

# **UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene  
Arbeitsbereich Krankenhaushygiene

Direktor: Prof. Dr. med. Martin Aepfelbacher

## **Erhöhung der Patientensicherheit durch Reduktion der mikrobiologischen Oberflächenbelastung mittels automatisiertem UV-C Desinfektionsverfahren**

### **Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. biol. hum.  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Birte Knobling  
aus Uelzen

Hamburg 2023

**Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 26.06.2024**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:** Prof. Dr. Johannes Knobloch

**Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in:** Prof. Dr. Julian Schulze zur Wiesch

**Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in:** PD Dr. Philipp Warnke

# Inhaltsverzeichnis

1	Synopse.....	4
1.1	Einleitung.....	4
1.1.1	Relevanz von kontaminierten Oberflächen in der Patientenumgebung.....	4
1.1.2	Automatische Raumdekontaminationsverfahren – UV-C Desinfektion .....	5
1.1.3	Repräsentativität von Wirksamkeitsprüfungen unter Laborbedingungen .....	7
1.1.4	Feldstudien zur Beurteilung der Wirksamkeit von Desinfektionsverfahren.....	8
1.2	Fragestellung und Zielsetzung.....	9
1.3	Methodik.....	10
1.3.1	Laborexperimente zur Untersuchung der UV-C Toleranz klinischer Isolate .....	10
1.3.2	Feldstudie zur Beurteilung der UV-C Desinfektionswirksamkeit in der Praxis.....	11
1.4	Ergebnisse.....	12
1.4.1	Unterschiede in der UV-C Toleranz von <i>E. faecium</i> und <i>S. aureus</i> Isolaten .....	12
1.4.2	Feldstudie zur Prüfung der Wirksamkeit von UV-C und manueller Desinfektion ..	15
1.5	Diskussion .....	18
1.5.1	Relevanz klinischer Isolate in der Wirksamkeitsprüfung von UV-C Desinfektion.	18
1.5.2	Wirksamkeit von UV-C und manueller Desinfektion in der Praxis.....	22
2	Abkürzungsverzeichnis .....	29
3	Literaturverzeichnis.....	30
4	Publikationen .....	36
5	Zusammenfassung .....	65
6	Summary .....	66
7	Erklärung des Eigenanteils an den Publikationen .....	67
8	Danksagung .....	68
9	Lebenslauf .....	69
10	Eidesstattliche Versicherung.....	71

# 1 Synopse

## 1.1 Einleitung

### 1.1.1 Relevanz von kontaminierten Oberflächen in der Patientenumgebung

Nosokomiale Infektionen stellen mit einer Prävalenz von 6,5 % (2016-2017) je Patiententag in der Akutversorgung ein relevantes Problem der öffentlichen Gesundheit in Europa dar [1]. In Deutschland wurden *Escherichia coli* (16,4 %), *Enterococcus spp.* (13,6 %), *Staphylococcus aureus* (13,3 %) und *Clostridioides difficile* (12,7 %) als die Mikroorganismen identifiziert, welche am häufigsten krankenhausessoziierte Infektionen verursachen [1]. Insbesondere die drei letztgenannten Erreger sind für eine hohe Tenazität und eine Persistenz von mehreren Tagen bis Wochen auf verschiedenen unbelebten Oberflächen bekannt [2]. Diese Fähigkeit führt zu einem regelmäßigen Nachweis dieser Erreger, einschließlich multiresistenter Klone, auf Oberflächen in der Patientenumgebung. Tanner *et al.* konnten in Patientenzimmern mit Kontaktisoliationsmaßnahmen aufgrund von Methicillin-resistentem *S. aureus* (MRSA), Vancomycin-resistentem *E. faecium* (VRE) beziehungsweise *C. difficile* in 23,2 %, 31,0 % bzw. 4,3 % die jeweiligen Erreger auf den Oberflächen in der Patientenumgebung nachweisen [3]. Interessanterweise wurden auch in 12 % der Patientenzimmer, die keinen Kontaktisoliationsmaßnahmen unterlagen, multiresistente Erreger festgestellt [3].

Anhand von Umgebungsuntersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass bestimmte Mikroorganismen durch Patienten in die Umgebung freigesetzt werden [4]. *In-vitro* Studien konnten zudem die Aufnahme und Übertragung von Erregern aus der Umwelt mittels Hand bzw. Handschuhkontakt zeigen [4]. Darüber hinaus wurde ein vergleichbares Risiko für den Erwerb von MRSA, VRE und *C. difficile* bei Kontakt von kontaminierten Oberflächen und direktem Patientenkontakt festgestellt [4]. Aus diesen Erkenntnissen lässt sich eine Relevanz von Oberflächen bei Übertragungen von bestimmten Krankenhauserregern ableiten [4].

Die zunehmende Evidenz der Bedeutung von Oberflächen im Zusammenhang mit Übertragungen von Krankenhauserregern führte zur heutigen Akzeptanz von Reinigung und Desinfektion von Oberflächen als essentieller Bestandteil von Infektionspräventionsmaßnahmen [5,6]. Allerdings stellt die erfolgreiche Umsetzung von Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen insbesondere im komplexen Krankenhausumfeld eine große Herausforderung dar. Monitoring Untersuchungen von Reinigungs- und Desinfektionsleistungen mittels Fluoreszenzmarkern ergaben, dass in lediglich 63 % der überwachten Schlussdesinfektionen die gesetzte Markierung erfolgreich entfernt wurde [7]. Auch bei einer mikrobiologischen Untersuchung von Oberflächen mittels RODAC-Abklatschplatten konnten nach Durchführung der Schlussdesinfektion in 55 % der Patientenzimmer Kontaminationen mit multiresistenten Mikroorganismen

festgestellt werden [8]. Hierbei wurden in 26,3 % *C. difficile*, in 22,5 % VRE, in 18,8 % MRSA und in 11,3 % *Acinetobacter baumannii* nachgewiesen [8].

Der unzureichende Erfolg von manuellen Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen führt dazu, dass Patienten, die in einem Patientenzimmer versorgt werden, welches zuvor mit einem infizierten oder kolonisierten Patienten belegt war, ein erhöhtes Risiko haben eine nosokomiale Infektion mit demselben Erreger zu erwerben [9]. Dieser Zusammenhang stellt ein vermeidbares Risiko dar, weshalb ein hoher Bedarf besteht durch Verbesserungen von Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen die Patientensicherheit zu erhöhen.

### 1.1.2 Automatische Raumdekontaminationsverfahren – UV-C Desinfektion

In der Vergangenheit konnte eine Verbesserung von Reinigungs- und Desinfektionsleistungen durch die Etablierung von Maßnahmenbündeln, bestehend aus regelmäßigem Training zur Auswahl, zum Umgang und zur Anwendungstechnik von Produkten, Überwachung mittels Fluoreszenzmarker-Technologie und regelmäßigem Feedback, gezeigt werden [6,10,11]. Eine nachhaltige Verbesserung ist jedoch nur dann zu erwarten, wenn konsequent eine hohe Compliance in der Ausführung des manuellen Reinigungs- und Desinfektionsprozesses vorliegt. Da das Erreichen einer hundertprozentigen Compliance schwierig ist, wurden in den vergangenen Jahren vermehrt automatische Raumdekontaminationsverfahren als Optimierungsansatz evaluiert. Diese weisen das Potential einer konstanten, verlässlichen und bedienerunabhängigen Desinfektion auf [12].

Bei den am häufigsten im Krankenhausumfeld eingesetzten Verfahren handelt es sich um Verneblung von Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) in Form von Aerosol und Dampf sowie Bestrahlung mit Ultraviolett C (UV-C) Strahlung [11,12]. Für die Anwendung gasförmiger Desinfektionsverfahren ist es aufgrund ihrer Diffusionsfähigkeit erforderlich, alle Öffnungen (Türschlitze, Lüftungsdurchlässe etc.) von Patientenzimmern zeitaufwändig abzudichten [11,12], um einen Austritt von toxischem Gas in angrenzende Bereiche ausschließen zu können. Die durchschnittliche Desinfektionszeit mit gasförmigen Verfahren beträgt zwischen 1,5 und 2 h für ein einzelnes Patientenzimmer [12]. In Abhängigkeit des Verfahrens ist eine unmittelbare Wiederbelegung des Patientenzimmers aufgrund von Desinfektionsmittelrückständen oder Geruchsbelästigung nicht möglich. Vor dem Hintergrund einer hohen Auslastung (ca. 73 % in Universitätskliniken, 2021, Deutschland [13]) von Krankenhäusern der Akutversorgung, welche eine schnelle Wiederbelegung von Patientenzimmern notwendig macht und den beschriebenen hohen Anforderungen zur Gewährleistung der Sicherheit, ist der Einsatz gasförmiger Desinfektionsverfahren zur Desinfektion von Patientenzimmern in der Regel nicht geeignet. Automatische Raumdesinfektionsverfahren auf Basis von UV-C Strahlung benötigen bei stationären Systemen ca. 50 Minuten sowie bei autonomen Systemen 10-20 Minuten für die Desinfektion eines Patientenzimmers [12]. Eine vorherige Abdichtung der Raumöffnungen sowie eine Sperrung nach der Desinfektion sind nicht notwendig.

Die hohe Wirksamkeit von UV-C wurde bereits gegen eine Vielzahl von Mikroorganismen allerdings vorwiegend in experimentellen Studien nachgewiesen [14]. Darüber hinaus wurde auch in Studien, in denen realitätsnahe Testbedingungen verwendet wurden, Reduktionen von ca.  $4 \log_{10}$  für MRSA und VRE festgestellt [15]. Der Hauptwirkmechanismus von UV-C ist die Absorption der Strahlung durch DNA, RNA und Proteine, was zu einer Störung der Replikation und somit zum Absterben der Organismen führt [16]. Da Mikroorganismen unterschiedliche Toleranzen gegenüber UV-C Strahlen aufweisen, sind für eine erfolgreiche Inaktivierung von Krankheitserregern auf Oberflächen erregerspezifische UV-C Dosen erforderlich [16]. In der Literatur sind jedoch unterschiedliche UV-C Dosen für das Erzielen einer Inaktivierung derselben Erregerspezies zu finden [14]. Diese Unterschiede sind hauptsächlich auf die verschiedenen Prüfbedingungen zurückzuführen. So beschreiben Scott *et al.* in ihrem Review zur UV-C Desinfektion von Oberflächen in Krankenhäusern erhebliche Unterschiede bei den in verschiedenen Studien verwendeten Geräten und Gerätespezifikation [17]. Auch im experimentellen Design und bei den angewendeten Methoden zur Bestimmung der Oberflächenkontamination wurden Unterschiede zwischen den Studien festgestellt [17]. Des Weiteren kann das Vorliegen unterschiedlicher Umgebungskonditionen (z.B. relative Luftfeuchtigkeit, Temperatur) die Effektivität der UV-C Desinfektion beeinflussen [18]. Die auf der Oberfläche erzielte UV-C Dosis ist zudem maßgeblich von der Bestrahlungszeit und der Bestrahlungsstärke abhängig [16]. Die auf die Zielfläche applizierte Bestrahlungsstärke wiederum wird entsprechend des inversen quadratischen Gesetzes durch den Abstand zur Lichtquelle beeinflusst [16,18]. Dieser Zusammenhang bedingt ebenfalls, dass in den unter diversen experimentellen Testbedingungen mit individuellen Raumgeometrien, Abständen und Strahlungswinkeln durchgeführten Wirksamkeitsprüfungen unzureichend vergleichbare erregerspezifische Dosen erzielt werden. Die große Heterogenität von Prüfbedingungen resultiert insbesondere auch aus der unzureichenden Standardisierung der Effektivitätsprüfungen von UV-C Desinfektionsgeräten [16–18]. Der erst im Jahr 2022 veröffentlichte britische Standard BS 8628 [19] stellt die erste und bisher einzige Norm dar, welche eine Methode zur quantitativen Prüfung der Wirksamkeit spezifisch für automatische UV-C Desinfektionsverfahren beschreibt [18]. Ein europäisch oder international harmonisierter Standard ist zum aktuellen Zeitpunkt nach Kenntnis der Autorin nicht vorhanden.

Bei der manuellen Desinfektion werden flüssige Desinfektionsmittel mit standardisierten Dosierungen verwendet, welche in der Regel oberhalb der Toleranzgrenzen einer Vielzahl von Mikroorganismen liegen. Die Schwierigkeit einer erfolgreichen Inaktivierung von Mikroorganismen besteht meistens darin, in der komplexen Krankenhausumgebung alle Oberflächen zu erreichen und hier die korrekte Einwirkzeit einzuhalten [11]. Selten sind auch Dosierungsfehler als Ursache von unzureichenden Desinfektionsleistungen beschrieben [20]. Im Gegensatz hierzu besteht die Problematik automatischer Desinfektionsverfahren üblicherweise nicht darin

alle Oberflächen zu erreichen, sondern darin eine ausreichende Dosis gleichmäßig auf alle Oberflächen zu verteilen [12,21,22]. Diese Schwierigkeit betrifft auch die Desinfektion mit UV-C Strahlung [16]. Eine Verbesserung dieser Problematik wurde vor allem in den letzten Jahren durch die Entwicklung autonom fahrender UV-C Roboter vorangetrieben [16]. Hierdurch soll eine gleichmäßigere Bestrahlung aller Oberflächen im Raum vor allem durch die Reduktion der Schattenbildung ermöglicht werden [16]. Insbesondere als Zusatz zur manuellen Reinigung- und Desinfektion wird der automatischen UV-C Desinfektion ein hohes Potential zugeschrieben [23].

### 1.1.3 Repräsentativität von Wirksamkeitsprüfungen unter Laborbedingungen

Für Desinfektionen im komplexen Krankenhausumfeld wurden im Vergleich zur berichteten *in-vitro* Effektivität geringere Wirksamkeiten festgestellt [24]. Ursächlich hierfür können Faktoren wie die Oberflächenbeschaffenheit, die aufgebrachte Desinfektionsmittelkonzentration und Kontaktzeit, aber auch potentiell umweltbedingte Anpassungen der Zielmikroorganismen sein [24]. Für die Prüfung von Desinfektionsverfahren werden in der Regel die für das jeweilige Anwendungsgebiet repräsentativen Labor- und Teststämme verwendet [25]. Diese Standardtestorganismen, die als Referenzstämme verwendet werden, können sich gegenüber Desinfektionsmitteln unter Umständen anders verhalten als die große Vielfalt von Bakterienklonen, die in der Krankenhausumgebung vorkommen. Auch in der aktuellen Version des normativen Standards zur Testung der Wirksamkeit chemischer Desinfektionsmittel DIN EN 14885-2023:07 wird der Aspekt erwähnt, dass künstlich eingebrachte Mikroorganismen gegebenenfalls nicht ausreichend repräsentativ für die Wirksamkeit gegenüber der natürlicherweise auf Oberflächen vorhandenen Mikroflora sein könnten [25].

Um auf unbelebten Oberflächen und somit unter Stressbedingungen überleben zu können, sind Mikroorganismen mit verschiedensten Schutzfaktoren ausgestattet [26]. Das Vorhandensein einer starken Pigmentierung, die Fähigkeit zur Bildung von antioxidativen Enzymen oder Biofilmen, der erfolgreiche Umgang mit schwankender oder extremer relativer Luftfeuchtigkeit, Temperatur und Nährstoffangebot können eine erhöhte Tenazität [26,27] und möglicherweise auch eine erhöhte Toleranz gegenüber UV-C Strahlung bedeuten. Für den relevanten Krankheitserreger *S. aureus* konnte beobachtet werden, dass die Ausprägung der Pigmentierung möglicherweise die Toleranz gegenüber UV-C beeinflussen kann [28]. Auch die Fähigkeit zur Katalasebildung wurde als Ursache für eine erhöhte Resistenz von *S. aureus* im Vergleich zum biologischen Indikatororganismus *Geobacillus stearothermophilus* gegenüber Wasserstoffperoxid vermutet [29]. Der Wirkmechanismus von UV-C Strahlung beruht unter anderem auch auf der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, welche bei der Absorption entstehen und zur Schädigung von Mikroorganismen führen [30]. Da die Katalase in der Lage ist reaktive Sauerstoffspezies abzubauen, könnten Unterschiede in der Fähigkeit der Katalasebildung die UV-C-Toleranz von Mikroorganismen beeinflussen. Ein weiterer Faktor, der die Persistenz von

Bakterien auf Oberflächen beeinflusst und den Schutz vor Umwelteinflüssen erhöht, ist die Produktion von extrazellulären polymeren Substanzen [26]. Bakterien innerhalb eines solchen Biofilms können vor einem direkten Kontakt mit Desinfektionsmittel beziehungsweise direkter Bestrahlung mit UV-C geschützt werden [26,31]. Es konnte gezeigt werden, dass diese Abschirmung eine erhöhte UV-C Toleranz von Biofilmen im Vergleich zu planktonischen Zellen bedingt [31].

Das Vorliegen unterschiedlicher phänotypischer Ausprägungen dieser Schutzfaktoren bei klinischen Isolaten der gleichen Erregerspezies könnte somit Unterschiede in der UV-C Toleranz hervorrufen. Testorganismen, die für Wirksamkeitsprüfungen verwendet werden, weisen unter Umständen keine dieser umweltbedingten Adaptionen auf, sodass fraglich ist, inwiefern eine wirksame Reduktion gegenüber den Testorganismen aussagekräftig für eine Wirksamkeit gegenüber klinischen Isolaten ist. Dieses Wissen ist entscheidend für die Etablierung standardisierter Wirksamkeitsprüfungen, welche repräsentativ für die Wirksamkeit gegenüber natürlich vorkommenden Mikroorganismen sein sollen.

### 1.1.4 Feldstudien zur Beurteilung der Wirksamkeit von Desinfektionsverfahren

Standardisierte Zulassungsverfahren und normgerechte *in-vitro* Studien sind geeignet, um zu ermitteln mit welcher Formulierung und Dosierung eine prinzipiell zuverlässige Wirksamkeit erzielt werden kann [24]. Dies wird durch die Definition klarer Einwirkzeiten und Konzentration, welche die erforderliche Reduktion von Testorganismen auf Oberflächen erzielen, ermöglicht [24]. Solche Laborstudien sind jedoch möglicherweise nicht geeignet, um auch in der Realität eine Wirksamkeit gewährleisten zu können. Uy *et al.* berichteten beispielsweise, dass nicht alle getesteten kommerziellen Desinfektionsmitteln bei einer Verwendung in der vom Hersteller empfohlenen Verdünnung eine erfolgreiche Desinfektion unter den realen Labortestbedingungen erzielten [32]. In einer weiteren Veröffentlichung wurden, obwohl vor der Desinfektion bereits nur eine geringe mikrobielle Belastung vorhanden war, auch nach der manuellen Desinfektion Staphylokokken auf Oberflächen nachgewiesen [33].

Daher wird zunehmend empfohlen die Wirksamkeit von Desinfektionsverfahren auch in Feldstudien unter den typischen Einsatzbedingungen eines Produktes und gegen natürlich vorkommende Mikroorganismen zu beurteilen [25]. Die Sinnhaftigkeit von Phase-3-Tests (Feldstudien) wird auch im Anhang der DIN EN 14885:2023 ausgeführt [25]. Vor allem für neuartige Produkte, für welche nur unzureichende Daten vorliegen und gegebenenfalls noch keine genormten Laborverfahren definiert sind, ist die Durchführung von Feldstudien empfohlen [25].

Die Etablierung einer Feldstudie unter realistischen, repräsentativen und reproduzierbaren Bedingungen ist jedoch schwierig. Insbesondere eine standardisierte Bewertung der Wirksamkeit durch die Berechnung von Reduktionsfaktoren im Bereich von drei bis fünf  $\log_{10}$ -Stufen ist aufgrund der überwiegend geringen Oberflächenkontaminationen im Krankenhausumfeld



nicht möglich [3,25]. Zudem ist es eine Herausforderung Oberflächen mit einer vergleichbaren, ausreichend hohen und repräsentativen natürlichen mikrobiellen Belastung zu identifizieren.

Bei automatisierten UV-C Raumdesinfektionsgeräten handelt es sich um Technologien, für die eine Wirksamkeitsprüfung im Labor möglicherweise nicht ausreicht, um die Wirksamkeit im praktischen Einsatz zu gewährleisten. Ursächlich hierfür ist, neben den beschriebenen möglichen erregerspezifischen Unterschieden in der UV-C Toleranz, die Vielzahl weiterer Faktoren, welche die Wirksamkeit von UV-C in der Praxis beeinflussen. Eine erfolgreiche Inaktivierung ist, wie bereits erwähnt, insbesondere von der Ausbringung einer ausreichenden Dosis UV-C Strahlung auf die Zieloberfläche abhängig. Bedingt durch die Raumgeometrie befinden sich die Oberflächen in einem Raum üblicherweise in unterschiedlichen Entfernungen zur UV-C Strahlungsquelle [21], sodass unterschiedliche Dosen auf die zu desinfizierenden Oberflächen einwirken. Des Weiteren können Einrichtungsgegenstände Schattenbildung hervorrufen und somit Bereiche ohne direkte Bestrahlung mit UV-C verursachen [21], wodurch reduzierte Desinfektionsleistungen bedingt werden [16,18]. Zudem wird die Effektivität reduziert sobald organisches Material auf Oberflächen vorhanden ist, da hierdurch ebenfalls die direkte Bestrahlung von Mikroorganismen eingeschränkt werden kann [16,18,21]. Auch die Beschaffenheit der Oberfläche kann einen Einfluss auf die Desinfektionswirksamkeit haben [18]. So wurde beispielsweise auf einer Plastikttestoberfläche eine geringere Reduktion im Vergleich zu Edelstahl, Porzellan und Chrom Testoberflächen erzielt [15]. Die beschriebenen Faktoren sind je Einsatzgebiet und Raumbedingungen sehr individuell. Daher wird für den Einsatz von automatischen UV-C Raumdesinfektionssystemen die Durchführung mikrobiologischer Verifizierungstests bzw. Feldstudien in der jeweiligen klinischen Umgebung empfohlen, um die Wirksamkeit unter den jeweiligen Einsatzbedingungen sicherzustellen [21].

## 1.2 Fragestellung und Zielsetzung

Kontaminierte Oberflächen stellen eine relevante Ursache für die Verbreitung nosokomialer Infektionserreger dar. Zur Reduktion von Oberflächenkontaminationen und der Verbesserung von Desinfektionsleistungen wurden in den vergangenen Jahren vermehrt automatische Raumdesinfektionsverfahren basierend auf UV-C Strahlung eingesetzt.

Aufgrund der Vielzahl von verschiedenen Schutzfaktoren, die Mikroorganismen unter umweltbedingten Stressbedingungen ausbilden und somit hohe Umweltpersistenz erreichen können, sind die in Wirksamkeitsprüfungen üblicherweise eingesetzten Standardtestorganismen möglicherweise nicht ausreichend repräsentativ für eine Wirksamkeit gegenüber natürlicherweise auf Oberflächen vorkommenden Mikroorganismen.

Hieraus ergibt sich die Fragestellung, inwiefern Unterschiede in der UV-C Toleranz zwischen genetisch verschiedenen klinischen Isolaten und den jeweiligen Standardtestorganismen für die relevanten krankenhausessoziierten Infektionserreger VRE und MRSA vorhanden sind.

Zudem ist fraglich, inwiefern Unterschiede der phänotypischen Ausprägung von Isolaten der gleichen Erregerspezies die UV-C Toleranz beeinflussen. Diese Fragestellungen wurden in den nachfolgenden beiden Teilprojekten bearbeitet:

- I. Untersuchung der UV-C Toleranz von zehn genetisch verschiedenen klinischen Vancomycin-resistenten *Enterococcus faecium* (VRE) Isolaten [34]
- II. Einfluss phänotypischer Unterschiede von klinischen *Staphylococcus aureus* Isolaten auf die UV-C Toleranz [35]

Die üblicherweise in Laborexperimenten ermittelten wirksamen UV-C Dosen sind aufgrund der Vielzahl von anwendungsspezifischen Faktoren, welche die Wirksamkeit in der Praxis beeinflussen, nicht geeignet, um unter den komplexen Bedingungen des Krankenhauses Mikroorganismen effektiv zu inaktivieren. Daher ist die Entwicklung und Etablierung einer reproduzierbaren Phase 3 Feldstudie zur Beurteilung der Wirksamkeit in der Praxis von großer Relevanz. Die Durchführung dieser repräsentativen Feldstudie sollte die Beurteilung der Wirksamkeit eines UV-C Desinfektionsroboters im Vergleich zum Standarddesinfektionsverfahren ermöglichen. Die Bearbeitung dieser Fragestellung erfolgte in Teilprojekt III:

- III. Vergleich der Desinfektionsleistung eines automatischen UV-C Desinfektionsroboters mit manueller Wischdesinfektion mittels standardisiertem Testverfahren unter Realbedingungen [36]

Die gewonnenen Erkenntnisse haben zum Ziel eine bessere Beurteilung der Wirksamkeit automatischer UV-C Desinfektionsverfahren sowie Verifikation ihrer Leistung in der komplexen Krankenhausumgebung zu ermöglichen und somit zu einer Erhöhung der Patientensicherheit durch Verbesserung von Desinfektionsprozessen beizutragen.

