme der Kontaminationsgefahr, die vom Patienten ausgeht. (Best et al. 2010)

Bei einer Probennahme ungefähr einen Tag nach Diagnosestellung litt noch ein Großteil der Patienten an Diarrhoe. Außerdem bestand durch Abwarten eines Tages vor Probennahme ein größeres Risiko, dass es zu einer Oberflächenkontamination gekommen war, selbst wenn der Patient nach Diagnosestellung zu Isolationszwecken noch einmal in ein anderes Zimmer verlegt worden war.

Es ist zudem davon auszugehen, dass die Probennahme in einigen Fällen wohl noch zeitlich vor der ersten Reinigung mit sporoziden Reinigungsmitteln lag. All diese Faktoren könnten erklären, warum die Nachweisrate am ersten Tag nach Diagnosestellung am höchsten war und mit zunehmender Umsetzung der Hygienemaßnahmen sowie einem Rückgang der CDI-Symptomatik in den Folgetagen geringer wurde.

Der in dieser Arbeit durchgeführte in-vitro-Versuch zur Ermittlung der Nachweisgrenzen für die kulturelle Anzucht zeigte, dass bei zunehmendem Abstand zwischen gezielter Kontamination und Probennahme immer größere Bakterienkonzentrationen notwendig waren, damit eine Anzucht gelang. Daraus lässt sich ableiten, dass es über die Zeit wohl zu einer Abnahme überlebensfähiger Bakterien kommt. In vivo würde dies bedeuten, dass das Infektionsrisiko für Patienten, die nach Entlassung oder Verlegung eines CDI-Patienten im gleichen Zimmer untergebracht werden, auch bei lückenhaften Hygienemaßnahmen über die Zeit geringer wird. Dazu passt außerdem die Beobachtung, dass in dieser Untersuchung alle Proben, aus denen eine kulturelle Anzucht gelang, innerhalb des ersten Tages nach Diagnosestellung gewonnen wurden.

Eine Studie von Walker et al. zeigte ebenfalls, dass in den meisten Fällen, in denen es vermeintlich zur Übertragung von *C. difficile* von einem auf einen anderen Patienten gekommen war, diese innerhalb der ersten Woche nach Auftreten der Symptomatik stattgefunden hatte. (Walker et al. 2012)

Die These, dass das Infektionsrisiko über die Zeit abnimmt, sowie die Durchführung einer adäquaten Schlusdesinfektion könnten erklären, warum diese Arbeit unter 176 untersuchten keinen einzigen Patienten ermitteln konnte, der nach der Unterbringung in einem vormals mit einem CDI-Patienten belegten Zimmer ebenfalls eine CDAD entwickelte. Einschränkend sei hier jedoch erwähnt, dass die

meisten Patienten aufgrund fehlender Symptomatik nicht explizit auf *C. difficile* untersucht wurden und somit eine asymptomatische Neukolonisation nicht ausgeschlossen werden kann.

Bei insgesamt 68 potenziellen Fällen konnte in dieser Arbeit nur einer ermittelt werden, in dem eine Übertragung von *C. difficile* von einer Patientin auf die Bettnachbarin erfolgt sein könnte. Die Tatsache, dass beide innerhalb von 24 Stunden eine CDAD entwickelten, nachdem sie für vier Tage im gleichen Zimmer gelegen hatten, lässt eine Infektion mit dem gleichen Erregerstamm vermuten, auch wenn hier keine Ribotypisierung zur genaueren Identifizierung durchgeführt wurde. Somit ist das Risiko einer Neuinfektion aufgrund der räumlichen Nähe zu einem CDI-Patienten zwar generell gegeben, es scheint aber in der Mehrzahl aller CDI-Fälle auf einem anderen Weg zu einer Infektion zu kommen.

Zu einem ähnlichen Ergebnis kam eine britische Studie, in der in lediglich 13 % der untersuchten Fälle die Zuordnung zwischen zwei CDI-Patienten gelang, die zur selben Zeit auf der gleichen Station untergebracht waren und mit dem gleichen genetischen Subtyp infiziert waren. Weiterhin wurde in dieser Studie in 19 % der Fälle ein Zusammenhang zwischen zwei Patienten mit gleichem Subtypen über einen zeitgleichen Aufenthalt im gleichen Krankenhaus hergestellt. (Eyre et al. 2013) Die hier vorliegende Arbeit beschränkte sich dagegen auf die Nachbeobachtung von Patienten, die als Bettnachbarn entweder direkten Kontakt zu CDI-Patienten hatten oder unmittelbar im Anschluss im selben Zimmer untergebracht waren. Wäre weiterhin eine Nachuntersuchung aller auf der Station unterbrachten Patienten erfolgt, wären möglicherweise weitere Fälle potenzieller Neuinfektionen aufgedeckt worden.

4.6 Evaluation der Nachweismethoden

Kultur:

Im Gegensatz zur PCR bietet die kulturelle Anzucht die Möglichkeit zum Nachweis vitaler Bakterien. Außerdem ermöglicht sie eine Resistenztestung und Erregertypisierung.