### 1.3 Methodik

Für die Beantwortung der Fragestellungen wurden zwei experimentelle Studien unter Realität simulierenden Testbedingungen (I+II) sowie eine Feldstudie (III) durchgeführt. Die hierbei verwendeten Methoden werden nachfolgend zusammenfassend dargestellt. Für detaillierte Informationen zu den Methoden wird auf die Originalpublikationen verwiesen [34–36].

#### 1.3.1 Laborexperimente zur Untersuchung der UV-C Toleranz klinischer Isolate

Für die Ermittlung von Unterschieden in der UV-C Toleranz zwischen verschiedenen klinischen Isolaten derselben Erregerspezies sowie den Standardtestorganismen wurden standardisiert artifiziell kontaminierte Oberflächen (25 cm<sup>2</sup> Keramikachel) hergestellt. Diese waren jeweils mit einer bakteriellen Kontamination zwischen  $5 \times 10^5$  und  $5 \times 10^6$  Koloniebildenden Einheiten (KBE)/25cm<sup>2</sup> belastet. Für die Testungen wurden 10 genetisch diverse klinische VRE Isolate sowie acht genetisch diverse klinische MRSA Isolate und ein visuell nicht pigmentiert erscheinendes *S. aureus* Isolat verwendet. Als Standardtestorganismen wurden in Übereinstimmung mit den normativen Vorgaben *Enterococcus hirae* ATCC 10541 sowie *S. aureus*

ATCC 6538 verwendet [25,37]. Für die Gewährleistung einer realitätsnahen Kontamination wurde die bakterielle Kontamination mit geringer organischer Belastung (0,3 %ig) versetzt. Die Desinfektion wurde mit dem automatischen UV-C Desinfektionsroboter UVD robot Modell C (UVD Robots, Odense, Dänemark) mit einer Wellenlänge von 254 nm und einer Bestrahlungsstärke von 2.500  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  bei einer Entfernung von 1 m zur UV-C Lichtquelle durchgeführt.

Die kontaminierten Oberflächen wurden in 1,0 und 1,5 m Entfernung zur UV-C Lichtquelle in einer standardisierten Weise horizontal positioniert und für 20 s bestrahlt, sodass eine Dosis von 50 bzw. 22  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  appliziert wurde. Nach der Desinfektion wurde die bakterielle Konzentration ( $\text{KBE}/\text{cm}^2$ ) auf den bestrahlten Oberflächen sowie Kontrolloberflächen bestimmt. Hierfür wurden diese mittels standardisiertem Abstrichverfahren untersucht und anschließend quantitative Kulturen im Doppelansatz hergestellt. Die Wirksamkeit der UV-C Desinfektion gegenüber den verschiedenen klinischen Isolaten wurde anhand von Reduktionsfaktoren ermittelt. Dazu wurde der dekadische Logarithmus ( $\log_{10}$ ) der Bakterienzahlen nach der Desinfektion von dem  $\log_{10}$  der Bakterienzahlen vor der Desinfektion subtrahiert. Die Ergebnisse wurden in fünf unabhängigen Experimenten je klinischem Isolat ermittelt. Die Beurteilung von Unterschieden in der UV-C Toleranz der verschiedenen klinischen Isolate erfolgte durch statistische Vergleiche der Mittelwertunterschiede der Reduktionen mit einer one-way ANOVA (Befehl *anova\_test*). Bei signifikanten Ergebnissen wurden anschließend paarweise Vergleiche (Tukey HSD oder unabhängiger *t*-test) durchgeführt.

Zudem wurde der mögliche Einfluss von phänotypischen Unterschieden in der Pigmentierung, der Katalasebildung sowie der Fähigkeit zur Biofilmbildung auf die UV-C Toleranz klinischer *S. aureus* Isolate untersucht. Für die Bestimmung der Pigmentierung wurde der Staphyloxanthingehalt unter Verwendung einer Methanolextraktionsmethode quantifiziert. Mittels einer visuellen Methode wurde die Katalaseaktivität bestimmt. Das Ausmaß der Schaumbildung, welche bei der Reaktion von Triton-X und 30 % Wasserstoffperoxid mit der Bakteriensuspension entstanden ist, zeigte die Katalaseaktivität an. Die Fähigkeit zur Biofilmbildung wurde unter drei verschiedenen Wachstumsbedingungen (Standardkulturmedium (SK), SK + 4 % NaCl, SK + 4 % Ethanol) mit einem Biofilm-Assay untersucht. Nach Färbung mit Genitanviolett und anschließender Auswaschung und Trocknung wurden die Absorptionswerte bei spezifischer Wellenlänge mit einem Mikroplatten-Reader bestimmt. Abschließend wurde geprüft, ob ein Zusammenhang zwischen den Unterschieden in den phänotypischen Ausprägungen und den durch die UV-C Desinfektion erzielten Reduktionen zu beobachten war.

### 1.3.2 Feldstudie zur Beurteilung der UV-C Desinfektionswirksamkeit in der Praxis

Die Feldstudie wurde in drei Untersuchungsräume einer onkologischen Ambulanz mit gleicher Größe und Raumgeometrie etabliert. Jeder Raum war mit vier modellgleichen Behandlungsliegen ausgestattet. Die Liegen unterlagen einer gleichmäßigen, häufigen und über längere

Zeit bestehenden Nutzung mit direktem Hautkontakt durch Patienten, die häufig Risikofaktoren für den Erwerb von krankenhausessoziierten Infektionserregern aufwiesen. Aufgrund der Art der Nutzung wurde im Vergleich zum sonstigen klinischen Umfeld eine hohe natürliche mikrobielle Belastung der Oberflächen angenommen.

Um das Vorliegen einer entsprechend den Anforderungen natürlich hoch kontaminierten Oberfläche nachzuweisen, wurde vor der Desinfektion je Untersuchungs-liege an sechs definierten Handkontaktflächen (78-100 cm<sup>2</sup>) die Gesamtkeimzahl bestimmt. Hierfür wurden die Oberflächen mittels Abstrichverfahren untersucht und anschließend quantitative Kulturen hergestellt. Jeweils zwei Liegen pro Raum wurden vor und zwei Liegen nach der Desinfektion untersucht, sodass insgesamt je 36 Werte für die bakterielle Konzentration vor und nach Desinfektion erhoben wurden. Zudem wurde qualitativ ermittelt, ob die relevanten Infektionserreger *E. faecium* und *S. aureus* auf den Oberflächen nachgewiesen werden konnten. Es wurden sechs unabhängige Experimente für das UV-C Desinfektionsverfahren (UVD Robot Modell C) ohne vorherige manuelle Reinigung und drei unabhängige Experimente für die manuelle Wischdesinfektion mit alkoholisch-vorgetränkten Tüchern (Bacillo® AF Tissues, Paul Hartmann AG, Deutschland) durchgeführt.

Für die Desinfektion mit UV-C wurden acht gleichmäßig im Raum verteilte Desinfektionspunkte definiert. An diesen Punkten verweilte der UV-C Roboter jeweils für eine Bestrahlungszeit von 50 s, bevor er unter kontinuierlicher Strahlung automatisch zum nächsten Desinfektionspunkt fuhr. Die manuelle Desinfektion erfolgte in Übereinstimmung mit der vom Hersteller definierten Einwirkzeit und der maximal mit einem Tuch zu desinfizierenden Fläche. Um eine vergleichbare Applikationstechnik und Mechanik zu gewährleisten, wurde die manuelle Desinfektion durch eine einzelne Person durchgeführt.

Die Bewertung der Wirksamkeit wurde anhand von zwei verschiedenen Kriterien vorgenommen: Zum einen wurde durch den Vergleich der oberflächenspezifischen bakteriellen Konzentration vor und nach der Desinfektion die logarithmische Reduktion für die UV-C und die manuelle Desinfektion bestimmt. Durch die statistische Analyse mittels *t*-test wurde bewertet, ob die beobachteten Unterschiede in den Reduktionen je Oberfläche zwischen den beiden Desinfektionsverfahren statistisch signifikant ( $P < 0,05$ ) waren. Zudem wurde die Wirksamkeit anhand des Desinfektionserfolges beurteilt. Als Kriterium für eine saubere Oberfläche wurde eine Gesamtkeimzahl  $< 1$  KBE/cm<sup>2</sup> und kein Nachweis von relevanten Infektionserregern festgelegt.

## 1.4 Ergebnisse

### 1.4.1 Unterschiede in der UV-C Toleranz von *E. faecium* und *S. aureus* Isolaten

Der Vergleich der erreichten Reduktionen bakterieller Konzentrationen auf Oberflächen nach der Desinfektion mit UV-C Bestrahlung ergab Unterschiede sowohl zwischen den verschiede-

nen klinischen VRE Isolaten als auch dem Standardtestorganismus *E. hirae* ATCC 10541 (Abbildung 1A) [34]. Bei einer UV-C Dosis von 50 mJ/cm<sup>2</sup> wurden Reduktionen im Bereich von 4,01 bis 2,96 log<sub>10</sub> (im weiteren Textverlauf wird jeweils der Median angegeben; maximale Differenz: 1,05 log<sub>10</sub>) ermittelt (Abbildung 1A). Sowohl bei den UV-C tolerantesten als auch sensibelsten Isolaten handelt es sich um klinische Isolate. Für die Unterschiede zwischen den drei tolerantesten und dem sensibelsten Isolat wurde jeweils eine statistische Signifikanz festgestellt. Bei der geringeren Bestrahlungsdosis von 22 mJ/cm<sup>2</sup> wurde eine leichte Zunahme der Differenz zwischen den erreichten Reduktionsfaktoren beobachtet (maximale Differenz: 1,39 log<sub>10</sub>; Abbildung 1A). Das UV-C toleranteste Isolat wurde um 2,15 log<sub>10</sub> reduziert, während für das Sensibelste eine Reduktion von 3,54 log<sub>10</sub> erzielt wurde (Abbildung 1A). Eine statistisch signifikant unterschiedliche Reduktion wurde für das toleranteste Isolat im Vergleich zu den fünf sensibelsten Isolaten identifiziert. Ebenso war der Unterschied zu *E. hirae* ATCC 10541 statistisch signifikant.

Auch der Vergleich der erreichten Reduktionen von acht genetisch verschiedenen klinischen MRSA Isolaten, einem visuell nicht pigmentiert erscheinenden klinischen *S. aureus* Isolat und dem Testorganismus *S. aureus* ATCC 6538 zeigte Unterschiede in der UV-C Toleranz (Abbildung 1B) [35]. Eine Bestrahlung mit 50 mJ/cm<sup>2</sup> ergab Reduktionen im Bereich von 4,86 bis 5,99 log<sub>10</sub> (Differenz: 1,13 log<sub>10</sub>; Abbildung 1B). Ein signifikanter Unterschied der Reduktionen konnte für den Vergleich des tolerantesten mit dem sensibelsten klinischen Isolat ermittelt werden. Die erreichten Reduktionen nach Bestrahlung mit einer Dosis von 22mJ/cm<sup>2</sup> waren im Bereich von 4,68 bis 5,11 log<sub>10</sub> (Differenz: 0,43 log<sub>10</sub>, Abbildung 1B). Die statistische Analyse ergab keine signifikant unterschiedlichen Reduktionen. Der Standardtestorganismus *S. aureus* ATCC 6538 weist mit den klinischen Isolaten vergleichbare Reduktionen auf.

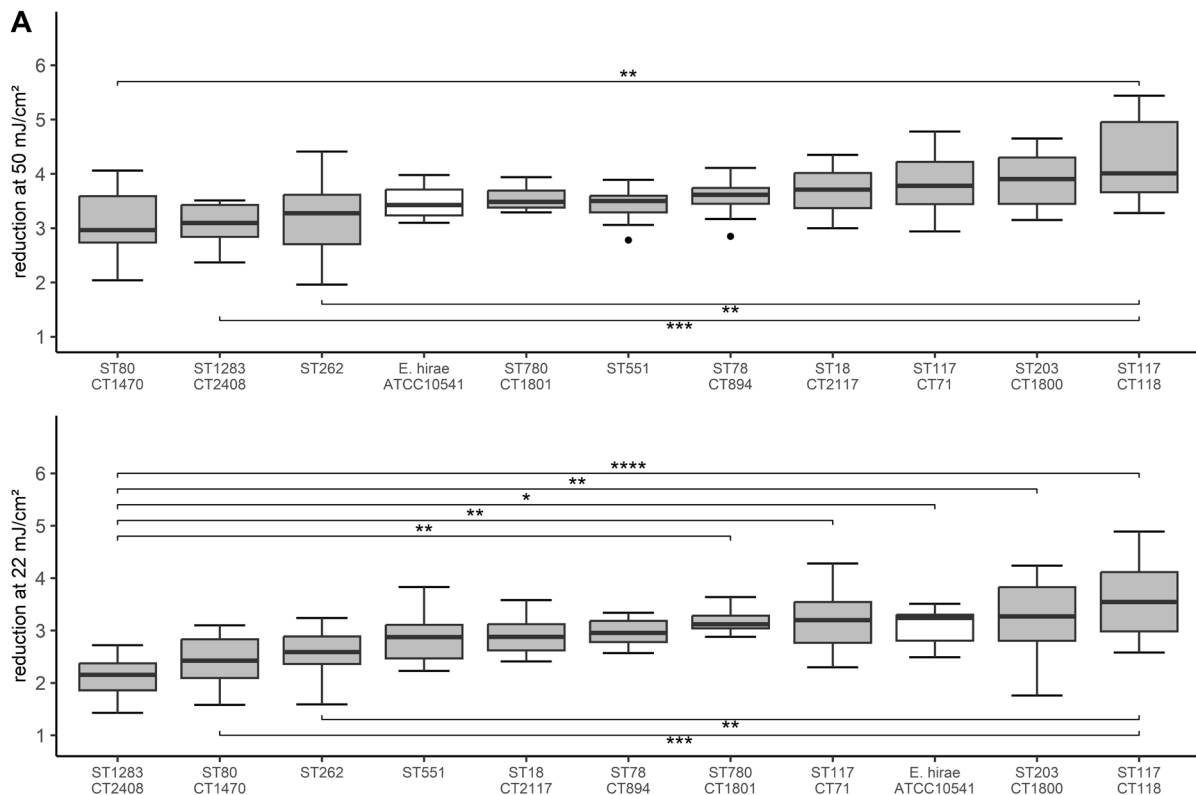
Die getesteten klinischen *S. aureus* Isolate wurden auch auf das Vorliegen von Unterschieden in den phänotypischen Ausprägungen Pigmentierung, Katalaseaktivität und Fähigkeit zur Biofilmbildung untersucht [35]. Visuell konnte ein Unterschied in der Pigmentierung der klinischen Isolate beobachtet werden [35]. Dieser subjektive Unterschied wurde durch die Quantifizierung des Staphyloxanthingehalts bestätigt. Hierbei wurde für *S. aureus* ATCC 6538 der höchste Staphyloxanthingehalt festgestellt (normalisierte Absorption bei 465 nm ( $A_{465}$ ), Median 0,325). Für MRSA ST59/t216 wurde ebenfalls eine starke Pigmentbildung ( $A_{465}$  Median 0,245) ermittelt, während die weiteren Isolate eine vergleichbare Pigmentierung mit  $A_{465}$  Werten im Bereich von 0,19 bis 0,13 aufwiesen. Der geringste Staphyloxanthingehalt wurde für das optisch nicht pigmentiert erscheinende Isolat gemessen.

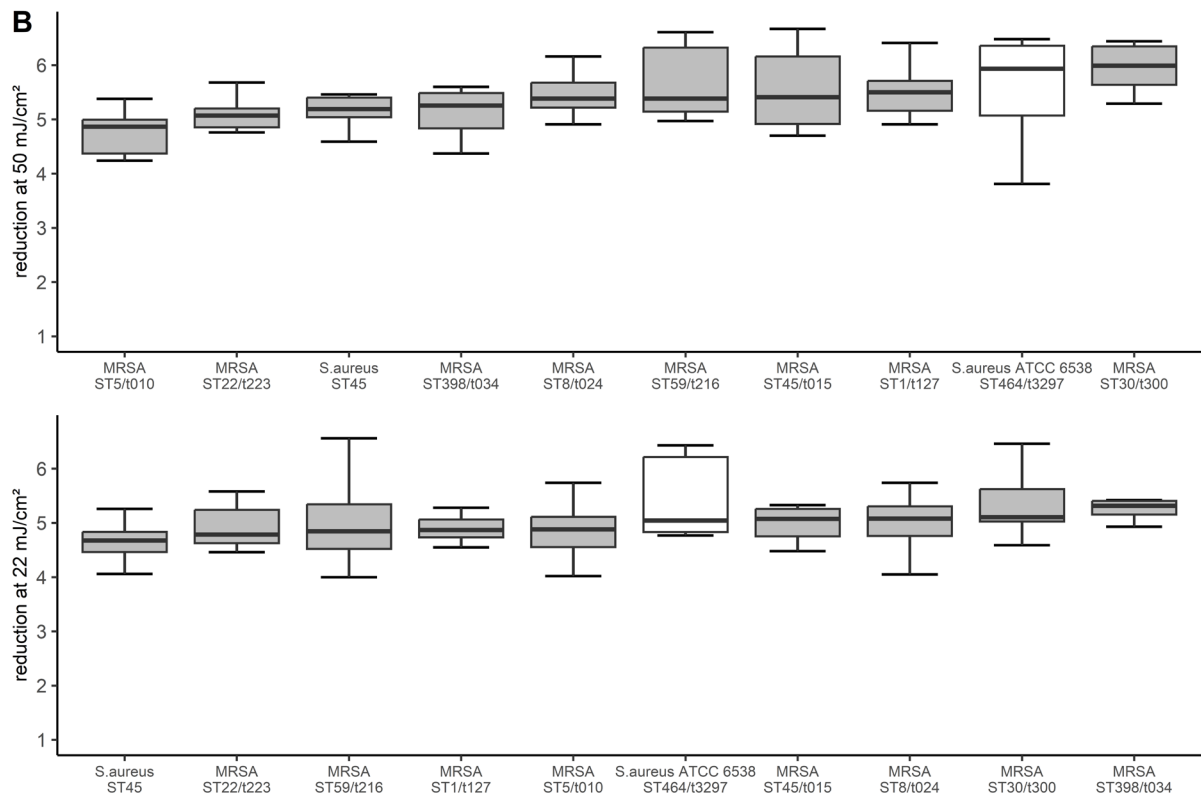
Auch bezüglich der Katalaseaktivität wurden Unterschiede zwischen den verschiedenen klinischen Isolaten festgestellt [35]. Die stärkste Katalasebildung zeigte *S. aureus* ATCC 6538. Eine Katalaseaktivität im oberen mittleren Bereich (Median 5,2 bis 6,2 cm) wurde für MRSA ST59, ST22 und ST5 beobachtet, während für die weiteren Isolate eine Aktivität im unteren

mittleren Bereich (Median 2,7 bis 4,1) festgestellt wurde. Das Isolat MRSA ST8/t023 zeigte eine deutlich geringere Katalasebildung (Median 1,4).

Die Fähigkeit der Biofilmbildung wurde für sechs der insgesamt zehn *S. aureus* Isolate nachgewiesen [35]. Unter nicht induzierenden Wachstumsbedingungen konnte nur für MRSA ST45/t015 eine starke Biofilmbildung beobachtet werden. Die Zugabe von Natriumchlorid führte bei fünf Isolaten zu einer vermehrten Biofilmbildung, sodass unter diesen Bedingungen vier Isolate eine als stark bewertete Biofilmbildung aufwiesen. Auch die Zugabe einer subinhibitorischen Konzentration Ethanol induzierte eine verstärkte Biofilmbildung von MRSA ST45/t015. Bei den weiteren biofilmpositiven Isolaten führte dies jedoch zu einer Reduktion der Biofilmbildung.

Die Analyse der phänotypischen Ausprägungen ergab deutliche Unterschiede zwischen den *S. aureus* Isolaten. *S. aureus* ATCC 6538 zeigte sowohl die stärkste Pigmentierung als auch Katalaseaktivität. Im Vergleich zu den weiteren Isolaten konnte jedoch keine erhöhte oder verminderte UV-C Toleranz festgestellt werden. Auch die stark ausgeprägte Biofilmbildung von MRSA ST45/t015 resultierte nicht in einer erhöhten oder verminderten UV-C Toleranz. Ein Zusammenhang zwischen den untersuchten unterschiedlichen phänotypischen Ausprägungen der klinischen Isolate mit einer verminderten oder erhöhten Toleranz gegenüber verschiedenen UV-C Strahlungsdosen konnte nicht festgestellt werden.





**Abbildung 1:** Reduktion verschiedener *Enterococcus faecium* (A) [34] und *Staphylococcus aureus* (B) [35] Isolate bei einer Bestrahlungsdosis von 50 und 22 mJ/cm<sup>2</sup>. Die Boxplots beinhalten die in fünf unabhängigen Experimenten ermittelten Reduktionen. Der weiß markierte Boxplot zeigt den jeweiligen ATCC Referenzorganismus. Signifikante Mittelwertunterschiede werden durch die Verbindung mittels Klammern dargestellt. Hierbei bedeuten \* =  $P < 0,01$ , \*\* =  $P < 0,001$ , \*\*\* =  $P < 0,0001$  und \*\*\*\* =  $P < 0,00001$ . Die Boxplots sind aufsteigend in der Reihenfolge des Median sortiert.

#### 1.4.2 Feldstudie zur Prüfung der Wirksamkeit von UV-C und manueller Desinfektion

Für den Nachweis der Wirksamkeit von automatischen UV-C Desinfektionsverfahren in der realen Anwendung wurde eine Feldstudie entwickelt und etabliert [36]. Die mikrobielle Untersuchung der Handkontaktflächen mit UV-C- bzw. manueller Desinfektion ergab eine mittlere bakterielle Kontamination von 23,3 bzw. 29,7 KBE/cm<sup>2</sup> (Abbildung 2A). Die Kopflehne wurde sowohl vor der UV-C- als auch der manuellen Desinfektion als am höchsten kontaminierte Oberfläche identifiziert (Median: 27,4 KBE/cm<sup>2</sup> bzw. 37,3 KBE/cm<sup>2</sup>). Auf der Bedienung zum Verstellen der Untersuchungsloge (Median: 12,1 bzw. 19,8 KBE/cm<sup>2</sup>) und dem Patientenrufknopf (Median 9,4 bzw. 14,8 KBE/cm<sup>2</sup>) wurden mittlere bakterielle Kontaminationen nachgewiesen. Die Armlehnen und die Sitzfläche wiesen die geringsten Kontaminationen im Bereich von 3,9 bis 9,3 KBE/cm<sup>2</sup> (Median) auf. Neben der bakteriellen Kontamination wurden auf den Oberflächen häufig visuelle Verschmutzungen mit Fett und Hautschuppen beobachtet. Die qualitative Untersuchung hinsichtlich des Vorhandenseins relevanter nosokomialer Infektionserreger ergab vor der Testung beider Desinfektionsverfahren den Nachweis von *S. aureus* und *E. faecium*. Hierbei wurde vor der UV-C bzw. manueller Desinfektion auf jeweils 5/216 bzw.