Dennoch erwies sich die Kultur in der hier durchgeführten Untersuchung nicht als

geeignete Routine-Nachweismethode, da sie insgesamt eine zu geringe Sensitivität aufwies, die zudem bereits im Laufe weniger Tage weiter abnahm. Einschränkend muss jedoch erwähnt werden, dass in anderen Studien deutlich höhere Erfolgsquoten für die kulturelle Anzucht erzielt werden konnten, sodass davon auszugehen ist, dass über eine Modifikation des hier angewandten Vorgehens prinzipiell noch eine Steigerung der Sensitivität möglich wäre. (Ali et al. 2015; Blakney et al. 2015)

Um die Erfolgsaussichten einer Anzucht zu erhöhen, erfolgte in dieser Arbeit zur Erregeranreicherung eine Zwischenbebrütung in einer Nährlösung für 48 Stunden. Damit handelte es sich um eine technisch und zeitlich recht aufwendige Methode, die so im Klinikalltag kaum praktikabel ist. Zudem muss bedacht werden, dass der kulturelle Nachweis keine Unterscheidung zwischen apathogenen und toxinbildenden Stämmen zulässt und somit im Zweifelsfall eine weitere Diagnostik, beispielsweise in Form von Toxin-EIA oder PCR, angeschlossen werden muss.

PCR:

Die PCR als diagnostische Methode zum Nachweis einer Oberflächenkontamination erwies sich ebenfalls als ungeeignet für den Routinebetrieb. Zum einen spielen die hohen Kosten dieses Verfahrens eine Rolle, zum anderen handelte es sich bei der Probenverarbeitung um ein aufwendiges und zeitintensives Verfahren, das so für größere Fallzahlen nicht praktikabel ist. Ein weiteres Problem stellte die mit 11 % relativ hohe Quote nicht beurteilbarer Proben dar. Neben zwei Fällen von Geräteversagen kam es in 28 Fällen zu durch unbekannte Hemmstoffe oder Reagenzienversagen ausgelösten Analysefehlern.

Da mittels PCR lediglich die *C. difficile*-DNA nachgewiesen wird, ermöglicht sie keine Aussage über die Vitalität der nachgewiesenen Bakterien und somit keine Aussage über die Gefahr, die im Einzelfall von der kontaminierten Oberfläche für den Patienten ausgeht. Zudem handelt es sich bei der eingesetzten PCR nicht um ein quantitatives Verfahren, sodass keine Aussage über die auf der untersuchten Oberfläche vorhandene absolute Bakterienzahl getroffen werden kann. Es gelang außerdem nicht, aus dem Zeitpunkt des Anstiegs der PCR-Kurve eine zuverlässige Prognose über den Erfolg einer kulturellen Anzucht zu treffen.

Die Stärken des Verfahrens lagen in dieser Untersuchung jedoch in der

Schnelligkeit (Ergebnis innerhalb weniger Stunden), der in vitro nachgewiesenen hohen Sensitivität, die eine Detektion einzelner KBE ermöglichte, sowie in der Konstanz dieser Sensitivität über den gesamten Versuchszeitraum von 7 Tagen. Somit eignet sich das Verfahren gut zur Identifikation von potenziellen Risikoflächen in Patientenzimmern sowie zur Aufdeckung von Hygienelücken im System.

4.7 Maßnahmen zur Reduktion der Oberflächenkontamination mit C. difficile

Es konnte gezeigt werden, dass der Einsatz verschiedener Antibiotika in direktem Zusammenhang mit einem Ausbruch von C. difficile-Infektionen steht. Daher spielt bei bereits asymptomatisch kolonisierten Patienten der rationale Einsatz von Antibiotika, z.B. im Rahmen eines Antibiotic Stewardships, eine große Rolle, um das Auftreten einer CDAD zu verhindern. (Dancer et al. 2013; Piacenti u. Leuthner 2013) Dadurch kann außerdem das Risiko einer Oberflächenkontamination gesenkt werden, da das Auftreten einer Haut- und Umgebungskontamination bei C. difficile-positiven asymptomatischen Patienten in direktem Zusammenhang mit einer vorangegangenen Antibiotikaeinnahme in den letzten 90 Tagen zu stehen scheint. Während in der hier zitierten Studie für nicht antibiotisch vorbehandelte, aber kolonisierte Patienten keine Umgebungskontamination nachgewiesen werden konnte, war die Kontaminationsrate nach einer Antibiotikatherapie bei asymptomatisch kolonisierten Patienten fast genauso hoch wie in der Vergleichsgruppe der Patienten mit einer symptomatischen CDI. (Kundrapu et al. 2015)

Kommt es bei einem Patienten zum Auftreten einer CDAD, ist neben der raschen Durchführung diagnostischer Maßnahmen die umgehende Isolierung der betroffenen Patienten ein entscheidender Faktor, um das Risiko von Neuinfektionen zu senken. (Walker et al. 2012) Die Initiierung von Barrieremaßnahmen sollte bereits bei dem Verdacht auf eine CDI erfolgen, um eine unkontrollierte Verbreitung der Sporen frühzeitig zu unterbinden. (Vonberg et al. 2008; Dubberke et al. 2014) Im Kontakt mit CDI-Patienten wird weiterhin generell der Einsatz von Schutzhandschuhen empfohlen, da von den Betroffenen ein hohes Risiko für eine Händekontamination von der ebenfalls kontaminierten Haut ausgeht. (Vonberg et al. 2008; Bobulsky et al. 2008) Unabhängig vom Einsatz der Schutzhandschuhe

sollte im Anschluss an den Kontakt mit *C. difficile*-positiven Patienten eine Reinigung der Hände erfolgen. In einer Vielzahl von Studien konnte die Wichtigkeit einer adäquaten Händehygiene zur allgemeinen Verringerung der Transmissions- und Infektionsraten in Gesundheitseinrichtungen gezeigt werden. (Pittet et al. 2006) Verschiedene Untersuchungen konnten jedoch zeigen, dass sich die routinemäßig eingesetzten alkoholbasierten Händedesinfektionsmittel nicht zur Eliminierung von *C. difficile*-Sporen von der Haut eignen. Hingegen wurden gute Ergebnisse für das mechanische Entfernen der Sporen durch Händewaschen mit Wasser und Seife erzielt, sodass diese Maßnahme bei Kontakt zu CDI-Patienten, neben einer Händedesinfektion, elementarer Bestandteil der Händehygiene sein sollte. (Oughton et al. 2009; Jabbar et al. 2010) Auch die betroffenen Patienten sollten bezüglich Hygienemaßnahmen sensibilisiert und geschult werden, da die Daten der vorliegenden Untersuchung Hinweise darauf liefern, dass mobile Patienten ebenfalls an der Erregerverbreitung auf Oberflächen beteiligt sind.

In dieser Arbeit waren ungefähr ein Fünftel aller untersuchten Oberflächen mit *C. difficile* kontaminiert. Das führte dazu, dass in insgesamt jedem dritten beprobten Patientenzimmer ein Erregernachweis gelang, was das potenzielle Risiko einer Neuinfektion für andere Patienten birgt. Dieses Ergebnis zeigt die Wichtigkeit einer adäquaten Zimmerreinigung, da ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Prävalenz einer Oberflächenkontamination und der Inzidenz von CDIs besteht. (Fawley et al. 2005)

Verschiedene Untersuchungen konnten in der Vergangenheit jedoch deutliche Defizite in der Reinigung und Desinfektion von Patientenzimmern nachweisen. Zwei Studien, die die Gründlichkeit von Reinigungsmaßnahmen auf Intensivstationen untersuchten, konnten zeigen, dass im Schnitt nur etwas weniger als die Hälfte aller relevanten Oberflächen gereinigt wurden. Maßnahmen wie Personalschulungen führten in beiden Studien zu einer deutlichen Verbesserung der Dekontaminationsmaßnahmen mit einer postinterventionellen Quote von über 80 % gereinigten Oberflächen. (Carling et al. 2010; Hayden et al. 2006) Carling et al. konnten außerdem zeigen, dass das Reinigungspersonal scheinbar präinterventionell solche Oberflächen am häufigsten reinigte, auf denen eine optisch sichtbare Verschmutzung am ehesten auffallen würde. Hierzu zählte beispielsweise der Toilettensitz oder das Waschbecken. Die Türklinken hingegen,

von denen allgemein ein erhöhtes Risiko zum Erwerb einer Infektion ausgeht, wurden präinterventionell nur in 25 % der Fälle bei einer Schlussdesinfektion mit einbezogen. (Carling et al. 2010)

Neben einer allgemeinen Verbesserung der Gründlichkeit der Reinigungsmaßnahmen, z. B. durch Schulungen, sollte also weiterhin eine Sensibilisierung des Personals für spezielle Risikoflächen erfolgen. Inhalt einer zukünftigen Untersuchung könnte daher die PCR-Testung einer deutlich größeren Probenanzahl je untersuchtem Zimmer sein, um für das Uniklinikum Ulm ein umfassendes Bild über Bereiche mit hohen Kontaminationsraten zu erhalten. Die daraus resultierenden Daten könnten zur Optimierung des Dekontaminationsprozesses beitragen, indem beispielsweise ein Fokus der Hygienemaßnahmen auf besonders häufig kontaminierte Oberflächen gelegt wird. Zudem wären Nachuntersuchungen nach Durchführung der Schlussdesinfektion denkbar. Dadurch wäre ein direktes Feedback über den Erfolg und eventuelle Defizite der Reinigungsmaßnahmen an das entsprechende Personal möglich.