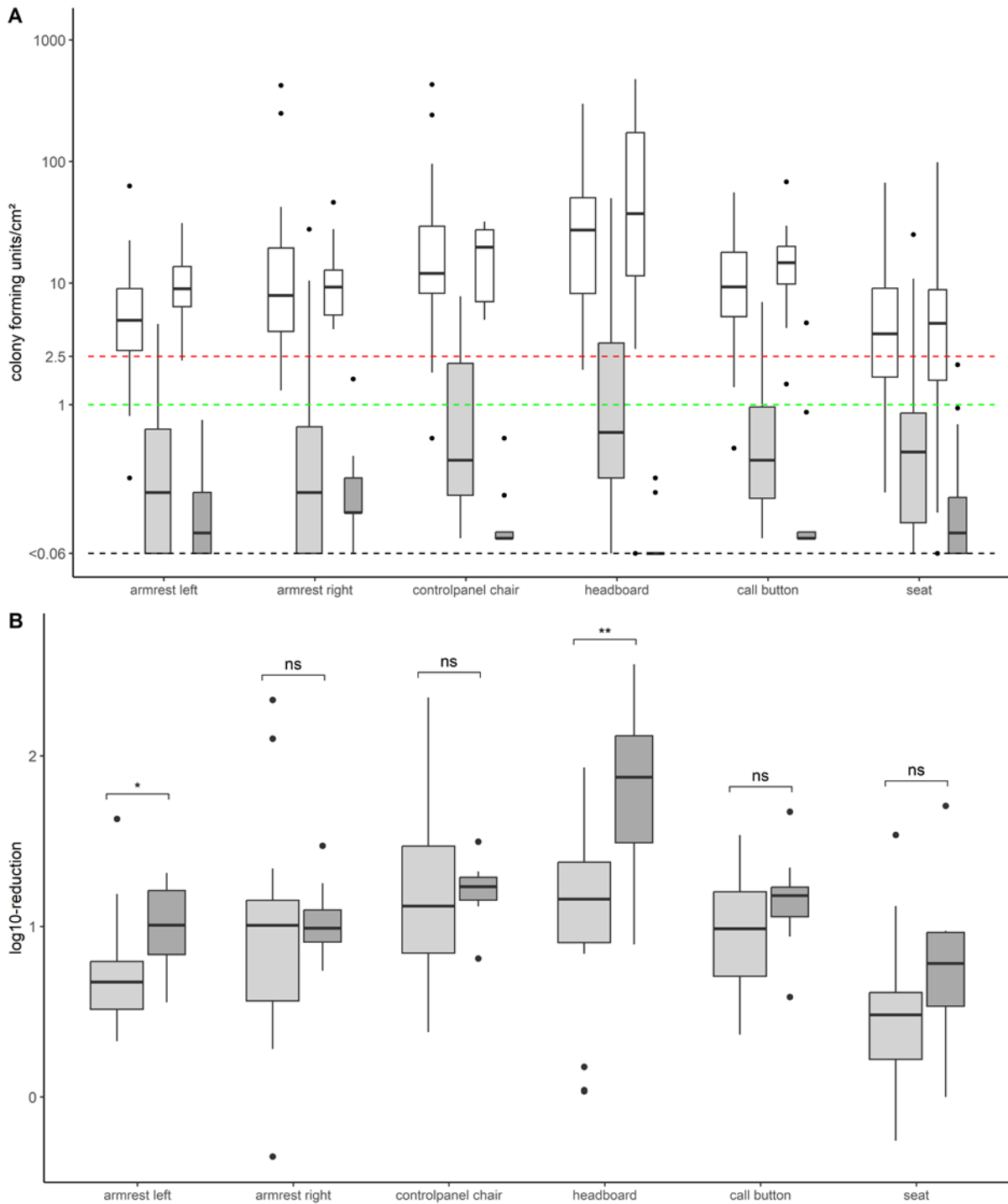
6/106 Oberflächen *E. faecium* und auf 18/216 bzw. 12/106 Oberflächen *S. aureus* nachgewiesen. Die Kontaminationen auf den untersuchten Handkontaktflächen vor der UV-C und der manuellen Desinfektion waren quantitativ und qualitativ vergleichbar. Geeignete Testbedingungen für die Durchführung von Feldstudien konnten gezeigt werden.

Die Desinfektion mit UV-C ohne eine vorherige Reinigung erzielte eine Reduktion der bakteriellen Gesamtkeimzahl auf 0,35 KBE/cm<sup>2</sup> (Median). Die höchste Belastung wurde hierbei weiterhin auf der Kopflehne nachgewiesen (Median 0,6 KBE/cm<sup>2</sup>). Für die verschiedenen Oberflächen wurden somit Reduktionen im Bereich von 0,5 bis 1,2 log<sub>10</sub> (Median) ermittelt (Abbildung 2B). Durch die automatische Desinfektion mit UV-C konnte für 163 von 216 Oberflächen die Erfüllung der Kriterien einer sauberen Oberfläche festgestellt werden. 24,5 % der untersuchten Oberflächen zeigten jedoch weiterhin Gesamtkeimzahlen oberhalb des definierten Grenzwertes für eine saubere Oberfläche. Zudem wurden auf drei Oberflächen auch nach der UV-C Desinfektion *E. faecium* und *S. aureus* nachgewiesen.

Die manuelle Desinfektion ergab eine Reduktion der bakteriellen Konzentration auf 0,1 KBE/cm<sup>2</sup> (Median). Hierbei wurde die höchste Gesamtkeimzahl auf der Armlehne rechts festgestellt (Median 0,13 KBE/cm<sup>2</sup>). Die erreichten Reduktionen betragen im Median 0,8 bis 1,9 log<sub>10</sub>. Für 98,1 % der untersuchten Oberflächen (104/106) wurden die Kriterien für eine saubere Oberfläche erfüllt. *E. faecium* und *S. aureus* konnten nach Durchführung der manuellen Desinfektion nicht nachgewiesen werden.

Die statistische Analyse der Mittelwertunterschiede der erreichten Reduktionen ergab für die Oberflächen Armlehne rechts, für die Bedienung der Untersuchungsliege, für den Patiententrufknopf sowie die Sitzfläche keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen manueller und UV-C Desinfektion. Bei den erreichten Reduktionen am Kopfteil (95 % KI [-1,17; -0,25],  $P = 0,004$ ) sowie an der Armlehne links (95 % KI [-0,516; -0,009],  $P = 0,04$ ) konnten jedoch statistisch signifikante Unterschiede festgestellt werden.





**Abbildung 2:** Bakterielle Belastung der Oberflächen vor und nach UV-C bzw. manueller Desinfektion (A) und ermittelte log<sub>10</sub>-Reduktionen (B) [36]. Die weißen Boxplots (A) stellen die Anzahl Koloniebildender Einheiten (KBE) pro cm<sup>2</sup> auf den jeweiligen Oberflächen vor UV-C bzw. manueller Desinfektion dar. Mit hell- und dunkelgrau gefüllte Boxplots (A) repräsentieren die Anzahl KBE/cm<sup>2</sup> nach UV-C bzw. nach alkoholischer Wischdesinfektion. Die gestrichelte schwarze Linie zeigt die Nachweisgrenze, während die farbigen Linien die für eine erfolgreiche (grün) bzw. unzureichende Desinfektion (rot) definierten Grenzwerte darstellen. Die ermittelten log<sub>10</sub>-Reduktionen werden durch hellgrau (UV-C) und dunkelgrau (manuelle Desinfektion) gefüllte Boxplots repräsentiert (B). Die Ergebnisse des paarweisen Vergleiches der Mittelwertunterschiede werden durch Klammern dargestellt. Hierbei bedeuten ns = nicht signifikant, \* = P < 0,05 und \*\* = P < 0,01.

## 1.5 Diskussion

### 1.5.1 Relevanz klinischer Isolate in der Wirksamkeitsprüfung von UV-C Desinfektion

Die Persistenz von Bakterien in der unbelebten Umwelt wird durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst. Neben dem Oberflächenmaterial, der Umgebungstemperatur und der relativen Luftfeuchtigkeit sind beispielsweise die Art der Bakterienspezies und der Ort der Isolation ausschlaggebend [26,27]. Dies konnte beispielsweise für *A. baumannii* gezeigt werden: Isolate, welche unmittelbar von Oberflächen aus der Umwelt gewonnen wurden, zeigten eine längere Persistenz auf Oberflächen, als aus flüssigen Materialien gewonnene Isolate [38]. Auch der Standardtestorganismus *A. baumannii* ATCC 19606 zeigte eine geringere Persistenz als die aus der unbelebten Umwelt stammenden Isolate [38]. Zudem können weitere Faktoren wie das Vorhandensein von Pigmentierung oder die Bildung von Biofilmen die Überlebensfähigkeit auf unbelebten Oberflächen beeinflussen [27].

Gute Überlebensfähigkeiten auf Oberflächen sind häufig auf eine hohe Anpassungsfähigkeit und schnelle Reaktionen auf Umweltstressfaktoren zurückzuführen. *S. aureus* Stämme verfügen über eine Vielzahl von Mechanismen zur Abwehr von oxidativem Stress, der durch exogene und endogene Reaktionen verursacht werden kann [39]. Die Pigmentierung und das antioxidative Enzym Katalase sind zwei der von *S. aureus* produzierten Schutzfaktoren [39,40], die mit einer guten Überlebensfähigkeit auf unbelebten Oberflächen in Verbindung gebracht werden. Die Expression der Schutzfaktoren von Staphylokokken gegen schädliche Umwelteinflüsse und oxidativen Stress wird durch ein komplexes regulatorisches Netzwerk gesteuert [40]. Auch ohne das Vorhandensein von Umweltstressfaktoren kann dieses Netzwerk unterschiedlich ausbalanciert sein, sodass sich die Expressionsniveaus dieser Schutzfaktoren zwischen den einzelnen Stämmen unterscheiden können.

Bei Wirksamkeitsprüfungen im Rahmen von Zulassungsstudien und Laborexperimenten werden üblicherweise die für das jeweilige Einsatzgebiet des Desinfektionsverfahrens definierten Standardtestorganismen verwendet [25,37]. Laborstämme werden in der Regel unter optimalen Wachstumsbedingungen angezüchtet. Hierbei sind sie normalerweise keinen Umweltstressfaktoren ausgesetzt, sondern haben ein reichhaltiges Angebot an Nährstoffen. Eine verstärkte Expression von Schutzfaktoren oder Ausbildung von Mechanismen zur Anpassung an Stress ist unter diesen Bedingungen nicht anzunehmen. Es ist daher fraglich, ob sich klinische Isolate, welche bereits die Fähigkeit bewiesen haben außerhalb ihres üblichen Habitats zu persistieren, gegenüber UV-C Desinfektion anders verhalten als die Referenzorganismen. Dieses Wissen ist essentiell, damit die Prüfung der Wirksamkeit mit geeigneten repräsentativen Erregern durchgeführt und somit für die Realität relevante Ergebnisse erzielt werden können.

Daher wurde die UV-C Toleranz genetisch verschiedener klinischer *E. faecium* [34] und *S. aureus* [35] Isolate unter standardisierten Bedingungen im Vergleich zu den jeweiligen Standardtestorganismen untersucht. Für die zehn klinischen VRE Isolate wurde bei einer Dosis von 50 mJ/cm<sup>2</sup> eine Reduktion im Bereich von 2,96 bis 4,01 log<sub>10</sub> (Median) erreicht. Bei gleicher Bestrahlungsdosis wurden die untersuchten neun klinischen *S. aureus* Isolate (acht MRSA) um 4,86 bis 5,99 log<sub>10</sub> (Median) reduziert. Die Bestrahlung mit einer Dosis von 22 mJ/cm<sup>2</sup> führte bei beiden Erregern zu einer geringeren Reduktion. Diese betrug bei *E. faecium* zwischen 2,15 und 3,54 log<sub>10</sub> und bei *S. aureus* zwischen 4,68 bis 5,11 log<sub>10</sub>.

Für das Erzielen einer 5 log<sub>10</sub> Reduktion ist gemäß Literaturangaben eine Dosis zwischen 3,7 und 34 mJ/cm<sup>2</sup> für verschiedene *S. aureus* Isolate sowie 15 mJ/cm<sup>2</sup> für VRE erforderlich [14]. In einem durch den Hersteller des Roboters veröffentlichten Leitfaden wird eine Reduktion von 4 log<sub>10</sub> bei einer Dosis von 50 mJ/cm<sup>2</sup> für *E. faecium* und 10,4 mJ/cm<sup>2</sup> für *S. aureus* beschrieben [41]. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Bestrahlungsdosen erfüllen sowohl die gemäß der Literatur als auch nach Herstellerleitfaden erforderlichen Dosen für das Erreichen einer 4 log<sub>10</sub> Reduktion. Während alle getesteten *S. aureus* Isolate bei beiden Bestrahlungsdosen um > 4 log<sub>10</sub> reduziert wurde, konnte dies für die verschiedenen *E. faecium* Isolate nicht beobachtet werden.

Der Vergleich der Ergebnisse dieser Arbeit mit weiteren Publikationen zeigt trotz der Anwendung vergleichbarer Bestrahlungsdosen überwiegend abweichende Reduktionen. Nerandzic *et al.* beobachteten beispielsweise eine mittlere Reduktion von ca. 2,7 bis 3,3 log<sub>10</sub> für verschiedene *S. aureus* Stämme und ca. 3,2 bis 4,4 log<sub>10</sub> für VRE Isolate nach Bestrahlung von artifiziell mit einer bakteriellen Konzentration von 3-5 log<sub>10</sub> kontaminierten Laboroberflächen bei einer UV-C Dosis von 22,000 µWs/cm<sup>2</sup> (entspricht 22 mJ/cm<sup>2</sup>) [42]. Diese Ergebnisse sind für *E. faecium* um bis zu 1 log<sub>10</sub> höher als die im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelten Reduktionen. Die Reduktionen von *S. aureus* hingegen sind im Vergleich deutlich geringer. Jelden *et al.* ermittelten die Wirksamkeit von UV-C in einem realitätsnahen Testsetting, in welchem Oberflächen artifiziell mit MRSA und VRE kontaminiert und in unterschiedlichen Entfernungen zum UV-C Desinfektionsgerät positioniert wurden, sodass jeweils verschiedene UV-C Dosen (0-688 mJ/cm<sup>2</sup>) appliziert wurden [15]. An Positionen mit einer mittleren Bestrahlungsdosis von ca. 9-78 mJ/cm<sup>2</sup>, welche in einem ähnlichen Bereich wie die in der vorliegenden Studie verwendeten UV-C Dosen liegen, wurden mittlere Reduktionen von 3,8 log<sub>10</sub> für VRE und 4,7 log<sub>10</sub> für MRSA festgestellt [15]. Diese für VRE beobachtete mittlere Reduktion ist geringfügig höher als die in der vorliegenden Arbeit bei 22 mJ/cm<sup>2</sup> ermittelten mittleren Reduktionen. Die für MRSA festgestellten Reduktionen liegen in einem vergleichbaren Bereich.

Trotz der Verwendung ähnlicher UV-C Bestrahlungsdosen sind die in der Literatur angegeben, durch Laborexperimente erzielten und die in vorliegender Arbeit ermittelten Reduktion nur un-

zureichend miteinander vergleichbar. Dies ist vor dem Hintergrund der ungenügenden Standardisierung von Wirksamkeitsprüfungen für automatische UV-C Raumdesinfektionsverfahren erklärlich. Während für die Raumdesinfektion mittels Verneblung chemischer Desinfektionsmittel der europäische Standard EN 17272:2020 vorliegt [37], gibt es für die Prüfung der Wirksamkeit von UV-C Desinfektionsverfahren aktuell noch keinen harmonisierten europäischen Normenstandard [18]. Eine erste britische Norm, BS 8628:2022 [19], welche die Anforderungen an die Methodik für die Prüfung der Wirksamkeit von UV-C Geräten behandelt und inhaltlich auf der EN 17272 basiert, ist jedoch kürzlich veröffentlicht worden [18]. Die zum aktuellen Zeitpunkt vorhandenen Daten sind überwiegend noch nicht hierauf basierend ermittelt. Bisher unterlagen Wirksamkeitsprüfungen daher einer Vielzahl unterschiedlicher Testbedingungen. Beispielfähig anzumerken sind unterschiedliche Verfahren der artifiziellen Kontamination von Oberflächen, welche in unterschiedlich hohen bakteriellen Konzentrationen auf der Testoberfläche resultieren, die Verwendung unterschiedlicher Oberflächenmaterialien, die direkte oder indirekte Strahlungsrichtung (Schattenbildung), die verwendeten UV-C Dosen (Abstand Oberfläche zur UV-C Quelle sowie Bestrahlungszeit) sowie die verwendeten Mikroorganismen. Ein unmittelbarer Vergleich der erzielten Reduktionen ist daher schwierig.

Die in der vorliegenden Arbeit unter gleichen Testbedingungen ermittelten Reduktionen zeigen eine höhere UV-C Toleranz von *E. faecium* im Vergleich zu *S. aureus*. Während bei einer UV-C Dosis von 22 mJ/cm<sup>2</sup> für das toleranteste *S. aureus* Isolat bereits eine fast bakterizide Wirksamkeit (4,68 log<sub>10</sub>) erreicht wurde, konnte selbst für das sensibelste *E. faecium* Isolat nur eine Reduktion um 3,54 log<sub>10</sub> beobachtet werden. Ähnliche Ergebnisse erzielten auch Jelden *et al.*, die ebenfalls eine knapp ein log<sub>10</sub> geringere Reduktion von VRE im Vergleich zu MRSA feststellten [15]. Dieses Ergebnis ist aufgrund verschiedener Aspekte zunächst überraschend. *S. aureus* ist mit einer Vielzahl von Schutzfaktoren gegen endogenen und exogenen Stress ausgestattet [39]. Insbesondere die Pigmentierung ist als relevanter Schutz gegenüber Austrocknung, Photosensibilisierung und reaktive Sauerstoffradikale bekannt [39]. Aufgrund des natürlichen Vorkommens auf der menschlichen Haut, wird *S. aureus* natürlicherweise der UV-Strahlung des Umgebungslichtes ausgesetzt. Im Gegensatz hierzu sind Enterokokken in ihrem natürlichen Habitat, dem Darm [43], in der Regel keinem UV Licht ausgesetzt. Vor diesem Hintergrund wäre anzunehmen gewesen, dass *S. aureus* eine höhere Toleranz gegenüber UV-C Strahlung aufweist als *E. faecium*. Andererseits sind Enterokokken aufgrund des dynamischen Umfelds des Gastrointestinaltrakts sehr gut an extreme und schwankende Umgebungsbedingungen angepasst [43]. Dies ermöglicht Enterokokken auch die Kolonisation einer Vielzahl menschlicher Körperstellen [43]. Die Vielzahl und Kombination von vorhandenen Mechanismen gegen exogenen und endogenen oxidativen Stress sowie gegen Stress bedingt durch Schwankungen, z.B. von Temperatur, pH-Wert, Nährstoffgehalt [43], ermöglichen Enterokokken auch in der Umwelt eine hohe Widerstandsfähigkeit. Enterokokken sind zudem fähig Gene

über horizontalen Gentransfer auszutauschen [43]. Für *Enterococcus faecalis* konnte beispielsweise die Erhöhung der UV-C Toleranz durch auf Botenstoffe reagierende Plasmide, welche die Kodierung von *uvr*-Genen bedingen, gezeigt werden [43–45]. Bei zusammenfassender Betrachtung der Vielzahl die Tenazität beeinflussender Mechanismen von Enterokokken, scheint die erhöhte UV-C Toleranz von *E. faecium* gegenüber *S. aureus* plausibel. Welche Faktoren genau die UV-C Toleranz der verschiedenen Erregerspezies beeinflussen, ist nach dem Wissensstand der Autorin noch nicht ausreichend erforscht, könnte aber hilfreiche Erkenntnisse für die Beurteilung der Wirksamkeit von UV-C liefern.

Neben den unterschiedlichen UV-C Toleranzen von *E. faecium* und *S. aureus* zeigte der Vergleich verschiedener klinischer VRE Isolate statistisch signifikant unterschiedliche Reduktionen bei der gleichen Bestrahlungsdosis. Im Gegensatz hierzu konnten beim Vergleich der Reduktionen von klinischen *S. aureus* Isolaten, ausgenommen des Vergleiches des tolerantesten versus des sensibelsten klinischen Isolates, bei beiden Bestrahlungsdosen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Der Vergleich des jeweiligen Standardtestorganismus mit der UV-C Toleranz der klinischen Isolate ergab für *E. hirae* ATCC 10541 bei einer Dosis von 22 mJ/cm<sup>2</sup> einen signifikanten Unterschied im Vergleich zum klinischen Isolat ST1283. Die ermittelten Reduktionen für den Standardtestorganismus *S. aureus* ATCC 6538 waren vergleichbar mit denen der klinischen Isolate.

Aus diesen Ergebnissen kann der Hinweis abgeleitet werden, dass klinische Isolate unter Umständen eine erhöhte UV-C Toleranz aufweisen als Standardtestorganismen. Unter Berücksichtigung der Vielzahl von Regulationsmechanismen, mit welchen beispielsweise *E. faecium* und *S. aureus* zur Anpassung an Stressbedingungen ausgestattet sind, und der Fähigkeit einiger Mikroorganismen zum horizontalen Transfer von Resistenz-kodierenden Plasmiden, ist es nachvollziehbar, dass klinische Isolate, welche einer großen Vielfalt von Umweltfaktoren ausgesetzt sind, unter Umständen toleranter sind als Labortestorganismen. Daher kann es für verschiedene Erregerspezies entscheidend sein, die Wirksamkeit nicht nur gegen Testorganismen zu bestimmen, sondern auch klinische Isolate in die Prüfung der Wirksamkeit einzubeziehen, um relevante und aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten. Um diesbezüglich genauere Erkenntnisse zu erlangen, sollten vergleichbare Laborexperimente mit genetisch verschiedenen klinischen Isolaten und dem jeweiligen Referenzorganismus für bekanntermaßen mit Übertragungen und langer Persistenz auf Oberflächen assoziierten Erregern (u.a. *A. baumannii*, *C. difficile*, *Candida auris*) durchgeführt werden. Da auch das Oberflächenmaterial einen Einfluss auf die Wirksamkeit von UV-C haben kann [16,18], kann die Durchführung dieser Experimente mit verschiedenen krankenhaustypischen Oberflächenmaterialien entscheidende weiterführende Erkenntnisse ermöglichen. Eine zukünftige Berücksichtigung dieser praxisrelevanten Erkenntnisse in den normativen Standards zur Testung der UV-C Desinfektionswirksamkeit ermöglichen repräsentativere Ergebnisse aus Laborexperimenten.

### 1.5.2 Wirksamkeit von UV-C und manueller Desinfektion in der Praxis

Die komplexe Umgebung eines Krankenhauses beinhaltet verschiedene Faktoren, welche die Wirksamkeit von automatischen UV-C Raumdeshinfektionsverfahren beeinflussen. Für das Erreichen einer ausreichenden UV-C Strahlungsdosis und somit Inaktivierung von Mikroorganismen, ist eine direkte Bestrahlung der Oberfläche entscheidend [16,18]. In Schattenbereichen, welche bedingt durch die Raumgeometrie oder das Vorhandensein von Einrichtungsgegenständen entstehen können [21], wird eine direkte Bestrahlung nicht erreicht. Hierdurch wird die auf der Oberfläche erzielte UV-C Dosis und somit die Effektivität reduziert [18]. Zudem kann auf Oberflächen vorhandener Schmutz oder auch das Vorliegen von trockenen Biofilmen als Schutz für darunterliegende Mikroorganismen wirken [16,18,31]. Des Weiteren wird angenommen, dass die Effektivität auch vom Oberflächenmaterial beeinflusst wird [15,18]. Eine hohe Oberflächenrauigkeit und Unregelmäßigkeiten können Schattenbildungen bedingen [18]. Zudem bedeutet eine hohe Rauigkeit eine im Vergleich zu glattem Material vergrößerte effektive Oberfläche, sodass bei solchen Materialien für das Erzielen der gleichen UV-C Dosis ein höherer Energiebedarf notwendig ist [18]. Bei dieser Vielzahl von Faktoren, die je Anwendungsort sehr individuell sind, ist es daher fraglich, ob die in Laborexperimenten nachgewiesenen Wirksamkeiten eine ausreichende Aussagekraft besitzen, um eine Wirksamkeit im praktischen Einsatz anzunehmen.

Die Entwicklung und Durchführung eines reproduzierbaren und aussagekräftigen Testverfahrens zur Überprüfung der Wirksamkeit in der Praxis stellt häufig eine große Herausforderung dar. Für die Gewährleistung von Repräsentativität und Reproduzierbarkeit einer solchen Feldstudie sind natürlich und annähernd gleichmäßig kontaminierte, vergleichbare Oberflächen erforderlich. Zudem sind unbelebte Oberflächen im Krankenhausumfeld im Allgemeinen nur mit einer geringen Keimzahl belastet [3,25,33], sodass die Bewertung anhand logarithmischer Reduktionen nicht möglich und angemessen ist [25].