Da in der Vergangenheit bereits gezeigt werden konnte, dass bis zu dreiviertel der C. difficile-Neuinfektionen nicht durch einen Stationskontakt zu einem symptomatischen Patienten erklärt werden können, liegt ein weiteres Ziel zukünftiger Untersuchungen in einem besseren Verständnis alternativer Transmissionswege, um weitere Präventionsmaßnahmen initiieren zu können. (Walker et al. 2012)

5. Zusammenfassung

Infektionen mit *Clostridium difficile* stellen unter anderem aufgrund einer hohen Mortalität und einer hohen Anzahl an Rezidiven ein großes Problem im klinischen Alltag dar. Weltweit kann außerdem eine Zunahme der Infektionen beobachtet werden. Da die Inzidenz unter anderem vom Ausmaß der Umgebungskontamination abhängt, untersuchte die vorliegende Arbeit die Oberflächenkontamination in Patientenzimmern an den drei repräsentativen Probenorten WC-Spültaste bzw. Toilettenstuhlgriffe, Patientenklingsel und Türklinke. Des Weiteren wurde der Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Oberflächenkontamination und der Patientenmobilität sowie mögliche Unterschiede zwischen einzelnen klinikinternen Fachabteilungen untersucht. Zusätzlich erfolgte zur Erfassung möglicher kontaminationsbedingter Neuinfektionen eine retrospektive Untersuchung aller Patienten, die in engem zeitlichem Zusammenhang mit infizierten Patienten in den untersuchten Zimmern untergebracht waren.

Nachdem zunächst in vitro die Nachweisgrenzen der in dieser Arbeit eingesetzten Polymerasekettenreaktion (PCR) und der kulturellen Anzucht ermittelt worden waren, erfolgte der Erregernachweis in vivo parallel mit beiden erwähnten Verfahren. Ein weiteres Ziel war daher der Vergleich der beiden eingesetzten Nachweismethoden. Der Vorteil der Kultur war der Nachweis vitaler Erreger mit der Möglichkeit zur anschließenden Erregertypisierung und Resistenztestung. Die Sensitivität des Verfahrens war jedoch niedrig. Zudem lagen die Ergebnisse erst nach vier Tagen vor und ließen keine Unterscheidung zwischen apathogenen und toxinbildenden Stämmen zu. Im Gegensatz dazu zeigten sich die Vorteile der hier eingesetzten PCR in der hohen Sensitivität sowie der kurzen Zeitspanne von wenigen Stunden bis zum Vorliegen der Ergebnisse. Nachteile ergaben sich aber aus den hohen Kosten des Verfahrens sowie einem mit 11 % relativ hohen Anteil nicht verwertbarer Probenergebnisse. Da beide in dieser Arbeit angewandte Verfahren technisch und zeitlich recht aufwendig waren, erwiesen sie sich als ungeeignet für den Routineeinsatz im Klinikalltag.

In einem Zeitraum von ungefähr eineinhalb Jahren wurden die Zimmer von 100 Patienten mit *Clostridium-difficile*-Infektion untersucht. Für den Probenort WC wurde mit insgesamt 27 % positiven Proben die höchste Nachweisrate erzielt, für

die Bettklingeln lag sie bei 21 % und für die Türklinken bei 8 %. Insgesamt gelang in jedem dritten Zimmer (34 %) der Erregernachweis auf mindestens einer Oberfläche, wobei Unterschiede in der Grundkontamination zwischen den Fachabteilungen und auch innerhalb der Abteilungen für verschiedene Stationen auffielen. Während beispielsweise in 37 % (25/68) der Zimmer internistischer Stationen ein Nachweis von *Clostridium difficile* erfolgte, gelang dies nur in 29 % (7/24) der Zimmer chirurgischer Stationen. Beim Vergleich mobiler mit bettlägerigen Patienten fiel außerdem auf, dass das Kontaminationsrisiko mit zunehmender Patientenmobilität tendenziell zu steigen scheint.

Die retrospektive Untersuchung der Patienten, die in unmittelbarem zeitlichem Zusammenhang in den untersuchten Zimmern untergebracht waren, ergab für keinen der 176 Patienten, die im Anschluss an einen symptomatischen Patienten in diesen Zimmern untergebracht waren, einen Hinweis auf eine *Clostridium-difficile*-Neuinfektion. Bei den 73 zeitgleich mit den betroffenen Patienten in den untersuchten Zimmern untergebrachten Patienten trat nur ein Fall auf, in dem eine direkte oder indirekte Übertragung des Erregers vom symptomatischen Patienten auf den Nachbarpatienten als wahrscheinlich angesehen werden kann.

Zu den essentiellen Maßnahmen zur Reduktion der Umgebungskontamination und somit des Auftretens von Neuinfektionen mit *Clostridium difficile* gehört neben der umgehenden Isolation der betroffenen Patienten die Initiierung einer Kittel-Handschuh-Pflege. Die Händehygiene sollte zudem zwingend eine mechanische Reinigung mit Wasser und Seife beinhalten, da nur auf diesem Weg eine Entfernung der Sporen erzielt werden kann. Des Weiteren tragen Schulungen der betroffenen Patienten sowie des Krankenhauspersonals zur Reduktion der Erregerverbreitung bei. Ziel künftiger Arbeiten könnte die Untersuchung einer größeren Probenzahl je untersuchtem Zimmer sein, um weitere Risikooberflächen zu identifizieren. Die Ergebnisse von Nachuntersuchungen nach erfolgter Schlussdesinfektion könnten außerdem Lücken im Dekontaminationsprozess aufdecken und direkt an das entsprechende Reinigungspersonal rückgemeldet werden.

Da in vergangenen Studien gezeigt werden konnte, dass ein Großteil der Neuinfektionen nicht durch einen Stationskontakt mit symptomatischen Patienten erklärt werden kann, sollte ein weiteres Ziel künftiger Arbeiten außerdem in einem besseren Verständnis der Transmissionswege von *Clostridium difficile* liegen.

6. Literaturverzeichnis

1. Ahyow L C, Lambert P C, Jenkins D R, Neal K R, Tobin M: Bed occupancy rates and hospital-acquired Clostridium difficile infection: a cohort study. Infection control and hospital epidemiology, 34: 1062-1069 (2013)
2. Akerlund T, Svenungsson B, Lagergren A, Burman L G: Correlation of disease severity with fecal toxin levels in patients with Clostridium difficile-associated diarrhea and distribution of PCR ribotypes and toxin yields in vitro of corresponding isolates. Journal of clinical microbiology, 44: 353-358 (2006)
3. al Saif N, Brazier J S: The distribution of Clostridium difficile in the environment of South Wales. Journal of medical microbiology, 45: 133-137 (1996)
4. Ali S, Muzslay M, Wilson P: A Novel Quantitative Sampling Technique for Detection and Monitoring of Clostridium difficile Contamination in the Clinical Environment. Journal of clinical microbiology, 53: 2570-2574 (2015)
5. Ananthakrishnan A N, Issa M, Binion D G: Clostridium Difficile and Inflammatory Bowel Disease. Medical Clinics of North America, 94: 135-153 (2010)
6. Barbut F, Decre D, Lalande V, Burghoffer B, Noussair L, Gigandon A, Espinasse F, Raskine L, Robert J, Mangeol A, Branger C, Petit J C: Clinical features of Clostridium difficile-associated diarrhoea due to binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase)-producing strains. Journal of medical microbiology, 54: 181-185 (2005)
7. Bartlett J G, Chang T W, Gurwith M, Gorbach S L, Onderdonk A B: Antibiotic-Associated Pseudomembranous Colitis Due to Toxin-Producing Clostridia. N Engl J Med, 298: 531-534 (1978)
8. Bartlett J G: Antibiotic-Associated Diarrhea. N Engl J Med, 346: 334-339 (2002)
9. Best E L, Fawley W N, Parnell P, Wilcox M H: The potential for airborne dispersal of Clostridium difficile from symptomatic patients. Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America, 50: 1450-1457 (2010)

10. Blakney R, Gudnadottir U, Warrack S, O'Horo J C, Anderson M, Sethi A, Schmitz M, Wang J, Duster M, Ide E, Safdar N: The relationship between patient functional status and environmental contamination by *Clostridium difficile*: a pilot study. *Infection*, 43: 483-487 (2015)
11. Bobulsky G S, Al-Nassir W N, Riggs M M, Sethi A K, Donskey C J: *Clostridium difficile* skin contamination in patients with *C. difficile*-associated disease. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 46: 447-450 (2008)
12. Burckhardt F, Friedrich A, Beier D, Eckmanns T: *Clostridium difficile* Surveillance Trends, Saxony, Germany. *Emerging Infectious Diseases*, 14: 691-692 (2008)
13. Carling P C, Parry M F, Bruno-Murtha L A, Dick B: Improving environmental hygiene in 27 intensive care units to decrease multidrug-resistant bacterial transmission. *Critical Care Medicine*, 38: 1054-1059 (2010)
14. Cohen S, Gerding D, Johnson S, Kelly C, Loo V, McDonald L, Pepin J, Wilcox M: Clinical Practice Guidelines for *Clostridium difficile* Infection in Adults: 2010 Update by the Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA) and the Infectious Diseases Society of America (IDSA). *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 31: 431-455 (2010)
15. Collini P J, Bauer M, Kuijper E, Dockrell D H: *Clostridium difficile* infection in HIV-seropositive individuals and transplant recipients. *The Journal of infection*, 64: 131-147 (2012)
16. Dancer S J, Kirkpatrick P, Corcoran D S, Christison F, Farmer D, Robertson C: Approaching zero: temporal effects of a restrictive antibiotic policy on hospital-acquired *Clostridium difficile*, extended-spectrum β -lactamase-producing coliforms and meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *International journal of antimicrobial agents*, 41: 137-142 (2013)
17. Debast S B, Bauer M P, Kuijper E J: European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: Update of the Treatment Guidance Document for *Clostridium difficile* Infection. *Clinical Microbiology and Infection*, 20, Supplement 2:

1-26 (2014)