In der vorliegenden Feldstudie ist es gelungen, geeignete relevante und repräsentative Oberflächen zu identifizieren, welche einer gleichmäßigen täglichen Nutzung mit langen Kontaktzeiten unterliegen. Zudem befinden sich diese in einem klinischen Bereich, in dem Patienten mit einem erhöhten Risiko für den Erwerb einer Kolonisation oder Infektion mit relevanten Infektionserregern behandelt werden. Durch die Auswahl häufiger Handkontaktflächen wurden Oberflächen berücksichtigt, die bei Übertragungen von Erregern Relevanz haben können. Während des Untersuchungszeitraums von insgesamt neun Wochen (Studienphase 1: UV-C Desinfektion, 6 Wochen; Studienphase 2: manuelle Desinfektion, 3 Wochen) konnten auf den Behandlungsliegen vergleichbare Gesamtkeimzahlen von durchschnittlich 23,3 KBE/cm<sup>2</sup> vor der UV-C und 29,7 KBE/cm<sup>2</sup> vor der manuellen Desinfektion ermittelt werden. Hierbei wurde in beiden Studienphasen das Kopfteil als die am stärksten kontaminierte Oberfläche vor der

Desinfektion identifiziert. Dies ist durchaus plausibel, da die Kopflehne einem ständigen direkten Kontakt mit dem Kopf des Patienten ohne Kleidung ausgesetzt ist. Ebenfalls hohe Gesamtkeimzahlen konnten auf dem Bedienteil der Behandlungsliege sowie dem Patientenrufknopf festgestellt werden, während Sitz und Armlehnen weniger kontaminiert waren. Unter Berücksichtigung des häufigen Hautkontaktes von Bedienteil und Patientenrufknopf und dem üblicherweise geringeren direkten von Sitzflächen und Armlehnen scheinen diese Ergebnisse nachvollziehbar. In beiden Studienphasen konnten vergleichbar hohe Mittelwerte der Gesamtkeimzahlen auf den Oberflächen ermittelt werden. Zudem konnte auf den aus krankenhaustypischem Oberflächenmaterial wie beschichteten Kunststoffen und Kunstleder bestehenden Behandlungsliegen häufig sichtbare organische Rückstände wie Blutreste, Hautschuppen und Fett beobachtet werden. Darüber hinaus wurden relevante Erreger wie *E. faecium* und *S. aureus* auf den Oberflächen nachgewiesen. Dieser Nachweis ermöglicht nicht nur die Wirksamkeit hinsichtlich der Reduktion der Gesamtkeimzahl zu beurteilen, sondern auch hinsichtlich der Inaktivierung relevanter krankenhausspezifischer Erreger. Die beschriebenen anspruchsvollen, aber realistischen Bedingungen können daher als geeignet für die Durchführung von Feldstudien zur Beurteilung der Wirksamkeit von Desinfektionsverfahren unter realen Bedingungen bewertet werden.

Um trotz des Vorliegens geringer Gesamtkeimzahlen eine Bewertung der Desinfektionswirksamkeit vornehmen zu können, ist die Definition alternativer Bewertungskriterien erforderlich. Hierfür wird in der DIN EN 14885:2023 ein statistischer Vergleich (Student-*t*-test) der Wirksamkeit eines etablierten Standardprodukts mit dem zu prüfenden neuen Produkt vorgeschlagen, wobei das neue Produkt nicht statistisch signifikant ( $P < 0,05$ ) weniger wirksam sein soll [25]. Da ein nicht signifikanter Unterschied jedoch auch auftreten kann, wenn beide Verfahren gleichermaßen unzureichend wirksam sind, wurde in der vorliegenden Feldstudie ergänzend der Desinfektionserfolg bewertet. Zu diesem Zweck wurde geprüft, ob die Kriterien einer sauberen Oberfläche, Gesamtkeimzahl von  $< 1$  KBE/cm<sup>2</sup> und Abwesenheit von krankenhausspezifischen Infektionserregern, nach der Durchführung der Desinfektion erfüllt wurden. Die im Vergleich zu der üblichen Definition von  $< 2,5$  KBE/cm<sup>2</sup> [46,47] vorgenommene Verschärfung der Anforderung ist damit zu begründen, dass diese Bewertungskriterien üblicherweise für das Monitoring von routinemäßigen Reinigungs- und Desinfektionsprozessen verwendet werden. Hier ist der Einfluss einer möglichen Rekontamination der Fläche durch Mikroorganismen aus der Umwelt oder durch erneuten Handkontakt nach der Desinfektion aufgrund der Zeitspanne zwischen Desinfektion und mikrobiologischer Umgebungsuntersuchung zu beachten. Da die Probenentnahme im Rahmen der Feldstudie unmittelbar nach dem Ende der Einwirkzeit erfolgte, ist dieser Faktor bei der vorliegenden Definition nicht zu berücksichtigen. Durch die Kombination beider Bewertungskriterien wird eine sinnvolle und aussagekräftige Beurteilung

der Desinfektionswirkung in der Realität erzielt. Zusammenfassend ermöglichen die dargestellten Testbedingungen und Kriterien die Überwindung der beschriebenen Herausforderungen bei der Entwicklung und Etablierung von Feldstudien und erlauben die Durchführung repräsentativer und reproduzierbarer Prüfungen der Wirksamkeit von Desinfektionsverfahren in der Krankenhausumgebung.

Zur Beurteilung der Wirksamkeit eines automatischen UV-C Desinfektionsroboters ohne eine vorherige Reinigung im Vergleich zu manueller Wischdesinfektion mit alkoholisch vorgetränkten Wischtüchern (*Wipes*) wurde daher eine Feldstudie unter den beschriebenen Bedingungen durchgeführt [36]. Hierbei konnte die Gesamtkeimzahl durch die UV-C Desinfektion von 23,3 auf 1,98 KBE/cm<sup>2</sup> (Mittelwert) reduziert werden. Im Vergleich hierzu erreichte die manuelle Desinfektion eine Reduktion der Gesamtkeimzahl von 29,7 auf 0,22 KBE/cm<sup>2</sup> (Mittelwert). Die erzielten Reduktionen im Bereich von 0,5 bis 1,2 log<sub>10</sub> lassen sich mit den Ergebnissen weiterer Publikationen vereinbaren. Anderson *et al.* stellten eine Reduktion der Gesamtkeimzahl von 1,07 log<sub>10</sub> nach der Desinfektion mit einem UV-C Gerät ohne vorherige Reinigung fest [48]. Auch Rutala *et al.* beobachteten nach Anwendung eines UV-C Desinfektionsgerätes eine Reduktion von im Mittel 384 auf 19 KBE/ Platte (entspricht 1,3 log<sub>10</sub>) [49]. Ebenfalls lässt sich die unvollständige Inaktivierung von Mikroorganismen nach einer vollumfänglichen alkoholbasierten manuellen Desinfektion, mit den Ergebnissen vorheriger Veröffentlichungen vereinbaren [33,50,51]. Die Beurteilung des Desinfektionserfolges hat ergeben, dass nach der Desinfektion mit UV-C 76 % sowie nach der manuellen Desinfektion 98 % der Oberflächen die Kriterien einer sauberen Oberfläche erfüllten. Der statistische Vergleich der erzielten Reduktionen ergab signifikante Unterschiede zwischen den Desinfektionsverfahren am Kopfende ( $P < 0,01$ ) sowie an der Armlehne rechts ( $P < 0,05$ ). Für die vier weiteren getesteten Oberflächen konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede der Reduktionen festgestellt werden. Hervorzuheben ist, dass auch nach der Desinfektion noch relevante potentielle Infektionserreger auf den Oberflächen festgestellt wurden. Während nach der manuellen Desinfektion weder *S. aureus* noch *E. faecium* nachgewiesen werden konnten, wurde nach der UV-C Desinfektion einmal *E. faecium* und zweimal *S. aureus* festgestellt, wovon ein Isolat eine Methicillin-Resistenz aufwies. Insgesamt deuten diese Ergebnisse auf eine Überlegenheit der manuellen Desinfektion mit vorgetränkten alkoholischen Wischtüchern, vorausgesetzt das Desinfektionsprotokolls wird vollständig eingehalten, gegenüber der automatischen UV-C-Desinfektion ohne vorherige Reinigung hin.

Bei der Beurteilung dieser Ergebnisse sind jedoch verschiedene Aspekte zu berücksichtigen. Die in der Feldstudie von einer einzelnen Person durchgeführte manuelle Desinfektion mit einem geeigneten wirksamen Produkt, unter vollständiger Einhaltung von Einwirkzeit und korrekter Anwendungstechnik, entspricht einer optimalen Desinfektion. Die Umsetzung und Einhaltung dieser Anforderungen im Alltag von Reinigungspersonal ist allerdings aufgrund einer



Vielzahl von Faktoren bekanntermaßen schwierig. Dieses spiegeln auch die Ergebnisse von Untersuchungen zur Überwachung von manuellen Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen mit Fluoreszenzmarkern wider. Hierbei wurden lediglich für 49 % [52] und 63 % [7] der Oberflächen erfolgreiche Desinfektionen gezeigt. Auch bei der mikrobiologischen Untersuchung von Oberflächen nach der manuellen Schlusdesinfektion wurden auf 55 % der Oberflächen weiterhin multiresistente Erreger nachgewiesen [8]. Die Ergebnisse der vorliegenden Feldstudien zeigen, dass unter optimalen Anwendungsbedingungen grundsätzlich eine sehr hohe Wirksamkeit der manuellen Desinfektion erreicht werden kann, diese Ergebnisse in der Routine jedoch regelmäßig nicht erreicht werden.

Bei der Betrachtung der UV-C Desinfektionsleistung ist anzumerken, dass die Testung ohne eine vorherige Reinigung durchgeführt wurde. Dies stellt eine Abweichung von den Empfehlungen für den Einsatz automatischer Desinfektionsverfahren dar [18,21]. Die Empfehlungen für eine vorherige Reinigung basieren wie erwähnt darauf, dass Schmutz und organisches Material auf der Oberfläche die Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln im Allgemeinen, insbesondere aber auch von UV-C Strahlung, verringern [18,21]. Die bei der vorliegenden Feldstudie vorgenommene Abweichung hiervon ist durch die Zielsetzung begründet, die alleinige Wirksamkeit der UV-C Desinfektion in der Realität zu ermitteln. Da mechanisches Wischen im Rahmen einer Reinigung jedoch nicht nur organisches Material, sondern auch Mikroorganismen entfernt [53], wäre durch eine vorherige Durchführung der Reinigung bereits ein Großteil der auf der Oberfläche vorhandenen Mikroorganismen entfernt worden. Eine Beurteilung der alleinigen Desinfektionswirksamkeit von UV-C wäre somit nicht möglich gewesen.

Der Nachweis der relevanten Erreger *S. aureus* und *E. faecium* nach der UV-C Desinfektion ist dennoch durchaus überraschend. Sowohl die Laborexperimente als auch die Feldstudie wurden mit demselben automatischen UV-C Desinfektionsroboter durchgeführt. Basierend auf den Ergebnissen aus den Laborexperimenten, welche auf möglicherweise erhöhte UV-C Toleranzen klinischer Isolate hinweisen, wurden in der Feldstudie deutlich höhere UV-C Bestrahlungsdosen je Desinfektionspunkt verwendet. Somit konnte eine ausreichend wirksame Dosis auf allen Oberflächen angenommen werden. Zudem war die Anzahl von Mikroorganismen auf den natürlich kontaminierten Oberflächen im Vergleich zu den in den Laborexperimenten verwendeten bakteriellen Konzentrationen deutlich geringer. Dennoch wurde eine vollständige Inaktivierung von *S. aureus* und *E. faecium* in der Feldstudie nicht immer erreicht. Dieses Erkenntnis unterstützt die Annahme, dass in Laborexperimenten erzielte Wirksamkeiten unter Umständen nicht auf eine Wirksamkeit in der Realität schließen lassen. Die Notwendigkeit der Durchführung von Feldstudien und Verifizierungsprüfungen im jeweiligen Einsatzbereich vor einer routinemäßigen Nutzung von UV-C Desinfektionsgeräten wird hierdurch weiter untermauert.

Aus den Ergebnissen dieser Feldstudie können entscheidende Erkenntnisse für die Anwendung von UV-C zur Desinfektion im Krankenhausalltag abgeleitet werden. Trotz der Feststellung, dass ohne eine vorherige Reinigung keine vollständige Inaktivierung der auf den Oberflächen vorhandenen Mikroorganismen durch die automatische UV-C Desinfektion erreicht werden konnte, wurde zumindest für 76 % der Oberflächen ein sauberer Zustand erzielt. Im Vergleich zu den Ergebnissen aus Routinemonitorings von manuellen Reinigungs- und Desinfektionsverfahren lässt sich auch bei einem Einsatz ohne vorherige Reinigung zumindest ein leichtes Verbesserungspotential erkennen. Nichtsdestotrotz, insbesondere da eine vollständige Entfernung relevanter nosokomialer Infektionserreger nicht sichergestellt werden konnte, kann ein Ersatz der manuellen Reinigungs- und Desinfektion durch eine automatische UV-C Desinfektion zum aktuellen Zeitpunkt nicht empfohlen werden.

In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen wird in aktuellen Veröffentlichungen zum Einsatz von Automatischen Desinfektionsverfahren die Anwendung von UV-C Desinfektion bisher nur als Zusatz zum manuellen Standardprozedere der Reinigung und Desinfektion vorgesehen [16,21,23]. Bei einer Anwendung als Zusatz ist anzunehmen, dass der Desinfektionserfolg im Vergleich zu den hier erzielten Ergebnissen erhöht werden kann. Diese Annahme konnte durch mehrere Studien bestätigt werden, welche eine zusätzliche Reduktion der mikrobiellen Kontamination auf Oberflächen im Vergleich zu manuellen Routinedesinfektionsmaßnahmen ermittelten [54,55]. Unklar ist nach Kenntnis der Autorin zum jetzigen Zeitpunkt, welche UV-C Desinfektionsleistung erreicht wird, wenn zuvor eine Reinigung ohne die Verwendung von Desinfektionsmitteln durchgeführt wird. Während bei einer Desinfektion mit chemischen Desinfektionsmitteln häufig Desinfektionsmittelrückstände auf den Oberflächen zurückbleiben, ermöglicht die UV-C Bestrahlung eine rückstandsfreie Desinfektion [12,56]. Insbesondere vor dem Hintergrund einer zunehmenden Relevanz von Nachhaltigkeit und Umweltschutz, könnte eine Desinfektion mit UV-C einen relevanten Fortschritt bedeuten. Zur Beantwortung dieser Fragestellung sollten weiterführende Feldstudien zum Vergleich der Wirksamkeit von desinfizierender manueller Reinigung und automatischer UV-C Bestrahlung in Kombination mit vorheriger wasserbasierter manueller Reinigung durchgeführt werden. Hierdurch können hilfreiche Erkenntnisse darüber gewonnen werden, ob ein Ersatz des Standarddesinfektionsverfahrens durch manuelle wasserbasierte Reinigung in Kombination mit UV-C Desinfektion vergleichbare Desinfektionsleistungen ermöglichen.

Auch wenn der Desinfektionsprozess von UV-C Desinfektionsgeräten im Vergleich zu weiteren automatischen Desinfektionsverfahren kurz ist, bedingt eine Nutzung als Zusatz zur manuellen Reinigung immer einen erhöhten Zeitaufwand, wodurch eine Integration in Routineprozesse erschwert wird [56]. Ohnehin besteht aufgrund der Toxizität von UV-C Strahlung [12,16] nur in begrenzten Situationen überhaupt die Möglichkeit eines sinnvollen Einsatzes von solchen au-

tomatischen Verfahren. Eine Anwendung ist nur möglich, wenn keine Personen in den zu desinfizierenden Räumen anwesend sind [18,21,55]. Hierdurch ist ein Einsatz im Rahmen der täglichen Unterhaltsreinigung nicht und aufgrund des überwiegenden Anteils an Mehrbettzimmern auch bei der Entlassungsreinigung einzelner Patienten nur selten möglich. Somit sind die Einsatzmöglichkeiten auf Funktionsbereiche, in welchen außerhalb der primären Behandlungszeiten keine Personen anwesend sind, und auf Einbettzimmer beschränkt, welche nach Entlassungen von Patienten zumindest kurzzeitig die Voraussetzung der Abwesenheit von Personen erfüllen. Der erhöhte Zeitaufwand einer zusätzlichen UV-C Desinfektion ist vor allem aus kaufmännischer Sicht nur schwer zu rechtfertigen, sofern kein erhöhtes Risiko für Übertragungen von Oberflächen besteht. Zumindest für bestimmte Erreger, wie u.a. MRSA, VRE, *C. difficile* und *A. baumannii* konnte ein solch erhöhtes Risiko gezeigt werden [57,58]. Bei der Schlussdesinfektion von Patientenzimmern, die mit diesen Erregern assoziiert sind, ermöglicht ein zusätzlicher Einsatz einer automatischen UV-C Desinfektion den Lückenschluss der unzureichenden manuellen Reinigung und Desinfektion.

Neben dem erhöhten Zeitaufwand sind weitere Aspekte zu berücksichtigen, die eine Integration automatischer UV-C Desinfektionsverfahren in die Routineprozesse der Reinigung und Desinfektion von Oberflächen in Krankenhäusern zu einer Herausforderung werden lassen. Im Wesentlichen besteht die Problematik in der Bedienung der Geräte und Etablierung von Kommunikationswegen. Für den Einsatz solcher Geräte besteht der Bedarf an speziell geschultem Personal [16,56], welches neben der Anwendung und Vorbereitung der zu desinfizierenden Räume auch die Einrichtung solcher Geräte beherrscht. Die hierfür notwendigen Personalressourcen sind in der Regel insbesondere bei Reinigungsdienstleistern nicht vorhanden. Um eine zusätzliche Desinfektion mit UV-C durchführen zu können, ist zudem der Aufbau eines Kommunikationsweges notwendig, der eine schnelle Weitergabe der Information über das Vorliegen einer Indikation zur UV-C Desinfektion ermöglicht. Zum aktuellen Zeitpunkt findet der Informationsaustausch von Stationen und Funktionsbereichen mit dem zuständigen Reinigungsfachpersonal, darüber, wann eine Reinigungs- und Desinfektionsleistung benötigt wird, häufig auf mündlichem Weg statt (persönliche Erfahrungswerte der Autorin). Auch die Beauftragung via Mail oder Fax ist üblich. Die Weitergabe der notwendigen Informationen an die Personen, welche die UV-C Desinfektion vornehmen könnten, bedeutet bei diesen Kommunikationswegen einen erhöhten Aufwand für die beauftragenden Personen. Auch hier besteht ein Mangel an Personalressourcen, sodass die Umsetzung dieses zusätzlichen Kommunikationsschrittes ebenfalls schwierig ist. Hier könnte die Digitalisierung des Beauftragungsprozesses mit einer automatischen Informationsweiterleitung an alle im Reinigungs- und Desinfektionsprozess beteiligten Personen eine Lösung sein. Abschließend sind die Schwierigkeiten der Logistik, wie beispielsweise Organisation eines geeigneten Standortes oder Realisierung möglichst kurzer Fahrzeiten des UV-C Roboters zum Anwendungsort, zu lösen [16], um

eine Integration in die Routineprozesse und einen Einsatz in der Praxis zu ermöglichen. Neben den logistischen Herausforderungen ist auch das Risiko einer schnelleren Alterung und Schädigung von Materialien zu erwähnen [18], welches beim Einsatz von UV-C Desinfektionsgeräten zu berücksichtigen ist.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Durchführung von Feldstudien entscheidend ist, um die Wirksamkeit von UV-C Desinfektionsverfahren in der Realität beurteilen zu können. In der vorliegenden Feldstudie konnte eine Unterlegenheit der automatische UV-C Desinfektion ohne vorherige Reinigung gegenüber der vollständig regelkonformen manuellen Desinfektion mit alkoholgetränkten Tüchern festgestellt werden. In Anbetracht der geringen Desinfektionserfolge in Krankenhäusern bei manuellen Reinigungs- und Desinfektionsprozessen, stellt die Anwendung bedienerunabhängiger UV-C Desinfektionsroboter dennoch ein Verbesserungspotential dar. Insbesondere die Anwendung automatischer UV-C Desinfektionsroboter als Zusatz zur manuellen Reinigung und Desinfektion weist das Potential auf, die bestehenden Lücken aufgrund unzureichender manueller Leistungen zu schließen und somit die Patientensicherheit zu erhöhen.

## 2 Abkürzungsverzeichnis

A <sub>465</sub>	Normalisierte Absorption bei einer Wellenlänge von 465 nm
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
<i>A. baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
<i>C. difficile</i>	<i>Clostridioides difficile</i>
CT	<i>cluster type</i>
DIN	Deutsches Institut für Normung e.V.
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. hirae</i>	<i>Enterococcus hirae</i>
<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
EN	Europäische Norm
<i>et al.</i>	<i>et alia</i> (und andere)
KBE	Koloniebildende Einheiten
KI	Konfidenzintervall
log <sub>10</sub>	dekadischer Logarithmus zur Basis 10
mJ	Millijoule
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MD	Manuelle Desinfektion
RNA	Ribonukleinsäure
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SK	Standardkulturmedium
<i>spp.</i>	<i>species pluralis</i>
ST	<i>sequence types</i>
StO	Standardtestorganismus
t	<i>spa-type</i>
UV-C	Ultraviolett C
UVCD	UV-C Desinfektionsverfahren
VRE	Vancomycin-resistente Enterokokken

### 3 Literaturverzeichnis

- [1] Suetens C, Kärki T, Plachouras D. Point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals: 2016-2017. Stockholm: ECDC; 2023.
- [2] Wißmann JE, Kirchhoff L, Brüggemann Y, Todt D, Steinmann J, Steinmann E. Persistence of Pathogens on Inanimate Surfaces: A Narrative Review. *Microorganisms* 2021;9(2). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020343>.
- [3] Tanner WD, Leecaster MK, Zhang Y, Stratford KM, Mayer J, Visnovsky LD *et al.* Environmental Contamination of Contact Precaution and Non-Contact Precaution Patient Rooms in Six Acute Care Facilities. *Clin Infect Dis* 2021;72(Suppl 1):S8-S16. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1602>.
- [4] Otter JA, Yezli S, Salkeld JAG, French GL. Evidence that contaminated surfaces contribute to the transmission of hospital pathogens and an overview of strategies to address contaminated surfaces in hospital settings. *Am J Infect Control* 2013;41(5 Suppl):S6-11. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2012.12.004>.
- [5] Carling PC. Health Care Environmental Hygiene: New Insights and Centers for Disease Control and Prevention Guidance. *Infect Dis Clin North Am* 2021;35(3):609–29. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2021.04.005>.
- [6] Assadian O, Harbarth S, Vos M, Knobloch JK, Asensio A, Widmer AF. Practical recommendations for routine cleaning and disinfection procedures in healthcare institutions: a narrative review. *J Hosp Infect* 2021;113:104–14. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2021.03.010>.
- [7] Meyer J, Nippak P, Cumming A. An evaluation of cleaning practices at a teaching hospital. *Am J Infect Control* 2021;49(1):40–3. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2020.06.187>.
- [8] Chen LF, Knelson LP, Gergen MF, Better OM, Nicholson BP, Woods CW *et al.* A prospective study of transmission of Multidrug-Resistant Organisms (MDROs) between environmental sites and hospitalized patients-the TransFER study. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2019;40(1):47–52. <https://doi.org/10.1017/ice.2018.275>.
- [9] Wu Y-L, Yang X-Y, Ding X-X, Li R-J, Pan M-S, Zhao X *et al.* Exposure to infected/colonized roommates and prior room occupants increases the risks of healthcare-associated infections with the same organism. *J Hosp Infect* 2019;101(2):231–9. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2018.10.014>.
- [10] Mitchell BG, Hall L, White N, Barnett AG, Halton K, Paterson DL *et al.* An environmental cleaning bundle and health-care-associated infections in hospitals (REACH): a multicentre, randomised trial. *Lancet Infect Dis* 2019;19(4):410–8. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30714-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30714-X).

- [11] Otter JA, Yezli S, Barbut F, Perl TM. An overview of automated room disinfection systems: When to use them and how to choose them. In: Decontamination in Hospitals and Healthcare. Elsevier; 2020, p. 323–369.
- [12] van der Starre CM, Cremers-Pijpers SAJ, van Rossum C, Bowles EC, Tostmann A. The in situ efficacy of whole room disinfection devices: a literature review with practical recommendations for implementation. *Antimicrob Resist Infect Control* 2022;11(1):149. <https://doi.org/10.1186/s13756-022-01183-y>.
- [13] Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Betten in Krankenhäusern (Anzahl und je 100.000 Einwohner, Nutzungsgrad und Fallzahl je Bett) - Berichtsjahr 2021. [September 05, 2023]; Available from: [https://www.gbe-bund.de/gbe/pkg\\_olap\\_tables.prc\\_archiv?p\\_indnr=529&p\\_archiv\\_id=3342972&p\\_sprache=D](https://www.gbe-bund.de/gbe/pkg_olap_tables.prc_archiv?p_indnr=529&p_archiv_id=3342972&p_sprache=D).
- [14] Masjoudi M, Mohseni M, Bolton JR. Sensitivity of Bacteria, Protozoa, Viruses, and Other Microorganisms to Ultraviolet Radiation. *J. RES. NATL. INST. STAN.* 2021;126. <https://doi.org/10.6028/jres.126.021>.
- [15] Jelden KC, Gibbs SG, Smith PW, Hewlett AL, Iwen PC, Schmid KK *et al.* Comparison of hospital room surface disinfection using a novel ultraviolet germicidal irradiation (UVGI) generator. *J Occup Environ Hyg* 2016;13(9):690–8. <https://doi.org/10.1080/15459624.2016.1166369>.
- [16] Mehta I, Hsueh H-Y, Taghipour S, Li W, Saeedi S. UV Disinfection Robots: A Review. *Rob Auton Syst* 2023;161:104332. <https://doi.org/10.1016/j.robot.2022.104332>.
- [17] Scott R, Joshi LT, McGinn C. Hospital surface disinfection using ultraviolet germicidal irradiation technology: A review. *Healthc Technol Lett* 2022;9(3):25–33. <https://doi.org/10.1049/htl2.12032>.
- [18] Demeersseman N, Saegeman V, Cossey V, Devriese H, Schuermans A. Shedding a light on ultraviolet-C technologies in the hospital environment. *J Hosp Infect* 2023;132:85–92. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2022.12.009>.
- [19] Institution BS. Disinfection using ultraviolet radiation. Methods for quantitative testing of automated ultraviolet disinfection activities by direct illumination. Determination of bactericidal, mycobactericidal, sporicidal, yeasticidal, fungicidal, virucidal and phagocidal activities. London: British Standards Institution; 2022.
- [20] Reiss I, Borkhardt A, Füssle R, Sziegoleit A, Gortner L. Disinfectant contaminated with *Klebsiella oxytoca* as a source of sepsis in babies. *Lancet* 2000;356(9226):310. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02509-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02509-5).
- [21] Beswick AJ, Fry C, Bradley CR, Pottage T, Sharpe S, Haill CF *et al.* Automated room decontamination: report of a Healthcare Infection Society Working Party. *J Hosp Infect* 2022;124:97–120. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2022.01.006>.