18. Dubberke E R, Carling P, Carrico R, Donskey C J, Loo V G, McDonald L C, Maragakis L L, Sandora T J, Weber D J, Yokoe D S, Gerding D N: Strategies to Prevent Clostridium difficile Infections in Acute Care Hospitals: 2014 Update. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 35: 628-645 (2014)

19. DuPont H L: The Search for Effective Treatment of Clostridium difficile Infection. *N Engl J Med*, 364: 473-475 (2011)

20. Eckmann C, Wasserman M, Latif F, Roberts G, Beriot-Mathiot A: Increased hospital length of stay attributable to Clostridium difficile infection in patients with four co-morbidities: an analysis of hospital episode statistics in four European countries. *The European journal of health economics: HEPAC: health economics in prevention and care*, 14: 835-846 (2013)

21. Eyre D W, Cule M L, Wilson D J, Griffiths D, Vaughan A, O'Connor L, Ip C L C, Golubchik T, Batty E M, Finney J M, Wyllie D H, Didelot X, Piazza P, Bowden R, Dingle K E, Harding R M, Crook D W, Wilcox M H, Peto T E A, Walker A S: Diverse Sources of C. difficile Infection Identified on Whole-Genome Sequencing. *N Engl J Med*, 369: 1195-1205 (2013)

22. Fawley W N, Parnell P, Verity P, Freeman J, Wilcox M H: Molecular epidemiology of endemic Clostridium difficile infection and the significance of subtypes of the United Kingdom epidemic strain (PCR ribotype 1). *Journal of clinical microbiology*, 43: 2685-2696 (2005)

23. Feltis B A, Wiesner S M, Kim A S, Erlandsen S L, Lyerly D L, Wilkins T D, Wells C L: Clostridium difficile toxins A and B can alter epithelial permeability and promote bacterial paracellular migration through HT-29 enterocytes. *Shock (Augusta, Ga.)*, 14: 629-634 (2000)

24. Gould L H, Limbago B: Clostridium difficile in food and domestic animals: a new foodborne pathogen? *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 51: 577-582 (2010)

25. Gravel D, Miller M, Simor A, Taylor G, Gardam M, McGeer A, Hutchinson J,

Moore D, Kelly S, Boyd D, Mulvey M, Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program: Health care-associated *Clostridium difficile* infection in adults admitted to acute care hospitals in Canada: a Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program Study. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 48: 568-576 (2009)

26. Graves N, Harbarth S, Beyersmann J, Barnett A, Halton K, Cooper B: Estimating the cost of health care-associated infections: mind your p's and q's. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 50: 1017-1021 (2010)

27. Hall A J, Curns A T, McDonald L C, Parashar U D, Lopman B A: The roles of *Clostridium difficile* and norovirus among gastroenteritis-associated deaths in the United States, 1999-2007. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 55: 216-223 (2012)

28. Hall I C, O'Toole E: Intestinal flora in new-born infants: With a description of a new pathogenic anaerobe, *bacillus difficilis*. *American Journal of Diseases of Children*, 49: 390-402 (1935)

29. Hayden M K, Bonten M J, Blom D W, Lyle E A, van de Vijver D A, Weinstein R A: Reduction in acquisition of vancomycin-resistant enterococcus after enforcement of routine environmental cleaning measures. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 42: 1552-1560 (2006)

30. Hellickson L A, Owens K L: Cross-Contamination of *Clostridium difficile* Spores on Bed Linen During Laundering. *American Journal of Infection Control*, 35: E32-E33 (2007)

31. Hensgens M P, Goorhuis A, Dekkers O M, Kuijper E J: Time interval of increased risk for *Clostridium difficile* infection after exposure to antibiotics. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 67: 742-748 (2012)

32. Hübner C, Hübner N O, Muhr M, Claus F, Leesch H, Kramer A, Flessa S: Cost analysis of hospitalized *Clostridium difficile*-associated diarrhea (CDAD). *GMS hygiene and infection control*, 10: Doc13 (2015)

33. Hull M W, Beck P L: Clostridium difficile-associated colitis. Canadian family physician Medecin de famille canadien, 50: 1536-40, 1543-5 (2004)
34. Inns T, Gorton R, Berrington A, Sails A, Lamagni T, Collins J, Perry J, Hill K, Magee J, Gould K: Effect of ribotype on all-cause mortality following Clostridium difficile infection. The Journal of hospital infection, 84: 235-241 (2013)
35. Jabbar U, Leischner J, Kasper D, Gerber R, Sambol S P, Parada J P, Johnson S, Gerding D N: Effectiveness of alcohol-based hand rubs for removal of Clostridium difficile spores from hands. Infection control and hospital epidemiology, 31: 565-570 (2010)
36. Johnson S, Gerding D N, Olson M M, Weiler M D, Hughes R A, Clabots C R, Peterson L R: Prospective, controlled study of vinyl glove use to interrupt Clostridium difficile nosocomial transmission. The American Journal of Medicine, 88: 137-140 (1990)
37. Johnson S, Louie T J, Gerding D N, Cornely O A, Chasan-Taber S, Fitts D, Gelone S P, Broom C, Davidson D M, for the Polymer Alternative for CDI Treatment (PACT) investigators: Vancomycin, Metronidazole, or Tolevamer for Clostridium difficile Infection: Results From Two Multinational, Randomized, Controlled Trials. Clinical Infectious Diseases, 59: 345-354 (2014)
38. Jump R L, Pultz M J, Donskey C J: Vegetative Clostridium difficile survives in room air on moist surfaces and in gastric contents with reduced acidity: a potential mechanism to explain the association between proton pump inhibitors and C. difficile-associated diarrhea? Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 51: 2883-2887 (2007)
39. Kenneally C, Rosini J M, Skrupky L P, Doherty J A, Hollands J M, Martinez E, McKinzie W E, Murphy T, Smith J R, Micek S T, Kollef M H: Analysis of 30-day mortality for clostridium difficile-associated disease in the ICU setting. Chest, 132: 418-424 (2007)
40. Khoruts A, Dicksved J, Jansson J K, Sadowsky M J: Changes in the composition of the human fecal microbiome after bacteriotherapy for recurrent Clostridium difficile-associated diarrhea. Journal of clinical gastroenterology, 44: 354-360 (2010)

41. Kim K H, Fekety R, Batts D H, Brown D, Cudmore M, Silva J, Jr, Waters D: Isolation of *Clostridium difficile* from the environment and contacts of patients with antibiotic-associated colitis. *The Journal of infectious diseases*, 143: 42-50 (1981)
42. Kuehne S A, Cartman S T, Heap J T, Kelly M L, Cockayne A, Minton N P: The role of toxin A and toxin B in *Clostridium difficile* infection. *Nature*, 467: 711-713 (2010)
43. Kundrapu S, Sunkesula V, Tomas M, Donskey C J: Skin and Environmental Contamination in Patients Diagnosed With *Clostridium difficile* Infection but Not Meeting Clinical Criteria for Testing. *Infection control and hospital epidemiology*, 36: 1348-1350 (2015)
44. Kyne L, Warny M, Qamar A, Kelly C P: Asymptomatic Carriage of *Clostridium difficile* and Serum Levels of IgG Antibody against Toxin A. *N Engl J Med*, 342: 390-397 (2000)
45. 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: A predominantly clonal multi-institutional outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea with high morbidity and mortality. *The New England journal of medicine*, 353: 2442-2449 (2005)
46. Lübbert C, Johann C, Kekule A S, Worlitzsch D, Weis S, Mossner J, Behl S, Seufferlein T: Immunosuppressive treatment as a risk factor for the occurrence of *clostridium difficile* infection (CDI). *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 51: 1251-1258 (2013)
47. Lübbert C, John E, Müller L v: *Clostridium-difficile*-Infektion: Leitliniengerechte Diagnostik- und Behandlungsoptionen. *Dtsch Arztebl International*, 723-731 (2014)
48. Meyer E, Gastmeier P, Weizel-Kage D, Schwab F: Associations between nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and nosocomial *Clostridium difficile*-associated diarrhoea in 89 German hospitals. *The Journal of hospital infection*, 82: 181-186 (2012)
49. Miller B A, MD, Chen, Luke F, MD, MPH, Daniel J. Sexton, MD, Deverick J.

- Anderson ,,MD, MPH: Comparison of the Burdens of Hospital-Onset, Healthcare Facility–Associated Clostridium difficile Infection and of Healthcare-Associated Infection due to Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus in Community Hospitals. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 32: 387-390 (2011)
50. Oughton M T, Loo V G, Dendukuri N, Fenn S, Libman M D: Hand hygiene with soap and water is superior to alcohol rub and antiseptic wipes for removal of Clostridium difficile. *Infection control and hospital epidemiology*, 30: 939-944 (2009)
51. Piacenti F J, Leuthner K D: Antimicrobial stewardship and Clostridium difficile-associated diarrhea. *Journal of pharmacy practice*, 26: 506-513 (2013)
52. Pittet D, Allegranzi B, Sax H, Dharan S, Pessoa-Silva C L, Donaldson L, Boyce J M, WHO Global Patient Safety Challenge, World Alliance for Patient Safety: Evidence-based model for hand transmission during patient care and the role of improved practices. *The Lancet. Infectious diseases*, 6: 641-652 (2006)
53. Popoff M R, Rubin E J, Gill D M, Boquet P: Actin-specific ADP-ribosyltransferase produced by a Clostridium difficile strain. *Infection and immunity*, 56: 2299-2306 (1988)
54. Rupnik M, Wilcox M H, Gerding D N: Clostridium difficile infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. *Infection control and hospital epidemiology*, 7: 526-536 (2009)
55. Sethi A K, Al-Nassir W N, Nerandzic M M, Bobulsky G S, Donskey C J: Persistence of skin contamination and environmental shedding of Clostridium difficile during and after treatment of C. difficile infection. *Infection control and hospital epidemiology*, 31: 21-27 (2010)
56. Sun X, Savidge T, Feng H: The enterotoxicity of Clostridium difficile toxins. *Toxins*, 2: 1848-1880 (2010)
57. Surawicz C M, Brandt L J, Binion D G, Ananthakrishnan A N, Curry S R, Gilligan P H, McFarland L V, Mellow M, Zuckerbraun B S: Guidelines for diagnosis, treatment, and prevention of Clostridium difficile infections. *The American Journal of Gastroenterology*, 108: 478-98; quiz 499 (2013)