- [22] Knobling B, Franke G, Klupp EM, Belmar Campos C, Knobloch JK. Evaluation of the Effectiveness of Two Automated Room Decontamination Devices Under Real-Life Conditions. *Front Public Health* 2021;9:618263. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2021.618263>.
- [23] Ramos CCR, Roque JLA, Sarmiento DB, Suarez LEG, Sunio JTP, Tabungar KIB *et al.* Use of ultraviolet-C in environmental sterilization in hospitals: A systematic review on efficacy and safety. *Int J Health Sci (Qassim)* 2020;14(6):52–65.
- [24] Christenson EC, Cronk R, Atkinson H, Bhatt A, Berdiel E, Cawley M *et al.* Evidence Map and Systematic Review of Disinfection Efficacy on Environmental Surfaces in Healthcare Facilities. *Int J Environ Res Public Health* 2021;18(21). <https://doi.org/10.3390/ijerph182111100>.
- [25] Deutsches Institut für Normung e.V. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Anwendung Europäischer Normen für chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika; Deutsche Fassung EN 14885:2022 + AC:2023. Berlin: Beuth Verlag GmbH. <https://doi.org/10.31030/3423025>.
- [26] Jabłońska-Trypuć A, Makuła M, Włodarczyk-Makuła M, Wołejko E, Wydro U, Serra-Majem L *et al.* Inanimate Surfaces as a Source of Hospital Infections Caused by Fungi, Bacteria and Viruses with Particular Emphasis on SARS-CoV-2. *Int J Environ Res Public Health* 2022;19(13). <https://doi.org/10.3390/ijerph19138121>.
- [27] Katzenberger RH, Rösel A, Vonberg R-P. Bacterial survival on inanimate surfaces: a field study. *BMC Res Notes* 2021;14(1):97. <https://doi.org/10.1186/s13104-021-05492-0>.
- [28] Pannu MK, Hudman DA, Sargentini NJ, Singh VK. Role of SigB and Staphyloxanthin in Radiation Survival of *Staphylococcus aureus*. *Curr Microbiol* 2019;76(1):70–7. <https://doi.org/10.1007/s00284-018-1586-x>.
- [29] Pottage T, Macken S, Walker JT, Bennett AM. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* is more resistant to vaporized hydrogen peroxide than commercial *Geobacillus stearothermophilus* biological indicators. *J Hosp Infect* 2012;80(1):41–5. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2011.11.001>.
- [30] Bono N, Ponti F, Punta C, Candiani G. Effect of UV Irradiation and TiO<sub>2</sub>-Photocatalysis on Airborne Bacteria and Viruses: An Overview. *Materials (Basel)* 2021;14(5). <https://doi.org/10.3390/ma14051075>.
- [31] Otter JA, Vickery K, Walker JT, deLancey Pulcini E, Stoodley P, Goldenberg SD *et al.* Surface-attached cells, biofilms and biocide susceptibility: implications for hospital cleaning and disinfection. *J Hosp Infect* 2015;89(1):16–27. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2014.09.008>.



- [32] Uy B, Read H, van de Pas S, Marnane R, Casu F, Swift S *et al.* The efficacy of commercial decontamination agents differs between standardised test settings and research laboratory usage for a variety of bacterial species. *PeerJ* 2022;10:e13646. <https://doi.org/10.7717/peerj.13646>.
- [33] Frickmann H, Bachert S, Warnke P, Podbielski A. Validated measurements of microbial loads on environmental surfaces in intensive care units before and after disinfecting cleaning. *J Appl Microbiol* 2018;124(3):874–80. <https://doi.org/10.1111/jam.13675>.
- [34] Knobling B, Franke G, Belmar Campos C, Büttner H, Christner M, Klupp EM *et al.* Tolerance of clinical vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates against UV-C light from a mobile source. *Antimicrob Resist Infect Control* 2023;12(1):63. <https://doi.org/10.1186/s13756-023-01259-3>.
- [35] Knobling B, Franke G, Carlsen L, Belmar Campos C, Büttner H, Klupp EM *et al.* Phenotypic Variation in Clinical *S. aureus* Isolates Did Not Affect Disinfection Efficacy Using Short-Term UV-C Radiation. *Microorganisms* 2023;11(5). <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051332>.
- [36] Knobling B, Ulatowski A, Franke G, Belmar Campos C, Büttner H, Klupp EM *et al.* Superiority of manual disinfection using pre-soaked wipes over automatic UV-C radiation without prior cleaning. *J Hosp Infect* 2023;140:72–8. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2023.07.017>.
- [37] Deutsches Institut für Normung e.V. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Verfahren zur luftübertragenen Raumdesinfektion durch automatisierte Verfahren – Bestimmung der bakteriziden, mykobakteriziden, sporiziden, fungiziden, levuroziden, viruziden, tuberkuloziden und Phagen-Wirksamkeit; Deutsche Fassung EN 17272:2020. Berlin: Beuth Verlag GmbH. <https://doi.org/10.31030/3071835>.
- [38] Wendt C, Dietze B, Dietz E, Rüden H. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. *J Clin Microbiol* 1997;35(6):1394–7. <https://doi.org/10.1128/jcm.35.6.1394-1397.1997>.
- [39] Gaupp R, Ledala N, Somerville GA. Staphylococcal response to oxidative stress. *Front Cell Infect Microbiol* 2012;2:33. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00033>.
- [40] Jenul C, Horswill AR. Regulation of *Staphylococcus aureus* Virulence. *Microbiol Spectr* 2019;7(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0031-2018>.
- [41] UVD Robots® ApS. THE UVD ROBOTS GUIDE for healthcare associated pathogens. Odense, Denmark; 2020.
- [42] Nerandzic MM, Cadnum JL, Pultz MJ, Donskey CJ. Evaluation of an automated ultraviolet radiation device for decontamination of *Clostridium difficile* and other healthcare-associated pathogens in hospital rooms. *BMC Infect Dis* 2010;10:197. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-10-197>.

- [43] Gaca AO, Lemos JA. Adaptation to Adversity: the Intermingling of Stress Tolerance and Pathogenesis in Enterococci. *Microbiol Mol Biol Rev* 2019;83(3).  
<https://doi.org/10.1128/MMBR.00008-19>.
- [44] Coburn PS, Baghdayan AS, Craig N, Burroughs A, Tendolkar P, Miller K *et al*. A novel conjugative plasmid from *Enterococcus faecalis* E99 enhances resistance to ultraviolet radiation. *Plasmid* 2010;64(1):18–25. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2010.03.001>.
- [45] Ozawa Y, Tanimoto K, Fujimoto S, Tomita H, Ike Y. Cloning and genetic analysis of the UV resistance determinant (*uvr*) encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative plasmid pAD1. *J Bacteriol* 1997;179(23):7468–75.  
<https://doi.org/10.1128/jb.179.23.7468-7475.1997>.
- [46] Dancer SJ. Controlling hospital-acquired infection: focus on the role of the environment and new technologies for decontamination. *Clin Microbiol Rev* 2014;27(4):665–90.  
<https://doi.org/10.1128/CMR.00020-14>.
- [47] Malik RE, Cooper RA, Griffith CJ. Use of audit tools to evaluate the efficacy of cleaning systems in hospitals. *Am J Infect Control* 2003;31(3):181–7.  
<https://doi.org/10.1067/mic.2003.34>.
- [48] Anderson DJ, Gergen MF, Smathers E, Sexton DJ, Chen LF, Weber DJ *et al*. Decontamination of targeted pathogens from patient rooms using an automated ultraviolet-C-emitting device. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2013;34(5):466–71.  
<https://doi.org/10.1086/670215>.
- [49] Rutala WA, Gergen MF, Weber DJ. Room decontamination with UV radiation. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2010;31(10):1025–9. <https://doi.org/10.1086/656244>.
- [50] Wong EK, Burgess BA, Brainard BM, Greene CE, Hurley DJ, Koenig A. The comparative efficacy of disinfectant wipes on common-use computer keyboards in a veterinary teaching hospital. *Can Vet J* 2020;61(1):69–74.
- [51] Cheng KL, Boost MV, Chung JWY. Study on the effectiveness of disinfection with wipes against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and implications for hospital hygiene. *Am J Infect Control* 2011;39(7):577–80. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2010.08.024>.
- [52] Carling PC, Parry MF, Bruno-Murtha LA, Dick B. Improving environmental hygiene in 27 intensive care units to decrease multidrug-resistant bacterial transmission. *Crit Care Med* 2010;38(4):1054–9. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3181cdf705>.
- [53] Dancer SJ, Kramer A. Four steps to clean hospitals: LOOK, PLAN, CLEAN and DRY. *J Hosp Infect* 2019;103(1):e1-e8. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2018.12.015>.
- [54] Rutala WA, Kanamori H, Gergen MF, Knelson LP, Sickbert-Bennett EE, Chen LF *et al*. Enhanced disinfection leads to reduction of microbial contamination and a decrease in patient colonization and infection. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2018;39(9):1118–21.  
<https://doi.org/10.1017/ice.2018.165>.

- [55] Casini B, Tuvo B, Cristina ML, Spagnolo AM, Totaro M, Baggiani A *et al.* Evaluation of an Ultraviolet C (UVC) Light-Emitting Device for Disinfection of High Touch Surfaces in Hospital Critical Areas. *Int J Environ Res Public Health* 2019;16(19).  
<https://doi.org/10.3390/ijerph16193572>.
- [56] Diab-El Schahawi M, Zingg W, Vos M, Humphreys H, Lopez-Cerero L, Fueszl A *et al.* Ultraviolet disinfection robots to improve hospital cleaning: Real promise or just a gimmick? *Antimicrob Resist Infect Control* 2021;10(1):33. <https://doi.org/10.1186/s13756-020-00878-4>.
- [57] Cohen B, Cohen CC, Løyland B, Larson EL. Transmission of health care-associated infections from roommates and prior room occupants: a systematic review. *Clin Epidemiol* 2017;9:297–310. <https://doi.org/10.2147/CLEP.S124382>.
- [58] Carling P. Methods for assessing the adequacy of practice and improving room disinfection. *Am J Infect Control* 2013;41(5 Suppl):S20-5.  
<https://doi.org/10.1016/j.ajic.2013.01.003>.

## 4 Publikationen

- I. Tolerance of clinical vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates against UV-C light from a mobile source

Veröffentlicht in:

Knobling B, Franke G, Belmar Campos C, Büttner H, Christner M, Klupp EM *et al.* Tolerance of clinical vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates against UV-C light from a mobile source. Antimicrob Resist Infect Control 2023;12(1):63. <https://doi.org/10.1186/s13756-023-01259-3>

BRIEF REPORT

Open Access



# Tolerance of clinical vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates against UV-C light from a mobile source

B. Knobling<sup>1</sup>, G. Franke<sup>1</sup>, C. Belmar Campos<sup>1</sup>, H. Büttner<sup>1</sup>, M. Christner<sup>2</sup>, E. M. Klupp<sup>1</sup>, P. M. Maurer<sup>1</sup> and J. K. Knobloch<sup>1\*</sup>

## Abstract

**Background** Admission to a room previously occupied by patients carrying environmentally robust pathogens implies an increased risk of acquiring those pathogens. Therefore, 'No-touch' automated room disinfection systems, including devices based on UV-C irradiation, are discussed to improve terminal cleaning. It is still unclear if clinical isolates of relevant pathogens behave differently under UV-C irradiation compared to laboratory strains used in the approval process of disinfection procedures. In this study we analysed the susceptibility of well characterized clonally divergent vancomycin-resistant enterococci (VRE) strains, including a linezolid-resistant isolate, against UV-C radiation.

**Methods** Susceptibility against UV-C of ten clonally divergent clinical isolates of VRE was determined in comparison to the commonly used test organism *Enterococcus hirae* ATCC 10541. Ceramic tiles contaminated with  $10^5$  to  $10^6$  colony forming units/25 cm<sup>2</sup> of the different enterococci were positioned at a distance of 1.0 and 1.5 m and irradiated for 20 s, resulting in a UV-C dose of 50 and 22 mJ/cm<sup>2</sup>, respectively. Reduction factors were calculated after quantitative culture of the bacteria recovered from treated and untreated surfaces.

**Results** Susceptibility to UV-C varied considerably among the strains studied, with the mean value of the most robust strain being up to a power of ten lower compared to the most sensitive strain at both UV-C doses. The two most tolerant strains belonged to MLST sequence types ST80 and ST1283. The susceptibility of the laboratory strain *E. hirae* ATCC 10541 ranged between the most sensitive and most tolerant isolates for both irradiation doses. However, for UV-C dose of 22 mJ/cm<sup>2</sup>, the reduction of the most tolerant isolate of ST1283 was statistically significantly lower compared to *E. hirae* ATCC 10541. The most susceptible strains belonged to the MLST sequence types ST117 and ST203.

**Conclusions** These results indicate that UV-C doses reported in the literature are sufficient for the reduction of commonly used reference strains of enterococci but could be insufficient for the reduction of tolerant patient VRE-isolates in a hospital setting. Therefore, for future studies, the most tolerant clinical isolates should be used to validate automated UV-C devices or longer exposure times should be expected to ensure efficacy in the real world.

**Keywords** Automatic room decontamination, Disinfection, UV-C, UV-irradiation, vancomycin resistant enterococci

\*Correspondence:  
J. K. Knobloch  
j.knobloch@uke.de

<sup>1</sup>Institute for Medical Microbiology, Virology and Hygiene, Department Infection Prevention and Control, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

<sup>2</sup>Institute for Medical Microbiology, Virology and Hygiene, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany



© The Author(s) 2023. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

## Background

In recent decades, contamination of surfaces in the patient environment as cause for acquisition of nosocomial infections and transmission of pathogens has gained importance. Especially for *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium* and *Clostridioides difficile* survival on inanimate surfaces for days to months is well known [1, 2]. This potential of persistence results in an increased risk of acquiring such nosocomial pathogen if a patient is accommodated in a room, which previously was occupied by an infected or colonized patient [3]. In addition, contaminated inanimate surfaces become relevant for the transmission of pathogens due to failures in the process of surface disinfection and insufficient compliance with hand hygiene [4, 5].

Therefore, automatic room disinfection devices were discussed in the last decade as a possible solution to improve surface disinfection. Due to the safety and operational difficulties in using gaseous procedures or nebulizers, UV-C disinfection has also been evaluated [6–8].

In the case of manually applied liquid disinfectants, a standardized dosage is used, which is usually consistently above the tolerance limits for a wide range of pathogens. The occurring errors in the process of manual room disinfection are mostly due to the difficulty in reaching each surface and ensuring the correct contact time during the process in the complex hospital environment [9]. Rarely, there are also consistent dosing errors of the disinfectant [10]. In contrast, automated room disinfection methods generally do not omit relevant surfaces, but can apply very different, not always predictable, doses of the active ingredient to different surfaces in the room, as recently shown for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nebulizers [11].

UV-C light is known to be an effective disinfectant against a wide range of microorganisms [12]. But to successfully inactivate pathogens on surfaces, pathogen-dependent germicidal UV-C doses are required. However, different values for germicidal activity against the same pathogens are reported in the current literature [13]. These differences are mainly due to varying conditions of testing. For example, many UV-C doses for the inactivation of pathogens are investigated in air or water, which is different compared to the disinfection of dry surfaces [14, 15]. Furthermore, use of different test organisms and strains of the same pathogen may lead to different results [15]. Also, different conditions of test rooms, laboratory or hospital environment, as well as distances and radiation angle can influence the locally reached dose at different room positions and thus the effectiveness of the disinfection process, especially if shadowing is present [16, 17].

In this context, current guidelines for using automated room disinfection systems recommend that users conduct microbiological verification tests in the respective

clinical environment to confirm efficacy [18]. For these efficacy tests, it is important to consider that recent clinical isolates may behave differently compared to laboratory strains, which have been commonly used in the approval process of disinfection procedures or as bio indicators for the control of disinfection processes for decades. This aspect is also considered in the standard procedures for testing chemical disinfectants, as outlined in DIN EN 14885:2019 [19]. The phase 3 testing includes field testing to evaluate the efficacy of new technologies. This involves demonstrating performance under the specific local conditions of the users, using naturally occurring microorganisms [19].

The aim of the following study was to compare the reduction rate of ten different clinical isolates of vancomycin-resistant enterococci (VRE) with *Enterococcus hirae* ATCC 10541, a common test strain used for airborne automatic room disinfection procedures. The comparison was conducted after exposing the samples to UV-C radiation, which the manufacturer specified would achieve a 4 log<sub>10</sub> reduction on surfaces.

## Methods

To investigate the differences in sensitivity of various clinical isolates of vancomycin-resistant enterococci (VRE) to UV-C radiation, ceramic tiles contaminated with ten different VRE were placed at a distance of 1.0 and 1.5 m from the UVD robot model C (UVD Robots, Odense S, Denmark) and irradiated for 20 s. Since the manufacturer specifies an emittance of minimum 2,500 μW/cm<sup>2</sup> at a distance of 1 m, the calculated UV-C irradiation doses were 50 mJ/cm<sup>2</sup> and 22 mJ/cm<sup>2</sup> at distances of 1.0 and 1.5 m, respectively. The achievement of 50 mJ/cm<sup>2</sup> was confirmed in individual experiments by the colour change of a UV-C indicator (UVC Dosimeter™, UVD Robots, Odense S, Denmark).

The classical multilocus sequence typing (MLST) sequence types (ST) as well as the core genome MLST (cgMLST) cluster types (CT) were determined from a large strain collection of clinical VRE isolates with available whole genome using the SeqSphere software (Ridom, Münster, Germany) [20]. Ten isolates with the widest possible genomic distance (different ST and/or CT) were selected for further investigations. The occurrence of resistance genes was determined using ResFinder 4.0 [21] and LRE-Finder 1.0 [22, 23].

For the preparation of standardized contaminated surfaces, suspensions of 1.0–5.0 × 10<sup>8</sup> colony forming units (cfu)/mL were produced for each clinical isolate of VRE. To be representative for realistic protein and dust load of surfaces, 0.3% bovine serum albumin (BSA) solution was used. 20 μL of these suspensions were spread out and dried on ceramic tiles (5 × 5 cm, #3709PN00, Villeroy &

Boch, Mettlach, Germany) resulting in microbial burden of approx.  $10^6$  cfu/25 cm<sup>2</sup> (suppl. Fig. S1).

The surfaces were positioned at a distance of 1.0 and 1.5 m to the UVD robot on a one-meter-high table with a black surface in a 6 m<sup>3</sup> test room with an anteroom. The white wall behind the table was covered by a black surface, so that the scattered light has minimal influence on the reduction. Within the irradiation process, the UVD robot has a 3-minute warm-up phase. To exclude the effect of irradiation during warm-up from the measurement of the reduction, the warm up was performed in the anteroom. Therefore, the robot was set up to automatically enter the test room after warming up in the anteroom and take up position at a distance of 1 or 1.5 m from the surfaces (suppl. Fig. S2).

For each experiment, four surfaces were positioned at both distances. In each case, two of the surfaces were contaminated with the same VRE isolate. The order of the VRE contaminated surfaces at the distance lines on the table were changed between the experiments to ensure that the collected data were not dependent on the position. In addition, for each VRE isolate two contaminated surfaces were positioned outside the treated room as a control. With this setup, the experiment was performed five times for each of the ten VRE isolates.

During the irradiation, the relative humidity and temperature of the room were measured with LogTag Trex-8 (CiK Solutions GmbH, Karlsruhe, Germany) to ensure that these parameters were constant and had no significant influence on the reduction factors.

Following irradiation, bacteria were recovered from treated and untreated surfaces. To do this, surfaces were wiped off in horizontal, vertical and diagonal directions using flocked nylon swabs (eSwab™ Standard, Copan; Brescia, Italy). Next, the swabs were placed in Aimes Medium

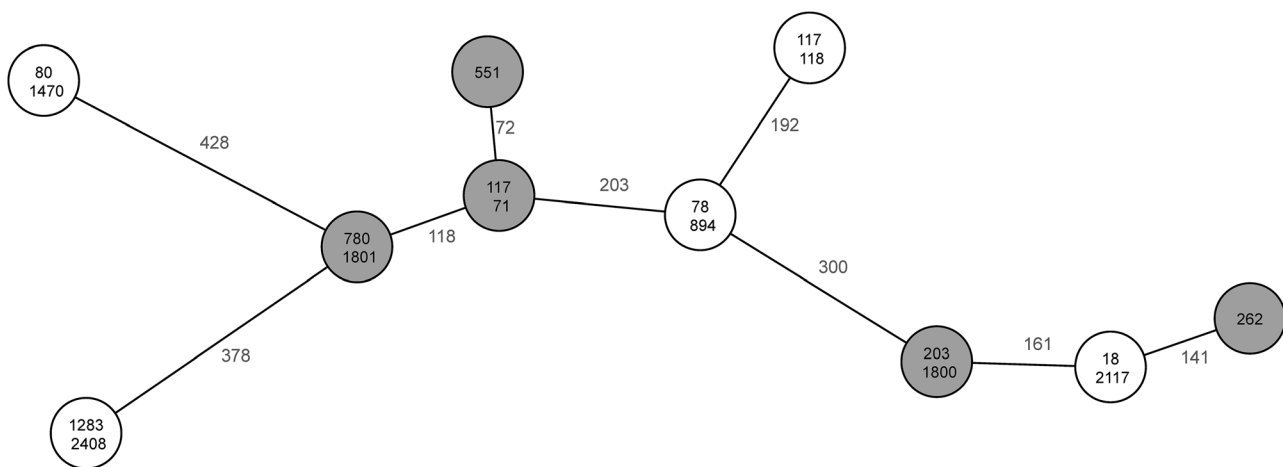
and were vortexed for 30 s to elute the recovered bacteria. Afterwards, 100 µL of Aimes medium were spread on Columbia agar with 5% Sheep Blood (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) to perform quantitative culture in double determination (detection limit 5 cfu/25 cm<sup>2</sup>). Subsequently, the plates were incubated for 18–24 h at 37 °C. Finally, the colony forming units were determined and the mean value of both approaches were calculated.

To calculate the reduction factors, log<sub>10</sub> of the control were subtracted from the log<sub>10</sub> of irradiated surfaces. If there was no detection of bacteria, the log<sub>10</sub> of the control was given as reduction factor, analogue to the specifications in DIN EN 17272:2020 [24].

The differences between the observed reduction factors were statistically analysed by performing one-way ANOVA followed by Tukey post-hoc tests to carry out pairwise comparisons of the groups using R (version 4.0.3) and Rstudio (version 2021.09.1) [25]. Therefore, the R packages *tidyverse*, *ggpubr*, *rstatix*, *psych* and *car* were activated [26–30]. Preliminary tests to check normality assumption (*shapiro\_test*) and variance homogeneity (*residual vs. fits plot*) were performed. A Confidence level of 95% was used. For all analyses, *p*-values less than 0.01 were considered statistically significant for the comparison of individual strains, since a significance level of 95% was not considered sufficiently meaningful due to naturally occurring variations in microbial growth.

## Results

The clinical VRE isolates included in the study showed between 72 and 428 different alleles in cgMLST (Fig. 1). Nine different classical MLST sequence types were represented (ST18, ST80, ST78, ST117, ST203, ST262, ST551, ST780, ST1283), of which the doubly occurring ST117 represented two different cluster types (CT71, CT118) as



**Fig. 1** Minimum spanning tree of the core genome sequences of the investigated isolates. Each circle (node) represents one isolate. The number between the nodes indicates the number of allele differences. The upper numbers in each circle indicate the Sequence type (ST). The lower numbers indicate the Cluster type (CT), if applicable. White or gray nodes represent isolates carrying VanA or VanB resistance determinants, respectively

determined by cgMLST. Five isolates each showed VanA (ST18, ST78, ST80, ST117/CT118, ST1283) or VanB (ST117/CT71, ST203, ST262, ST551, ST780) as resistance mechanism against glycopeptides, respectively. The isolate of ST117/CT71 was reported to be phenotypically resistant against linezolid. Using the LRE-Finder resistance could be genetically confirmed with a wild type/mutant ratio of 57.7/42.3% of the mutation G2576T of the 23 S alleles.

The high contaminated surfaces used for experiments had an average contamination of  $2.3 \times 10^6$  cfu/25 cm<sup>2</sup> (suppl. Fig. S1). Measurement of relative humidity and temperature showed comparative values for all experiments (data not shown). For the UV-C dose of 50 mJ/cm<sup>2</sup> average reductions between 3.09 and 4.27 log<sub>10</sub> were achieved (Fig. 2). VRE ST1283 and ST80 were observed to be the most UV-C tolerant of the tested clinical isolates, only reduced by means of 3.09 (median 3.10, SD 0.385) and 3.12 (median 2.96, SD 0.63) log<sub>10</sub>. The greatest reduction was observed for ST117/CT118, reduced by average 4.27 log<sub>10</sub> (median 4.01, SD 0.82). The common test organism *Enterococcus hirae* ATCC 10541 showed the fourth lowest reduction (mean 3.48 log<sub>10</sub>, median 3.42, SD 0.304).

For the UV-C dose of 22 mJ/cm<sup>2</sup>, the order of the tested clinical isolates slightly changed in terms of the reduction achieved. ST1283 was observed to be the most tolerant isolate with mean reduction of 2.12 log<sub>10</sub> (median 2.15, SD 0.395) followed by ST80 displaying a mean reduction of 2.41 log<sub>10</sub> (median 2.42 log<sub>10</sub>, SD 0.518). An average reduction range of 2.12 to 3.61 log<sub>10</sub> was observed.

One-way ANOVA was conducted to assess if the observed differences in reduction between the ten clinical VRE isolates and the common test organism *E. hirae* ATCC 10541 were statistically significant. The ANOVA was statistically significant for both UV-C doses (50 mJ/cm<sup>2</sup>:  $F(10, 99)=4.702$ ,  $p=1.72 \times 10^{-5}$ , generalized eta squared=0.322; 22 mJ/cm<sup>2</sup>:  $F(10, 99)=6.725$ ,  $p=6.6 \times 10^{-8}$ , generalized eta squared=0.405). Therefore, differences between the tested groups have to be assumed. Subsequent Post-hoc Tukey analyses showed significant differences ( $p<0.01$ ) in reduction for 50 mJ/cm<sup>2</sup> between most tolerant isolates ST80 to most susceptible strain ST117/CT118. In addition, reduction of ST117/CT118 is significantly different to ST1283 and ST262. For UV-C dose 22 mJ/cm<sup>2</sup> statistically significant differences were observed for most tolerant isolate ST1283 to ST780, ST117/CT71, *E. hirae*, ST203 and ST117/CT118. Furthermore, the difference in reduction of the most susceptible strain ST117/CT118 to ST80 and ST262 was statistically significant. The detailed results of Tukey analyses are shown in suppl. Table S3. The difference between the clinical VRE isolates to *E. hirae* ATCC 10541 is statistically significant only compared to ST1283

(-0.961, 95% CI (-1.72 to -0.204),  $p=0.0029$ ) when 22 mJ/cm<sup>2</sup> is applied.

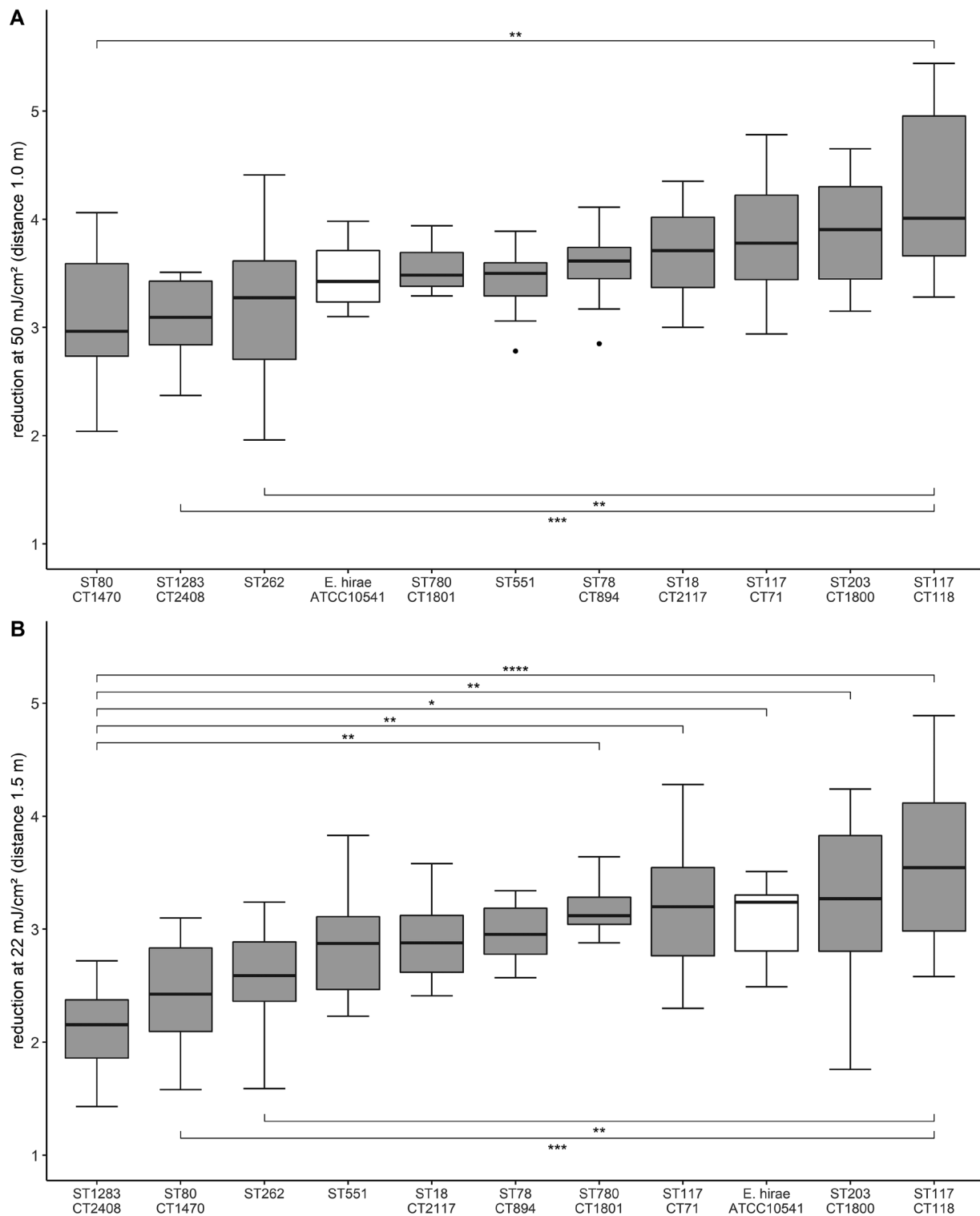
## Discussion

UV-C irradiation of ten highly diverse clinical isolates of vancomycin-resistant enterococci (VRE) and a common test organism *Enterococcus hirae* (*E. hirae*) ATCC 10541 showed differences in log<sub>10</sub> reduction between the tested isolates. For the most tolerant isolate only an average log<sub>10</sub> reduction of 3.09 and 2.12 was observed at 50 and 22 mJ/cm<sup>2</sup> UV-C irradiation, respectively, in comparison to the most susceptible one, which showed 4.01 and 3.61 log<sub>10</sub>. The statistical analysis revealed significant differences in the observed reductions between the most tolerant and most susceptible strains. Interestingly, the reduction of clinical isolate ST1283 is significantly lower compared to *E. hirae* ATCC 10541, when applying UV-C dose of 22 mJ/cm<sup>2</sup>, indicating that this strain is insufficiently representative of particularly tolerant strains. This is especially important because, in contrast to wipe disinfection with a standardized concentration of the active ingredient, automated room disinfection processes apply a broad dose spectrum of the respective active principle to different surfaces in the room. For the linezolid-resistant VRE ST117/CT71, neither an increased nor a decreased reduction could be observed compared to the other VRE isolates. Therefore, it can be assumed that linezolid resistance has no effect on UV-C tolerance.

Current literature indicates that the UV-C dose required to inactivate bacteria depends on several factors such as type of organism, medium and surface area [17]. For the inactivation of *Enterococcus faecium* on solid surfaces, the manufacturer specifies a dose of 50 mJ/cm<sup>2</sup>, which should be reached with an exposure time of 18.5 s at a distance of 1 m to achieve a reduction of 4 log<sub>10</sub> [31]. However, this value was derived from laboratory experiments. For the experiments carried out in this study, UV-C doses analogous to the manufacturer's specifications were used and contaminated surfaces were positioned horizontal but in direct line to the UV-C light source. Under these conditions, the indicated reduction of 4 log<sub>10</sub> was not achieved in either tested *E. hirae* or clinical isolates of VRE, although horizontally placed UV indicators showed the achievement of the desired dose. This is consistent with the observation made with other methods of room disinfection that, in realistic testing, the dose to be applied must be higher compared to the doses of the disinfection product recommended by the manufacturer and defined in the context of approval studies [11].

Nerandzic et al. observed a mean reduction for clinical strains of VRE on benchtop surfaces in a range of approx. 3.2 to 4.4 log<sub>10</sub> using an UV-C dose of 22 mJ/cm<sup>2</sup> [15]. Mahida et al. also reported a mean reduction of clinical VRE strains seeded on petri dishes greater 4 log<sub>10</sub> applying 22 mJ/cm<sup>2</sup>





**Fig. 2** Reduction of different clinical VRE isolates with UV-C doses of 50 **(A)** and 22 mJ/cm<sup>2</sup> **(B)**. The boxplots represent the reduction factors determined per tested VRE isolate (n = 10) and test organism *E. hirae* ATCC 10541 in 5 independent experiments, comparing microbial load on ceramic tiles before and after UV-C radiation with 50 **(A)** and 22 mJ/cm<sup>2</sup> **(B)**. Boxplots are in ascending order by median. Statistically significant results (p < 0.01) of pairwise Tukey post-hoc analysis are connected by brackets. Non-significant comparisons are not shown. The p-values are displayed as follows: p < 0.01 = \*, p < 0.001 = \*\*, p < 0.0001 = \*\*\*, and p < 0.00001 = \*\*\*\*

in direct line [32]. Finally, Jelden *et al.* detected an average reduction range of 3.8 to 4.9  $\log_{10}$  for vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 on different surface material, using partially much higher UV-C doses in a range of mean 9 to 688  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  [17]. In our study, we observed a mean reduction range of 2.12 to 3.61  $\log_{10}$  for the ten investigated VRE isolates when using the direct radiation dose of 22  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  to disinfect the contaminated ceramic tiles. The observed reductions were up to 1  $\log_{10}$  lower than the given literature values.

Nerandzic *et al.* studied three different clinical VRE strains, of which two were VanA and one VanB positive isolates. The obtained results indicated differences in reduction rates of these. While the Van B VRE isolate was reduced just above 3  $\log_{10}$ , the Van A isolates showed reduction from approx. 3.75 up to just under 4.5  $\log_{10}$  [15]. The observed differences between the most tolerant and the most susceptible VRE isolate are in a range of  $>1 \log_{10}$ . A comparable range was determined in the present study. However, no correlation of more or less susceptibility depending on resistance mechanism against glycopeptides could be observed. The strain with genetically confirmed resistance against glycopeptides displayed no significant differences compared to the laboratory strain *E. hirae* ATCC 10541, whereas a significantly higher reduction was observed for the low radiation dose compared to the most tolerant isolate. This data indicates that mutations in the 23 S alleles do not interfere with the behavior towards UV-C radiation. Both previous data and the results obtained in this study support the recommendation of Beswick *et al.* to conduct tests in the intended clinical environment to verify the efficacy of disinfection methods [18]. This is particularly crucial because manufacturers' specifications may not provide sufficient guidance to achieve bactericidal efficacy against clinical isolates, which may exhibit higher tolerance than the test organism. Moreover, variations in room conditions, surface materials and shadowing can influence the required UV-C dose for effective disinfection, as evidenced by the previously described differences in reduction at the same UV-C dose. The standard procedure for testing chemical disinfectants, as defined by DIN EN 14885:2019, stipulates a consistent concentration of the active ingredient to guarantee effective disinfection. However, determining a minimum efficacy dose for UV-C is not as straightforward. Consequently, it is advisable to conduct a phase 3 test for automated UV-C disinfection processes to validate their efficacy in routine use across diverse hospital settings. In this regard, more tolerant clinical isolates should be used in the future.

The following limitations of the present study should be noted: Firstly, the experiments were performed with only one standard material. Since several studies show differences depending on surface material (e.g. [17]), further experiments should be performed with other surface materials frequently used in the clinical environment. In addition,

it should be noted that there were slight deviations in the disinfection position as part of the robot's automated travel process. The resulting variation in the source to surface distances could have led to slightly different UV-C doses between the experiments. Furthermore, it has to be taken into account that the experiments were conducted with very high surface contaminations in order to enable calculation of reduction efficacy over a range of several  $\log_{10}$  reduction. However, realistic contamination of surfaces, even in hospital environments, is much lower [33, 34], so that the disinfection procedure could be effective even if the bactericidal efficacy is not reached. Finally, despite the use of the most diverse VRE isolates as possible, it cannot be excluded that isolates with even higher tolerance to UV-C radiation exist in clinical practice.

## Conclusion

Since manual cleaning and disinfection are frequently inadequate to remove pathogens on surfaces completely, automatic room decontamination with UV-C radiation could be a suitable method to increase efficacy of surface disinfection. However, before using it routinely, efficacy verification is recommended. Testing the efficacy of UV-C radiation for ten different whole-genome-sequenced clinical isolates of VRE as well as ATCC 10541 test organism *Enterococcus hirae*, showed differences in reduction. Use of UV-C radiation according to manufacturer's instructions did not achieve the proposed reduction. In addition, some clinical isolates of VRE are more stable against UV-C radiation than the common test organism. Therefore, to establish the use of such devices, additional efficacy tests in hospital environments using clinical isolates should be performed.

## Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s13756-023-01259-3>.

Supplementary Material 1

Supplementary Material 2

Supplementary Material 3

## Acknowledgements

We thank Rieke Hinrichs for excellent technical assistance. We acknowledge financial support from the Open Access Publication Fund of UKE - Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf and DFG - German Research Foundation.

## Author contributions

JK and BK conceived and planned the experiment, in consultation with MC. BK and JK carried out the experiments. GF, JK, EK, HB, CBC, PM and BK analysed the data and interpreted the results. BK performed the statistical analysis of the data. BK and JK prepared the original draft of manuscript in consultation with GF, CBC, EK, MC, HB, PM and GF substantively revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## Funding

Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL. UVD-Robots enables a free exchange of UVD robot model B to model C.

### Data Availability

The datasets used and/or analysed during this study are included in this published article and its supplementary information files, further inquiries can be directed to the corresponding author.

### Declarations

#### Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

#### Consent for publication

Not applicable.

#### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 29 September 2022 / Accepted: 29 May 2023

Published online: 04 July 2023

### References

1. Wißmann JE, Kirchhoff L, Brüggemann Y, Todt D, Steinmann J, Steinmann E. Persistence of pathogens on Inanimate Surfaces: a narrative review. *Microorganisms*. 2021. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020343>.
2. Kramer A, Assadian O. Survival of microorganisms on Inanimate Surfaces. In: Borkow G, editor. *Use of Biocidal Surfaces for reduction of Healthcare Acquired Infections*. Cham: Springer International Publishing; 2014. pp. 7–26. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-08057-4\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-08057-4_2).
3. Mitchell BG, Dancer SJ, Anderson M, Dehn E. Risk of organism acquisition from prior room occupants: a systematic review and meta-analysis. *J Hosp Infect*. 2015;91:211–7. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2015.08.005>.
4. Carling P. Methods for assessing the adequacy of practice and improving room disinfection. *Am J Infect Control*. 2013;41:20–5. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2013.01.003>.
5. FitzGerald G, Moore G, Wilson APR. Hand hygiene after touching a patient's surroundings: the opportunities most commonly missed. *J Hosp Infect*. 2013;84:27–31. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2013.01.008>.
6. Kanamori H, Rutala WA, Gergen MF, Sickbert-Bennett EE, Nelson LP, Anderson DJ, et al. Microbial Assessment of Health Care-Associated Pathogens on various environmental Sites in patient rooms after terminal room disinfection. *Open Forum Infect Dis*. 2021;8:ofab008. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofab008>.
7. Anderson DJ, Gergen MF, Smathers E, Sexton DJ, Chen LF, Weber DJ, Rutala WA. Decontamination of targeted pathogens from patient rooms using an automated ultraviolet-C-emitting device. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2013;34:466–71. <https://doi.org/10.1086/670215>.
8. Astrid F, Beata Z, van den Nest M, Julia E, Elisabeth P, Magda D-E. The use of a UV-C disinfection robot in the routine cleaning process: a field study in an academic hospital. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2021;10:84. <https://doi.org/10.1186/s13756-021-00945-4>.
9. Otter JA, Yezli S, Barbut F, Perl TM. An overview of automated room disinfection systems: When to use them and how to choose them. In: *Decontamination in Hospitals and Healthcare*; Elsevier; 2020. p. 323–369. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102565-9.00015-7>.
10. Reiss I, Borkhardt A, Füssle R, Sziegoleit A, Gortner L. Disinfectant contaminated with *Klebsiella oxytoca* as a source of sepsis in babies. *The Lancet*. 2000;356:310. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02509-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02509-5).
11. Knobling B, Franke G, Klupp EM, Belmar Campos C, Knobloch JK. Evaluation of the effectiveness of two automated Room Decontamination Devices under Real-Life conditions. *Front Public Health*. 2021;9:618263. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2021.618263>.
12. Bono N, Ponti F, Punta C, Candiani G. Effect of UV irradiation and TiO<sub>2</sub>-Photocatalysis on Airborne Bacteria and viruses: an overview. *Mater (Basel)*. 2021. <https://doi.org/10.3390/ma14051075>.
13. Masjoudi M, Mohseni M, Bolton JR. Sensitivity of Bacteria, Protozoa, Viruses, and other microorganisms to Ultraviolet Radiation. *J RES NATL INST STAN*. 2021. <https://doi.org/10.6028/jres.126.021>.
14. McKinney CW, Pruden A. Ultraviolet disinfection of antibiotic resistant bacteria and their antibiotic resistance genes in water and wastewater. *Environ Sci Technol*. 2012;46:13393–400. <https://doi.org/10.1021/es303652q>.
15. Nerandzic MM, Cadnum JL, Pultz MJ, Donskey CJ. Evaluation of an automated ultraviolet radiation device for decontamination of *Clostridium difficile* and other healthcare-associated pathogens in hospital rooms. *BMC Infect Dis*. 2010;10:197. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-10-197>.
16. Boyce JM, Farrel PA, Towle D, Fekieta R, Aniskiewicz M. Impact of Room Location on UV-C irradiance and UV-C dosage and Antimicrobial Effect delivered by a Mobile UV-C light device. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2016;37:667–72. <https://doi.org/10.1017/ice.2016.35>.
17. Jelden KC, Gibbs SG, Smith PW, Hewlett AL, Iwen PC, Schmid KK, Lowe JJ. Comparison of hospital room surface disinfection using a novel ultraviolet germicidal irradiation (UVGI) generator. *J Occup Environ Hyg*. 2016;13:690–8. <https://doi.org/10.1080/15459624.2016.1166369>.
18. Beswick AJ, Fry C, Bradley CR, Pottage T, Sharpe S, Hail CF, et al. Automated room decontamination: report of a Healthcare Infection Society Working Party. *J Hosp Infect*. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2022.01.006>.
19. Deutsches Institut für Normung e.V. Chemical disinfectants and antiseptics - application of European Standards for chemical disinfectants and antiseptics; German version EN 14885:2018. Berlin: Beuth Verlag GmbH. doi:<https://doi.org/10.31030/3085857>.
20. de Been M, Pinholt M, Top J, Bletz S, Mellmann A, van Schaik W, et al. Core Genome Multilocus sequence typing Scheme for High-Resolution typing of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol*. 2015;53:3788–97. <https://doi.org/10.1128/JCM.01946-15>.
21. Bortolaia V, Kaas RS, Ruppe E, Roberts MC, Schwarz S, Cattoir V, et al. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *J Antimicrob Chemother*. 2020;75:3491–500. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa345>.
22. Clausen PTLC, Aarestrup FM, Lund O. Rapid and precise alignment of raw reads against redundant databases with KMA. *BMC Bioinformatics*. 2018;19:307. <https://doi.org/10.1186/s12859-018-2336-6>.
23. Hasman H, Clausen PTLC, Kaya H, Hansen F, Knudsen JD, Wang M, et al. LRE-Finder, a web tool for detection of the 23S rRNA mutations and the *opraA*, *cfp*, *cfp(B)* and *poxA* genes encoding linezolid resistance in enterococci from whole-genome sequences. *J Antimicrob Chemother*. 2019;74:1473–6. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz092>.
24. Deutsches Institut für Normung e.V. Chemical disinfectants and antiseptics - methods of airborne room disinfection by automated process - determination of bactericidal, mycobactericidal, sporicidal, fungicidal, yeasticidal, virucidal and phagocidal activities; German version EN 17272:2020. Berlin: Beuth Verlag GmbH. doi:<https://doi.org/10.31030/3071835>.
25. R Core Team. R: a Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2020.
26. Wickham H, Averick M, Bryan J, Chang W, McGowan L, François R, et al. Welcome to the Tidyverse. *JOSS*. 2019;4:1686. <https://doi.org/10.21105/joss.01686>.
27. Alboukadel Kassambara. ggpubr: ggplot2? Based Publication Ready Plots; 2020.
28. Alboukadel Kassambara. rstatix: Pipe-Friendly Framework for Basic Statistical Tests; 2021.
29. William Revelle. *Psych: procedures for psychological, psychometric, and Personality Research*. Evanston, Illinois: Northwestern University; 2021.
30. John Fox and Sanford Weisberg. *An R companion to Applied Regression*. Thousand Oaks CA: Sage; 2019.
31. UVD Robots® ApS. *The UVD Robots Guide for healthcare associated pathogens*. Odense, Denmark; 04.2021.
32. Mahida N, Vaughan N, Boswell T. First UK evaluation of an automated ultraviolet-C room decontamination device (Tru-D™). *J Hosp Infect*. 2013;84:332–5. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2013.05.005>.
33. Shams AM, Rose LJ, Edwards JR, Cali S, Harris AD, Jacob JT, et al. Assessment of the overall and multidrug-resistant organism Bioburden on Environmental Surfaces in Healthcare Facilities. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2016;37:1426–32. <https://doi.org/10.1017/ice.2016.198>.
34. van Arkel A, Willemsen I, Kluytmans J. The correlation between ATP measurement and microbial contamination of inanimate surfaces. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2021;10:116. <https://doi.org/10.1186/s13756-021-00981-0>.

### Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## II. Phenotypic Variation in Clinical *S. aureus* Isolates Did Not Affect Disinfection Efficacy Using Short-Term UV-C Radiation

Veröffentlicht in:

Knobling B, Franke G, Carlsen L, Belmar Campos C, Büttner H, Klupp EM *et al.* Phenotypic Variation in Clinical *S. aureus* Isolates Did Not Affect Disinfection Efficacy Using Short-Term UV-C Radiation. *Microorganisms* 2023;11(5). <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051332>



## Article

# Phenotypic Variation in Clinical *S. aureus* Isolates Did Not Affect Disinfection Efficacy Using Short-Term UV-C Radiation

Birte Knobling, Gefion Franke , Laura Carlsen, Cristina Belmar Campos, Henning Büttner , Eva M. Klupp, Philipp Maximilian Maurer and Johannes K. Knobloch \*

Department Infection Prevention and Control, Institute for Medical Microbiology, Virology and Hygiene, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistraße 52, 20246 Hamburg, Germany; b.knobling@uke.de (B.K.); la.carlsen@uke.de (L.C.); p.maurer@uke.de (P.M.M.)