58. Talpaert M J, Gopal Rao G, Cooper B S, Wade P: Impact of guidelines and enhanced antibiotic stewardship on reducing broad-spectrum antibiotic usage and its effect on incidence of *Clostridium difficile* infection. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 66: 2168-2174 (2011)
59. Vardakas K Z, Polyzos K A, Patouni K, Rafailidis P I, Samonis G, Falagas M E: Treatment failure and recurrence of *Clostridium difficile* infection following treatment with vancomycin or metronidazole: a systematic review of the evidence. *International journal of antimicrobial agents*, 40: 1-8 (2012)
60. Vohra P, Poxton I R: Efficacy of decontaminants and disinfectants against *Clostridium difficile*. *Journal of medical microbiology*, 60: 1218-1224 (2011)
61. Vonberg R P, Kuijper E J, Wilcox M H, Barbut F, Tull P, Gastmeier P, European C difficile-Infection Control Group, European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), van den Broek P J, Colville A, Coignard B, Daha T, Debast S, Duerden B I, van den Hof S, van der Kooi T, Maarleveld H J, Nagy E, Notermans D W, O'Driscoll J, Patel B, Stone S, Wiuff C: Infection control measures to limit the spread of *Clostridium difficile*. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 14 Suppl 5: 2-20 (2008)
62. Voth D E, Ballard J D: *Clostridium difficile* Toxins: Mechanism of Action and Role in Disease. *Clinical microbiology reviews*, 18: 247-263 (2005)
63. Walker A S, Eyre D W, Wyllie D H, Dingle K E, Harding R M, O'Connor L, Griffiths D, Vaughan A, Finney J, Wilcox M H, Crook D W, Peto T E: Characterisation of *Clostridium difficile* hospital ward-based transmission using extensive epidemiological data and molecular typing. *PLoS medicine*, 9: e1001172 (2012)
64. Wang M F, Ding Z, Zhao J, Jiang C Q, Liu Z S, Qian Q: Current role of surgery for the treatment of fulminant *Clostridium difficile* colitis. *Chinese medical journal*, 126: 949-956 (2013)
65. Weiß B: Schwer verlaufende *Clostridium-difficile*-Infektionen: IfSG-Surveillancedaten von 2013. 27: 234-237 (2014)

66. Wilson K H, Sheagren J N, Freter R: Population dynamics of ingested *Clostridium difficile* in the gastrointestinal tract of the Syrian hamster. *The Journal of infectious diseases*, 151: 355-361 (1985)

67. Zacharioudakis I M, Zervou F N, Pliakos E E, Ziakas P D, Mylonakis E: Colonization with toxinogenic *C. difficile* upon hospital admission, and risk of infection: a systematic review and meta-analysis. *The American Journal of Gastroenterology*, 110: 381-90; quiz 391 (2015)

7. Danksagung

Ganz besonders möchte ich mich bei **Frau Prof. Dr. Heike von Baum** für die hervorragende Betreuung dieser Arbeit bedanken: Für das anhaltende Interesse an meiner Arbeit, das stets offene Ohr für Fragen aller Art und die zahlreichen wertvollen Anregungen. Dank ihrer warmherzigen und humorvollen Art entstand zudem eine sehr angenehme Arbeitsatmosphäre, in der ich mich stets wohl gefühlt habe.

Des Weiteren möchte ich mich bei **Frau Christiane Vieweg** bedanken, die mir im Labor jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand und außerdem dafür sorgte, dass ich stets optimale Arbeitsbedingungen vorgefunden habe.

Ich danke auch dem restlichen **Team der Sektion Klinikhygiene**, das mir bei kleineren und größeren Anliegen immer behilflich war und in dem ich mich dank der freundlichen Atmosphäre zu jeder Zeit gut aufgehoben fühlte.

Mein Dank gilt außerdem dem **MTA-Team** des Routinelabors der Medizinischen Mikrobiologie für die Durchführung der PCR meiner Proben.

Meiner Schwester **Katharina Etscheid** danke ich für die technische Hilfe bei der schriftlichen Ausarbeitung.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern **Gertrud** und **Gregor Etscheid** danken, die mir nach der Ausbildung zur Physiotherapeutin auch noch das Medizinstudium ermöglicht haben. Sie haben mich immer ermutigt und unterstützt und waren mir schließlich beim Korrekturlesen dieser Arbeit eine sehr große Hilfe.

8. Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