\* Correspondence: j.knobloch@uke.de; Tel.: +49-40-741051494

**Abstract:** Pigmentation, catalase activity and biofilm formation are virulence factors that cause resistance of *Staphylococcus aureus* to environmental stress factors including disinfectants. In recent years, automatic UV-C room disinfection gained greater importance in enhanced disinfection procedures to improve disinfection success in hospitals. In this study, we evaluated the effect of naturally occurring variations in the expression of virulence factors in clinical *S. aureus* isolates on tolerance against UV-C radiation. Quantification of staphyloxanthin expression, catalase activity and biofilm formation for nine genetically different clinical *S. aureus* isolates as well as reference strain *S. aureus* ATCC 6538 were performed using methanol extraction, a visual approach assay and a biofilm assay, respectively. Log<sub>10</sub> reduction values (LRV) were determined after irradiation of artificially contaminated ceramic tiles with 50 and 22 mJ/cm<sup>2</sup> UV-C using a commercial UV-C disinfection robot. A wide variety of virulence factor expression was observed, indicating differential regulation of global regulatory networks. However, no direct correlation with the strength of expression with UV-C tolerance was observed for either staphyloxanthin expression, catalase activity or biofilm formation. All isolates were effectively reduced with LRVs of 4.75 to 5.94. UV-C disinfection seems therefore effective against a wide spectrum of *S. aureus* strains independent of occurring variations in the expression of the investigated virulence factors. Due to only minor differences, the results of frequently used reference strains seem to be representative also for clinical isolates in *S. aureus*.

**Keywords:** pigmentation; catalase activity; biofilm; UV-C; disinfection; tolerance



**Citation:** Knobling, B.; Franke, G.; Carlsen, L.; Belmar Campos, C.; Büttner, H.; Klupp, E.M.; Maurer, P.M.; Knobloch, J.K. Phenotypic Variation in Clinical *S. aureus* Isolates Did Not Affect Disinfection Efficacy Using Short-Term UV-C Radiation. *Microorganisms* **2023**, *11*, 1332. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051332>

Academic Editor: Brian Crook

Received: 22 April 2023

Revised: 10 May 2023

Accepted: 16 May 2023

Published: 18 May 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Multidrug resistance has increased worldwide and is considered a threat to public health. Several recent investigations have reported the emergence of multidrug-resistant (MDR) bacterial pathogens from different origins, which increase the necessity of the proper use of antibiotics and effective disinfectants [1,2]. Routine susceptibility testing against antibiotics as well as disinfectants of emerging MDR strains is required to optimize infection prevention.

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), defined as multidrug-resistant [3], is still one of the common pathogens causing healthcare-acquired infection, although the overall proportion of methicillin resistance within clinical *S. aureus* isolates has decreased in recent years [4]. In addition to the classical healthcare-associated MRSA (HA-MRSA), clones that spread in the community (CA-MRSA) or are acquired by contact with livestock (LA-MRSA) have also emerged outside hospitals in the past [5]. As a colonizer, *S. aureus* is part of the normal human skin flora, but it can also cause a variety of infectious diseases, ranging from mild skin infections to deadly infections such as pneumonia and sepsis. Antibiotic therapy of *S. aureus* infections can, besides methicillin resistance, be affected by different resistance mechanisms. *S. aureus* can produce a particularly high number of different toxins and other virulence factors [6].

Among other aspects, the high tenacity with long survival time of *S. aureus* on inanimate surfaces is a relevant cause for frequent detection in the environment surrounding patients [7]. This has recently been demonstrated in studies investigating MRSA on surfaces in patient rooms occupied by colonized or infected patients, which found up to 40% [8,9] of surfaces contaminated. Furthermore, a recent investigation using fluorescent marker technology to verify compliance with cleaning and disinfection processes found that only 63% of surfaces were adequately cleaned [10]. In addition, measuring aerobic colony counts, Chen et al. determined 18.8% of surfaces to be contaminated by MRSA even after manual terminal disinfection of patient rooms [11]. Subsequent patients were at increased risk of acquiring nosocomial infection or new emerging colonization if a patient infected or colonized with MRSA or other environmentally stable pathogens had previously been cared for in the room [12,13]. The probable cause for this could be insufficient manual cleaning and disinfection.

Due to inadequate manual disinfection processes, an increasing number of different enhanced disinfection procedures have been established to improve room disinfection efficacy. One common autonomous disinfection procedure is radiation with high energetic short-wave ultraviolet light (UV-C). The high effectiveness of UV-C radiation in reducing a wide range of microorganisms, including MRSA, has been demonstrated, although predominantly in experimental studies [14,15]. As known for conventional chemical disinfectants, in vitro efficacy can vary greatly from real-world disinfection in a complex hospital setting depending on factors such as surface area, disinfectant concentration, contact time and type of microorganism [16]. Until now, mainly representative laboratory and test strains have been used for testing disinfection procedures. These standard test organisms used as reference strains may behave differently to disinfectants than the wide variety of bacterial clones found in the hospital environment. This fact is now taken into account in the European standard for testing chemical disinfectants by proposing experiments using naturally occurring pathogens under usual conditions of use [17].

It has been shown that damage to DNA, RNA and proteins is the main effect of inactivation of pathogens by UV-C radiation [18]. In defence against this and against treatment with antibiotics, *S. aureus* has various DNA repair mechanisms such as photoreactivation by DNA photolyase enzymes and mechanisms of detoxification [18]. Therefore, it can be assumed that these could influence the tolerance to UV-C. In addition, *S. aureus* is known to be equipped with various virulence factors that induce distinctive protective properties [19]. Golden pigment, contributed by the carotenoid staphyloxanthin [20], and catalase, which is a ubiquitous antioxidant enzyme [21], are two of those virulence factors produced by *S. aureus* that are associated with survival on inanimate surfaces. Additionally, the expression of extracellular polysaccharides acting as intercellular adhesins and mediating the capacity to form multi-layered biofilms on inanimate surfaces might add to protection against environmental stress factors.

In a comparison of wild-type *S. aureus* with strong staphyloxanthin expression and *crt*-mutants with severely reduced staphyloxanthin production, the mutant strain has been shown to be more susceptible to UV-C radiation [19]. This suggests that the production of staphyloxanthin and therefore pigmentation could have an influence on the tolerance of *S. aureus* to UV-C radiation.

The production of catalase has been shown to be a relevant protector against hydrogen peroxide, which is a common component of immune defence but also a relevant disinfectant in the hospital environment [21]. The protective properties of catalase were supported by a recent study showing increased resistance of *S. aureus* to vaporized hydrogen peroxide compared to the biological indicator organism *Geobacillus stearothermophilus* [22]. Pottage et al. suspected the catalase activity as a possible cause [22]. The damage of microorganisms by UV-C radiation is based, among other mechanisms, on reactive oxygen species produced during absorption [23]. Since catalase is able to degrade these, differences in the ability of clinical *S. aureus* isolates to produce catalase could lead to differences in UV-C tolerance.

It is known that bacterial biofilms survive more effectively on environmental surfaces and are more tolerant to disinfection than planktonic bacteria [24]. The production of extracellular polymeric substances enables the protection of bacteria within the biofilm from direct contact with disinfectants [24]. This shielding has also been reported in UV-C disinfection as a reason why biofilms displayed greater tolerance to UV-C than planktonic cells [25,26]. As it has been shown that biofilms on surfaces in the hospital environment frequently contain *S. aureus* [27], variations in the capacity of *S. aureus* to form biofilms could have an influence on the UV-C tolerance. Biofilm formation in staphylococci is mediated predominantly by the expression of the polysaccharide intercellular adhesin (PIA), also known as poly-N-acetyl- $\beta$ -(1-6)-glucosamine (PNAG) in *S. aureus* [28], mediating cell-to-cell adhesion after primary attachment to inanimate surfaces [29]. PIA/PNAG is synthesized by the gene products of the *icaADBC* gene cluster [29]. Interestingly, in contrast to *Staphylococcus epidermidis*, which frequently lacks this operon, in *S. aureus* the *icaADBC* operon could be suggested as part of the core genome [30]. However, despite the presence of *icaADBC*, not all *S. aureus* strains display a biofilm-positive phenotype under conditions in which *icaADBC*-positive *S. epidermidis* strongly express PIA synthesis [30], indicating a differential regulation of the PIA/PNAG synthesis between these species [29].

The relative impact of catalase formation, pigmentation and biofilm formation on tolerance to automatic room disinfection procedures using UV-C radiation is of great relevance. Especially because there is no standardised test procedure for evaluating UV-C disinfection efficacy so far [31], this knowledge is essential in order to perform recommended implementation investigations with representative pathogens in the area of use [32].

Therefore, the aim of the study was to assess a possible connection between staphyloxanthin production, catalase expression and biofilm formation with the level of UV-C tolerance in *S. aureus*. For this, well-characterized genetically distinct clinical *S. aureus* isolates were compared to the standard test organism ATCC 6538 used for normative testing of disinfection procedures. UV-C susceptibility was measured under reality-simulating test conditions in order to be able to derive a conclusive value for the application in the hospital setting.

## 2. Materials and Methods

All *S. aureus* isolates used were identified in routine diagnostics using MALDI TOF mass spectrometry and the MALDI Biotyper<sup>®</sup> database (Bruker, Bremen, Germany), and antimicrobial susceptibility testing was performed using a VITEK instrument (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). The species was confirmed, and strains were further characterised by whole genome sequencing with subsequent genomic analysis as described recently [33]. From a large strain collection, eight different clinical MRSA isolates including clones, which are described in the international literature (e.g., [5,34]) as HA-MRSA (ST5/t010, ST8/t024, ST22/t223, ST45/t015), CA-MRSA (ST30/t300, ST59/t216), and LA-MRSA (ST1/t127, ST398/t034), and a low pigmented clinical methicillin-susceptible *S. aureus* isolate (MSSA ST45/unknown spa-type) were selected. These clinical isolates, as well as the standard test organism *S. aureus* ATCC 6538 (ST464/t3297), were investigated under standardized conditions. All isolates harbored the *icaADBC* gene cluster required for PIA/PNAG synthesis.

### 2.1. Quantification of Staphyloxanthin Expression

Quantification of *S. aureus* staphyloxanthin expression was investigated with adaptations based on a methanol extraction assay [20]. Briefly, *S. aureus* isolates were simultaneously grown aerobically on Tryptic Soy Agar (Oxoid Deutschland GmbH, Wesel, Germany) for 48 h at 37 °C. Using a sterile inoculation loop, bacteria were completely transferred to a 1.5 mL micro tube (Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Germany) containing 1 mL sterile water (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Cells were harvested by centrifugation (Fresco<sup>™</sup> 21 Microcentrifuge, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) at 17,000× g for 3 min. Each cell pellet was washed twice in sterile water and finally resuspended in 420 µL methanol (Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Germany). Then, 20 µL of this suspension were

added to 980  $\mu\text{L}$  sterile water in order to measure the optical density of each sample at 600 nm ( $\text{OD}_{600}$ ) using a Sparke<sup>®</sup> Microplate reader (Tecan Trading AG, Männedorf, Switzerland) in quadruplicate with each 200  $\mu\text{L}$  of the suspension in a 96-well plate. The remaining 400  $\mu\text{L}$  suspensions were incubated for 5 min at 55 °C using a laboratory block heater (FastGene Mini Dry Bath, NIPPON Genetics EUROPE, Düren, Germany), followed by centrifugation for 2 min. For quantification of staphyloxanthin, 350  $\mu\text{L}$  of the suspension were added to 650  $\mu\text{L}$  methanol containing micro tube. Finally, absorbance at 465 nm ( $A_{465}$ ) was measured and normalized against the  $\text{OD}_{600}$  of the low pigmented *S. aureus* ST45 isolate. Three independent experiments in duplicate were conducted.

## 2.2. Measuring Catalase Activity

Catalase activity was quantified using a visual approach as described previously with adaptations [21]. In brief, for each MRSA or MSSA isolate as well as the reference strain, a suspension with an optical density of McFarland 2 was produced in a 0.9% NaCl solution. In each case, 1 mL of the suspension was transferred to a 10 mL tube, and then 100  $\mu\text{L}$  of 1% Triton-X100 (Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Germany) solution and 100  $\mu\text{L}$  hydrogen peroxide 30% (Th. Geyer GmbH & Co. KG) were added. After thorough mixing, a reaction time of 15 min was allowed, and finally the height of the resulting visible foam rising in the test tube was measured using a ruler. The experiment was conducted independently three times.

## 2.3. Quantification of Biofilm Formation

The ability to form a biofilm under different growth conditions was determined with adaptations following Mack et al. [35] and Knobloch et al. [36]. In brief, 20  $\mu\text{L}$  of pre-culture grown for 4 h in tryptic soy broth (TSB, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany) were added to either 2 mL TSB, TSB supplemented with 4% NaCl (wt/vol) or 4% ethanol (vol/vol). Then, 200  $\mu\text{L}$  of each suspension was added to eight wells of a 96-well plate and incubated at 37 °C for 20–24 h. Subsequently, each well was washed four times with Dulbecco's phosphate-buffered saline (anprotec, Bruckberg, Germany). After drying, wells were stained with gentian violet solution (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany) for 15 min and dried again. Finally, the absorbance was measured with the Sparke<sup>®</sup> Microplate Reader at 570 nm ( $A_{570}$ ) and the reference value at 405 nm.  $A_{570}$  values <0.1 were defined as biofilm-negative whereas values between 0.1 and 0.5, and values >0.5 corresponded to weak and strong biofilm formation, respectively. Values exceeding the limit of the instrument ( $A_{570} > 4.0$ ) were set to 4.0 for calculation of mean values. In addition to the tested *S. aureus* isolates, biofilm-negative *S. epidermidis* 1585 and biofilm-positive *S. epidermidis* 1457 were carried along as negative and positive controls, respectively. For each growth condition, three independent experiments were performed in duplicate.

## 2.4. UV-C Disinfection Procedure

The setup of the UV-C disinfection procedure was defined according to the manufacturer's instructions for the use of a mobile UV-C light source, UVD robot model C (UVD Robots, Odense S, Denmark), emitting a wavelength of 254 nm. The manufacturer specifies a minimum UV-C light intensity of 2500  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  at a distance of 1 m. According to Equation (1), an exposure time of 20 s was defined to reach UV-C doses of approx. 50  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  at 1.0 m and 22  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  at 1.5 m distance. Since the microorganism-time-calculator of the manufacturer specifies a required UV-C dose of 104  $\text{J}/\text{m}^2$  (approx. 10  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ ) to achieve Log 4 reduction, this setting should be effective to reduce *S. aureus*.

$$\text{UVC dose} \left[ \frac{\text{mJ}}{\text{cm}^2} \right] = \text{intensity} \left[ \frac{\text{mW}}{\text{cm}^2} \right] \times \text{exposure time} [\text{s}] \quad (1)$$



This calculation was confirmed in individual experiments checking the color change of UV-C indicators (UV-C Dosimeter™, UVD Robots, Odense S, Denmark) after irradiation with these settings.

To avoid the influence of the three-minute warm-up phase of the UVD robot on the reduction rates, the warm-up phase took place in an anteroom. Subsequently, the robot automatically moved to the predefined disinfection point in the test room, which was located at the above-mentioned distance from the samples. After completing the irradiation, the robot switched off immediately at the disinfection position.

### 2.5. Testing UV-C Tolerance Using Reality-Simulating Experimental Conditions

The clinical *S. aureus* isolates as well as the reference strain were used to prepare standardized contaminated surfaces under clean conditions [17]. For each isolate, 20 µL of a bacterial suspension in 0.3% bovine serum albumin in 0.85% sodium chloride solution (range  $1.6\text{--}4.4 \times 10^8$  colony-forming units [cfu] per mL) was spread on ceramic tiles ( $5 \times 5$  cm, #3709PN00, Villeroy&Boch, Mettlach, Germany) using a sterile spatula (Sarstedt AG & Co. KG), and dried completely.

Subsequently, contaminated surfaces were positioned in duplicate on a one-meter height black table at 1.0 and 1.5 m distances. Furthermore, two contaminated surfaces per isolate were stored outside the test room as untreated controls. For each isolate, five independent experiments were performed. To account for the influence of variations in environmental conditions, the relative air humidity and temperature were recorded in each experiment via a LogTag Trex-8 (CiK Solutions GmbH, Karlsruhe, Germany).

To calculate reduction factors, treated surfaces and controls were wiped off in a standardized way with previously moistened flocked nylon swabs (eSwab™ Standard, Copan; Brescia, Italy) in order to recover bacteria from ceramic tiles. Swabs were then added to the Amies medium and vortexed for 30 s to elute recovered bacteria; subsequently, 100 µL was spread in duplicate on Columbia agar containing 5% sheep blood (bioMérieux) to carry out quantitative culture (detection limit 5 cfu/25 cm<sup>2</sup>). Agar plates were incubated at 37 °C for 18–24 h. Finally log reduction values (LRV) were calculated. If there was no growth in both approaches, the reduction value was reported as log<sub>10</sub> of the control according to DIN EN 17272:2020 [37]. Five independent experiments were conducted.

Statistical analysis was performed using R (version 4.0.3) [38] and R studio (version 2021.09.1) [39] with activated packages *ggpubr* [40] and *rstatix* [41]. To detect differences between the reduction factors of the clinical *S. aureus* isolates and standard test organism *S. aureus* ATCC 6538, one-way ANOVA was conducted. In case of significant results, a subsequent pairwise post-hoc Tukey test was performed. For all analyses, a confidence level of 95% was used. However, due to naturally occurring variations in microbial growth, only *p*-values <0.01 were assessed as statistically significant for pairwise comparisons.

## 3. Results

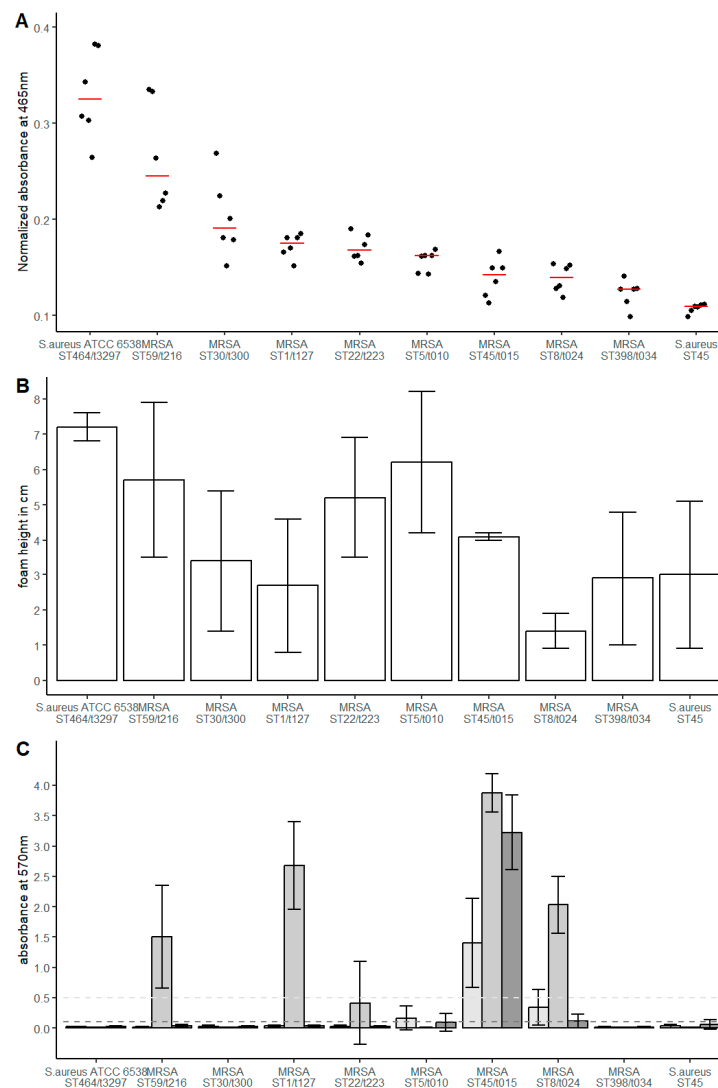
Staphylococci are commensals of the skin and therefore have protective factors that protect themselves from light exposure and free oxygen radicals. In this study, the sensitivity to a disinfection procedure using UV-C of representative MRSA isolates compared to a very low pigmented MSSA and the laboratory strain ATCC should be investigated. All investigated isolates were phenotypically characterized.

### 3.1. Genotypic and Phenotypic Characteristics of the Investigated Isolates

Genotypic and phenotypic characterisation confirmed a *mecA* gene as well as phenotypic resistance against oxacillin in all eight MRSA isolates. Additional phenotypic and genotypic resistance was observed in five MRSA isolates (Supplementary Table S1). However, none of the isolates were considered as extensively drug-resistant or (XDR) or pandrug-resistant (PDR) [3]. In MSSA isolates, no genotypic or phenotypic resistance was observed.

Staphyloxanthin quantification revealed median values of the normalized A<sub>465</sub> between 0.325 and 0.109 (Figure 1A). *S. aureus* ATCC 6538 showed the highest absorbance,

representing the highest amount of synthesized staphyloxanthin (median 0.325, IQR 0.067), followed by MRSA ST58/t216 (median 0.245, IQR 0.095). The other MRSA isolates showed a lower variance of staphyloxanthin expression with  $A_{465}$  values in a range of 0.19 to 0.13. As expected, the methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) ST45 that presented as atypical in routine clinical diagnostics and lacked the typical yellow staining showed the lowest  $A_{465}$  value (median 0.109, IQR 0.005). In general, the quantified staphyloxanthin expression was in accordance with the visual comparison of the investigated *S. aureus* isolates.



**Figure 1.** Quantification of pigmentation (A) catalase level (B) and biofilm formation (C) in different clinical *S. aureus* isolates. Staphyloxanthin levels (A) were determined by absorbance 465 nm and were normalized to the  $OD_{600}$  of low-pigmented ST45. The dots represent the values ( $n = 6$ ) determined in three independent experiments. The median value of each isolate is shown by red horizontal lines. Catalase activity (B) is illustrated by foam height determined in five independent experiments. The median value is represented by bar height, which is supplemented by error bars showing the interquartile range. Biofilm formation (C) was evaluated in three independent experiments, resulting in 48 values per condition and strain. The bars show the mean value of the  $A_{570}$  value, supplemented by the standard deviation, which is represented as an error bar. The colouring of the bars represents the growth medium used (TSB: light grey; TSB + 4% NaCl: medium grey; TSB + 4% ethanol: dark grey).  $A_{570}$  values  $< 0.1$  were defined as biofilm-negative (dark grey dotted line) whereas values  $> 0.5$  corresponded strong biofilm formation (light grey dotted line), respectively.

Quantification of the catalase activity revealed median values in a range of 1.4 to 7.2 cm foam height in the visual assessment (Figure 1B). The strongest catalase activity was observed in *S. aureus* ATCC 6538 (median 7.2, IQR 0.4). MRSA ST8/t034 (median 1.4, IQR 0.5) showed the lowest catalase activity. MSSA ST45, MRSA ST398, MRSA ST45, MRSA ST1 and MRSA ST30 showed comparable catalase activity in a lower medium range (median 2.7 to 4.1). Greater activity, but also in a medium range, was observed for MRSA ST59, ST22 and ST5 (median 5.2 to 6.2).

Analysis of the capacity to form biofilms under non-inducing conditions revealed two isolates expressing a weak (MRSA ST8/t024 and ST5/t010) and one isolate (MRSA ST45/t015) expressing a strong biofilm-positive phenotype (Figure 1C). Induction of biofilm formation by supplementing the growth medium with NaCl was observed in five isolates (Figure 1C). Thereby, three isolates with a biofilm-negative phenotype under uninduced conditions displayed a weak (MRSA ST22/t223) or strong (MRSA ST1/t127 and ST59/t216) biofilm-positive phenotype. The biofilm-positive MRSA isolates ST45/t015 and ST8/t024 showed further increased biofilm formation induced by NaCl supplementation. In contrast, weak biofilm-forming MRSA ST5/t010 showed the lowest  $A_{570}$  in NaCl-supplemented medium.

Supplementation of the medium with sub-inhibitory concentrations of ethanol resulted in an induction of biofilm formation in strain MRSA ST45/t015 but reduced  $A_{570}$  values in strains MRSA ST8/t024 and ST5/t010 with a still weak and biofilm-negative phenotype, respectively. No positive biofilm phenotype was observed in four isolates under any of the conditions tested (*S. aureus* ATCC 6538 and MSSA ST45 as well as MRSA ST30/t300 and MRSA ST398/t0349). A strong biofilm formation could be detected under all test conditions for MRSA ST45/t015.

### 3.2. UV-C Disinfection of Investigated Isolates

For all isolates tested, the average bacterial concentration on the contaminated surfaces ranged from  $8.7 \times 10^5$ – $4.5 \times 10^6$  cfu/25 cm<sup>2</sup> (Supplementary Figure S1). Comparable room air conditions were observed for all experiments. The log reduction value (LRV) after irradiation with a UV-C dose of 50 mJ/cm<sup>2</sup> ranged between median 4.75 to 5.94 (Figure 2). Therefore, the maximum difference of LRV was 1.19. The largest reduction was observed for MRSA ST30/t300 (median 5.99) and *S. aureus* ATCC 6538 (median: 5.94). MRSA ST5/t010 (median: 4.86) and MRSA ST22/t223 (median: 5.07) were observed to be the most tolerant isolates.

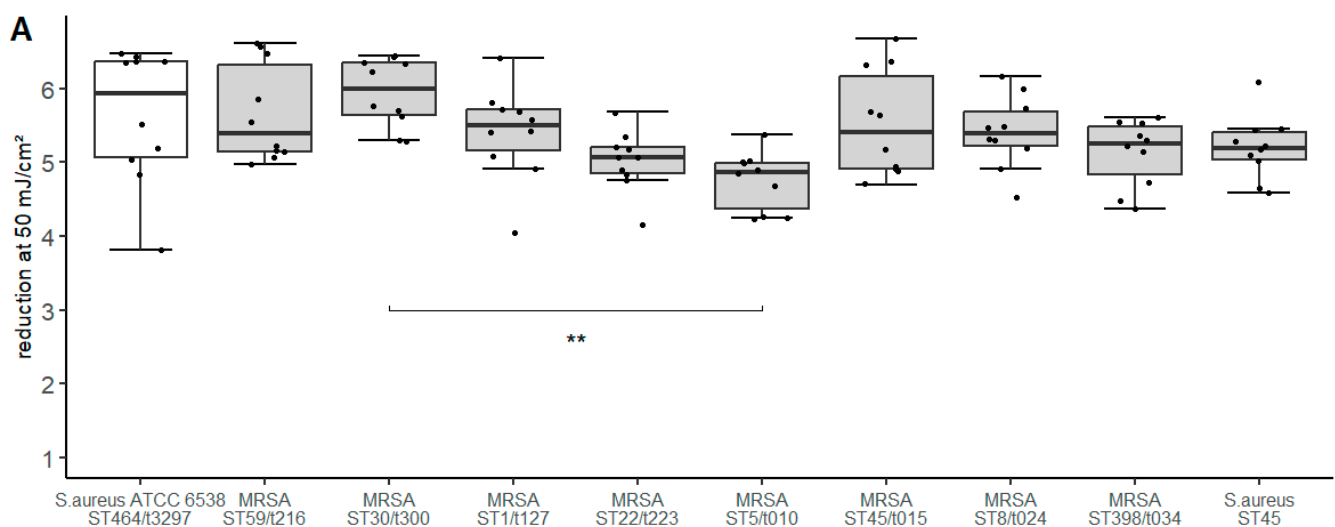
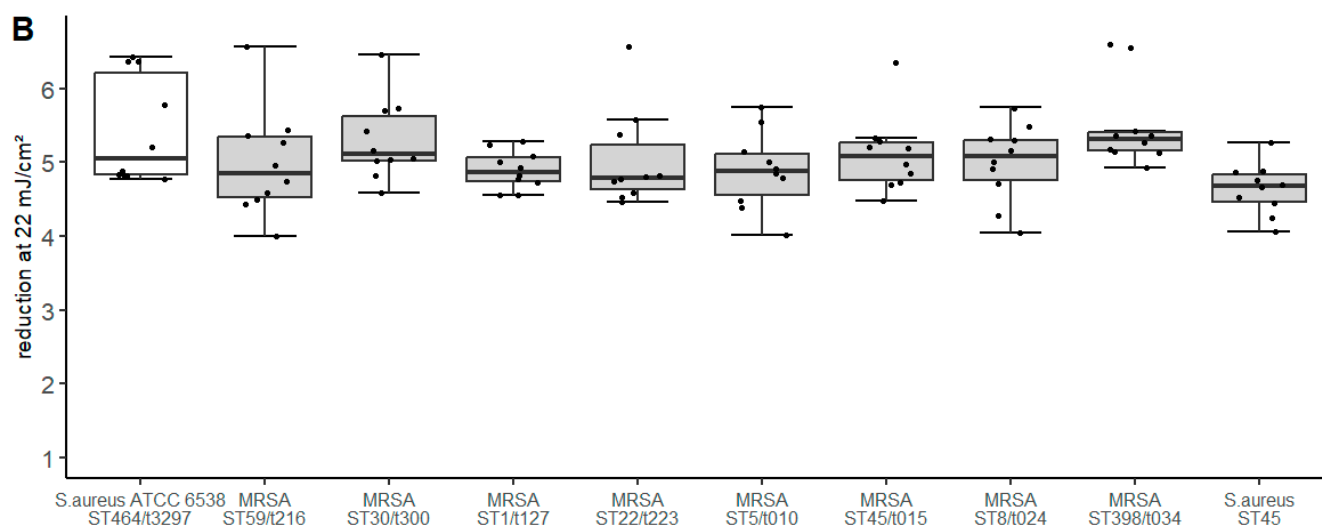


Figure 2. Cont.



**Figure 2.** Log reduction values (LRV) of clinical *S. aureus* isolates after irradiation with a UV-C dose of 50 mJ/cm<sup>2</sup> (A) and 22 mJ/cm<sup>2</sup> (B). Boxplots represent LRV determined in five independent experiments. Scatter of the individual measured values is represented by the individual points. The unfilled boxplot display the standard test organism. Significant result ( $p < 0.001 = **$ ) of statistical pairwise comparison in (A) is shown by the bracket.

Irradiation with the lower UV-C dose of 22 mJ/cm<sup>2</sup> resulted in an LRV between median 4.68 and 5.11 (Figure 2). The difference of LRV is at maximum 0.43 between the most susceptible and the most tolerant isolate.

To determine statistically significant differences in LRV, one-way ANOVA was performed. A significant result was shown for the UV-C dose 50 mJ/cm<sup>2</sup> ( $F(9, 90) = 3.66$ ,  $p = 6.18 \times 10^{-4}$ , generalized eta squared = 0.268). Pairwise comparisons resulted in a significant  $p$ -value of 0.00056 for the comparison MRSA ST5/t010 to MRSA ST30/t300 (CI:  $-2.03$  to  $-0.350$ ). The further comparisons did not show significant  $p$ -values as defined. When performing a one-way ANOVA to compare the LRV determined with a UV-C dose of 22 mJ/cm<sup>2</sup>, no significant difference was found.

#### 4. Discussion

The disinfecting effect of UV-C radiation is attributed to the absorption of energy by proteins and nucleic acids such as DNA, promoting the development of molecular rearrangements and photoproducts as well as the formation of reactive oxygen species [18]. *Staphylococcus aureus* strains are equipped with a variety of mechanisms to defend against oxidative stress caused by exogenous and endogenous reactions [42]. Pigmentation, mainly based on the pigment staphyloxanthin, is known as a protective factor against desiccation, photosensitization and reactive oxygen species [42]. Further protective factors against oxidative stress in staphylococci are the enzymes catalase and superoxide dismutase. A complex regulatory network modulates the expression of protective factors of staphylococci against oxidative stress and other damaging environmental conditions [43]. This network is balanced differently in individual strains even without the presence of environmental stress factors, so that the expression levels of these protective factors often differs between individual strains [42,43]. In addition to the factors mentioned, the ability to form biofilms is generally known to increase the environmental resistance of bacteria. Staphylococcal biofilm formation has been reported to be induced by environmental factors and stress conditions [44]. *S. aureus* has also been observed with high prevalence in dry biofilms on surfaces in the hospital environment [27]. This suggests that biofilm formation is also a common protective factor that increases the survival of *S. aureus* and tolerance to disinfectants.

When exposed to fast-acting disinfectants such as short-term irradiation with high-energy UV-C radiation, microorganisms cannot react by adapting the expression of protec-

tive factors. Therefore, the investigation of different isolates with natural differences in the expression of preformed protective factors is of high importance for the assessment of the effectiveness of disinfection measures in the hospital setting.

By comparison of eight different clinical MRSA isolates of different clonal complexes, strong variations in pigment expression were observed. The normative test organism ATCC 6538 showed conspicuously strong pigment in contrast to *S. aureus* ST45, which had the lowest pigmentation. Differences were also found in catalase activity, with ATCC 6538 *S. aureus* displaying the highest catalase activity but no association between catalase activity and pigmentation for the other isolates.

Six of the investigated *S. aureus* strains displayed the capacity to form a biofilm under at least one of three different culture conditions, whereas four isolates displayed a biofilm-negative phenotype under all tested conditions. Only MRSA ST45/t015 displayed a strong biofilm-positive phenotype under all tested growth conditions, indicating that bacterial clusters embedded in PIA/PNAG could be present on the contaminated surfaces used for the evaluation of the UV-C disinfection process. More importantly, despite the presence of the *icaADBC* operon in all strains, the different biofilm phenotypes of the individual strains confirm that strong differences in the global regulatory networks of *S. aureus* are present in these strains and could influence the susceptibility against UV-C radiation.

The log reduction value (LRV) achieved at a UV-C radiation dose of 50 mJ/cm<sup>2</sup> was greater than five log<sub>10</sub> for all isolates tested with the exception of MRSA ST5/t010. The observed differences in LRV were statistically significant ( $p < 0.01$ ) only when comparing MRSA ST5/t010 and MRSA ST30/t300. MRSA ST5/t010 was identified as the most UV-C tolerant isolate, although similar pigmentation was detected as compared to most of the strains investigated. Catalase activity in this strain was one of the strongest. Interestingly, ATCC 6538 *S. aureus*, which was shown to have both the highest catalase activity and the strongest pigmentation, was not more tolerant than the other isolates.

The fact that highly pigmented *S. aureus* isolates do not appear to be associated with greater UV-C tolerance is consistent with the study of Pannu et al. [19]. On the one hand, they showed that *crt* mutants of *S. aureus* lacking staphyloxanthin expression have lower UV-C tolerance compared to wild-type. On the other hand, overexpression of staphyloxanthin in the complemented mutant *S. aureus* is associated with decreased UV-C tolerance compared to wild-type. They suggested that overexpression leads to increased absorption, which in turn contributes to more severe oxidative stress damage [19].

It is described that catalase-producing microorganisms are possibly able to reduce the efficacy of vaporized hydrogen peroxide [22]. The mechanism for this is based on oxidative reactions which among others is also a mechanism of UV-C radiation. However, in the case of short-term high effective UV-C irradiation, this effect was not observed. Moreover, no association of the individual capacity to express a biofilm-positive phenotype with susceptibility or tolerance against UV-C radiation could be observed in the investigated strains.

The different expression of several virulence factors of genetically highly diverse wild-type *S. aureus* had no influence on susceptibility to UV-C. In the present study, no targeted deletion mutants lacking pigmentation, catalase activity and biofilm formation, nor respective complemented mutants were examined. Hence, no statement can be made about whether the presence of such virulence factors has a confirmed influence on UV-C susceptibility. It should also be noted that it cannot be ruled out that pigment expression during growth on rich media in vitro may differ from the expression on a hospital surface to be disinfected. However, the observed diversity of pigmentation in wild-type strains does not have any influence. In addition, it must be taken into account that other clonal variations such as switching to small colony variants or spontaneous deletions in global regulators could have an effect on UV-C tolerance [19,45,46]. When assessing the results of the quantification of biofilm formation, it must be taken into account that only two stress factors potentially influencing biofilm formation were investigated. In addition, this in vitro test differs from the real conditions on site where, among other things, other temperatures and mechanical effects on surfaces can have an influence. When testing the

UV-C tolerance of the different clinical isolates, resuspended cells were applied to surfaces and dried, without the steps of primary attachment and subsequent cell-to-cell adhesion to form a multi-layered biofilm. Therefore, we suggest no relevant amounts of PIA/PNAG for most strains. However, in suspensions of MRSA ST45/t015, individual larger clusters might have been present as this strain displays a strong biofilm-positive phenotype under all tested in vitro conditions. It is therefore not possible to claim whether the differences between the clinical isolates in biofilm formation lead to different UV-C tolerances. Since it has been shown that dry biofilms can contain relevant bacteria [27] and observations have also been published that bacterial biofilms are more tolerant than planktonic bacteria to disinfectants and environmental stress [25] but also to UV-C [25,26], further work on the influence of dry biofilms on inanimate surfaces on the disinfection success with UV-C would be interesting.

## 5. Conclusions

To conclude, observed phenotypic differences in catalase formation, pigmentation and biofilm formation in various clinical *S. aureus* isolates did not affect efficacy using highly effective short-term UV-C radiation. This is of relevance for the set-up and efficacy assessment of UV-C whole-room disinfection procedures in hospital environments. Moreover, results of frequently used reference strains also seem to be representative for clinical isolates in this species.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/microorganisms11051332/s1>, Figure S1: Bacterial contamination of surface before and after UV-C radiation with different UV-C doses. Table S1: Phenotypic and genotypic resistance in the investigated strains.

**Author Contributions:** Conceptualization, J.K.K.; methodology, J.K.K., B.K., G.F. and L.C.; software, E.M.K. and J.K.K.; validation, B.K., J.K.K. and G.F.; formal analysis, B.K. and J.K.K.; investigation, B.K., G.F., P.M.M. and L.C.; data curation, B.K.; writing—original draft preparation, B.K., J.K.K., G.F., P.M.M. and L.C.; writing—review and editing, C.B.C., H.B. and E.M.K.; visualization, B.K.; supervision, C.B.C. and H.B.; project administration, J.K.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available in an insert article.

**Acknowledgments:** We thank Rieke Hinrichs for excellent technical assistance.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Algammal, A.M.; Abo Hashem, M.E.; Alfifi, K.J.; Al-Otaibi, A.S.; Alatawy, M.; ElTarabili, R.M.; Abd El-Ghany, W.A.; Hetta, H.F.; Hamouda, A.M.; Elewa, A.A.; et al. Sequence Analysis, Antibioqram Profile, Virulence and Antibiotic Resistance Genes of XDR and MDR *Gallibacterium anatis* Isolated from Layer Chickens in Egypt. *Infect. Drug Resist.* **2022**, *15*, 4321–4334. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Algammal, A.M.; Enany, M.E.; El-Tarabili, R.M.; Ghobashy, M.O.I.; Helmy, Y.A. Prevalence, Antimicrobial Resistance Profiles, Virulence and Enterotoxins-Determinant Genes of MRSA Isolated from Subclinical Bovine Mastitis in Egypt. *Pathogens* **2020**, *9*, 362. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Magiorakos, A.-P.; Srinivasan, A.; Carey, R.B.; Carmeli, Y.; Falagas, M.E.; Giske, C.G.; Harbarth, S.; Hindler, J.F.; Kahlmeter, G.; Olsson-Liljequist, B.; et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* **2012**, *18*, 268–281. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Diekema, D.J.; Pfaller, M.A.; Shortridge, D.; Zervos, M.; Jones, R.N. Twenty-Year Trends in Antimicrobial Susceptibilities Among *Staphylococcus aureus* From the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Open Forum Infect. Dis.* **2019**, *6*, S47–S53. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Bal, A.M.; Coombs, G.W.; Holden, M.T.G.; Lindsay, J.A.; Nimmo, G.R.; Tattevin, P.; Skov, R.L. Genomic insights into the emergence and spread of international clones of healthcare-, community- and livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Blurring of the traditional definitions. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **2016**, *6*, 95–101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

6. Cheung, G.Y.C.; Bae, J.S.; Otto, M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence* **2021**, *12*, 547–569. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Wißmann, J.E.; Kirchhoff, L.; Brüggemann, Y.; Todt, D.; Steinmann, J.; Steinmann, E. Persistence of Pathogens on Inanimate Surfaces: A Narrative Review. *Microorganisms* **2021**, *9*, 343. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Wolfensberger, A.; Mang, N.; Gibson, K.E.; Gontjes, K.; Cassone, M.; Brugger, S.D.; Mody, L.; Sax, H. Understanding short-term transmission dynamics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the patient room. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **2022**, *43*, 1147–1154. [[CrossRef](#)]
9. Tanner, W.D.; Leecaster, M.K.; Zhang, Y.; Stratford, K.M.; Mayer, J.; Visnovsky, L.D.; Alhmidi, H.; Cadnum, J.L.; Jencson, A.L.; Koganti, S.; et al. Environmental Contamination of Contact Precaution and Non-Contact Precaution Patient Rooms in Six Acute Care Facilities. *Clin. Infect. Dis.* **2021**, *72*, S8–S16. [[CrossRef](#)]
10. Meyer, J.; Nippak, P.; Cumming, A. An evaluation of cleaning practices at a teaching hospital. *Am. J. Infect. Control* **2021**, *49*, 40–43. [[CrossRef](#)]
11. Chen, L.F.; Knelson, L.P.; Gergen, M.F.; Better, O.M.; Nicholson, B.P.; Woods, C.W.; Rutala, W.A.; Weber, D.J.; Sexton, D.J.; Anderson, D.J. A prospective study of transmission of Multidrug-Resistant Organisms (MDROs) between environmental sites and hospitalized patients—the TRANSFER study. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **2019**, *40*, 47–52. [[CrossRef](#)]
12. Wu, Y.-L.; Yang, X.-Y.; Ding, X.-X.; Li, R.-J.; Pan, M.-S.; Zhao, X.; Hu, X.-Q.; Zhang, J.-J.; Yang, L.-Q. Exposure to infected/colonized roommates and prior room occupants increases the risks of healthcare-associated infections with the same organism. *J. Hosp. Infect.* **2019**, *101*, 231–239. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Cohen, B.; Cohen, C.C.; Løyland, B.; Larson, E.L. Transmission of health care-associated infections from roommates and prior room occupants: A systematic review. *Clin. Epidemiol.* **2017**, *9*, 297–310. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Masjouidi, M.; Mohseni, M.; Bolton, J.R. Sensitivity of Bacteria, Protozoa, Viruses, and Other Microorganisms to Ultraviolet Radiation. *J. Res. Natl. Inst. Stan.* **2021**, *126*, 1–77. [[CrossRef](#)]
15. Mariita, R.M.; Randive, R.V. Disinfection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Acinetobacter baumannii* using Klaran WD array system. *Access Microbiol.* **2021**, *3*, 194. [[CrossRef](#)]
16. Christenson, E.C.; Cronk, R.; Atkinson, H.; Bhatt, A.; Berdiel, E.; Cawley, M.; Cho, G.; Coleman, C.K.; Harrington, C.; Heilferty, K.; et al. Evidence Map and Systematic Review of Disinfection Efficacy on Environmental Surfaces in Healthcare Facilities. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2021**, *18*, 11100. [[CrossRef](#)]
17. EN 14885:2018; Chemical Disinfectants and Antiseptics—Application of European Standards for Chemical Disinfectants and Antiseptics. Deutsches Institut für Normung e.V.: Berlin, Germany; Beuth Verlag GmbH: Berlin, Germany, 2018. (In German)
18. Zwicker, P.; Schleusener, J.; Lohan, S.B.; Busch, L.; Sicher, C.; Einfeldt, S.; Kneissl, M.; Köhl, A.A.; Keck, C.M.; Witzel, C.; et al. Application of 233 nm far-UVC LEDs for eradication of MRSA and MSSA and risk assessment on skin models. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 2587. [[CrossRef](#)]
19. Pannu, M.K.; Hudman, D.A.; Sargentini, N.J.; Singh, V.K. Role of SigB and Staphyloxanthin in Radiation Survival of *Staphylococcus aureus*. *Curr. Microbiol.* **2019**, *76*, 70–77. [[CrossRef](#)]
20. Sullivan, L.E.; Rice, K.C. Measurement of *Staphylococcus aureus* Pigmentation by Methanol Extraction. *Methods Mol. Biol.* **2021**, *2341*, 1–7. [[CrossRef](#)]
21. Iwase, T.; Tajima, A.; Sugimoto, S.; Okuda, K.; Hironaka, I.; Kamata, Y.; Takada, K.; Mizunoe, Y. A simple assay for measuring catalase activity: A visual approach. *Sci. Rep.* **2013**, *3*, 3081. [[CrossRef](#)]
22. Pottage, T.; Macken, S.; Walker, J.T.; Bennett, A.M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is more resistant to vaporized hydrogen peroxide than commercial *Geobacillus stearothermophilus* biological indicators. *J. Hosp. Infect.* **2012**, *80*, 41–45. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Bono, N.; Ponti, F.; Punta, C.; Candiani, G. Effect of UV Irradiation and TiO<sub>2</sub>-Photocatalysis on Airborne Bacteria and Viruses: An Overview. *Materials* **2021**, *14*, 1075. [[CrossRef](#)]
24. Chaggar, G.K.; Nkemngong, C.A.; Li, X.; Teska, P.J.; Oliver, H.F. Hydrogen peroxide, sodium dichloro-s-triazinetrioxone and quaternary alcohols significantly inactivate the dry-surface biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* more than quaternary ammoniums. *Microbiology* **2022**, *168*, 001140. [[CrossRef](#)]
25. Otter, J.A.; Vickery, K.; Walker, J.T.; deLancey Pulcini, E.; Stoodley, P.; Goldenberg, S.D.; Salkeld, J.A.G.; Chewins, J.; Yezli, S.; Edgeworth, J.D. Surface-attached cells, biofilms and biocide susceptibility: Implications for hospital cleaning and disinfection. *J. Hosp. Infect.* **2015**, *89*, 16–27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Elasri, M.O.; Miller, R.V. Study of the response of a biofilm bacterial community to UV radiation. *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 2025–2031. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Ledwoch, K.; Dancer, S.J.; Otter, J.A.; Kerr, K.; Roposte, D.; Rushton, L.; Weiser, R.; Mahenthiralingam, E.; Muir, D.D.; Maillard, J.-Y. Beware biofilm! Dry biofilms containing bacterial pathogens on multiple healthcare surfaces; a multi-centre study. *J. Hosp. Infect.* **2018**, *100*, e47–e56. [[CrossRef](#)]
28. Brooks, J.L.; Jefferson, K.K. Phase variation of poly-N-acetylglucosamine expression in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Pathog.* **2014**, *10*, e1004292. [[CrossRef](#)]
29. Schilcher, K.; Horswill, A.R. Staphylococcal Biofilm Development: Structure, Regulation, and Treatment Strategies. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2020**, *84*, e00026-19. [[CrossRef](#)]
30. Knobloch, J.K.-M.; Horstkotte, M.A.; Rohde, H.; Mack, D. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Med. Microbiol. Immunol.* **2002**, *191*, 101–106. [[CrossRef](#)]

31. Scott, R.; Joshi, L.T.; McGinn, C. Hospital surface disinfection using ultraviolet germicidal irradiation technology: A review. *Healthc. Technol. Lett.* **2022**, *9*, 25–33. [[CrossRef](#)]
32. Beswick, A.J.; Fry, C.; Bradley, C.R.; Pottage, T.; Sharpe, S.; Haill, C.F.; Mugglestone, M.A.; Bak, A.; Marsden, G.L.; Bennett, A.; et al. Automated room decontamination: Report of a Healthcare Infection Society Working Party. *J. Hosp. Infect.* **2022**, *124*, 97–120. [[CrossRef](#)]
33. Carlsen, L.; Büttner, H.; Christner, M.; Franke, G.; Indenbirken, D.; Knobling, B.; Lütgehetmann, M.; Knobloch, J. High burden and diversity of carbapenemase-producing *Enterobacterales* observed in wastewater of a tertiary care hospital in Germany. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **2022**, *242*, 113968. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Aires-de-Sousa, M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among animals: Current overview. *Clin. Microbiol. Infect.* **2017**, *23*, 373–380. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Mack, D.; Bartscht, K.; Fischer, C.; Rohde, H.; de Grahl, C.; Dobinsky, S.; Horstkotte, M.A.; Kiel, K.; Knobloch, J.K. Genetic and biochemical analysis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm accumulation. *Methods Enzymol.* **2001**, *336*, 215–239. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Knobloch, J.K.; Bartscht, K.; Sabottke, A.; Rohde, H.; Feucht, H.H.; Mack, D. Biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* depends on functional RsbU, an activator of the sigB operon: Differential activation mechanisms due to ethanol and salt stress. *J. Bacteriol.* **2001**, *183*, 2624–2633. [[CrossRef](#)]
37. EN 17272:2020; Chemical Disinfectants and Antiseptics—Methods of Airborne Room Disinfection by Automated Process—Determination of Bactericidal, Mycobactericidal, Sporicidal, Fungicidal, Yeasticidal, Virucidal and Phagocidal Activities. Deutsches Institut für Normung e.V.: Berlin, Germany; Beuth Verlag GmbH: Berlin, Germany, 2020. (In German)
38. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2022.
39. Posit Team. *RStudio: Integrated Development Environment for R. Posit Software*; Posit Software, PBC: Boston, MA, USA, 2022.
40. Kassambara, A. ggpubr: 'ggplot2' Based Publication Ready Plots. 2020. Available online: <https://cran.r-project.org/web/packages/ggpubr/index.html> (accessed on 20 December 2022).
41. Kassambara, A. rstatix: Pipe-Friendly Framework for Basic Statistical Tests. 2021. Available online: <https://cloud.r-project.org/web/packages/rstatix/index.html> (accessed on 20 December 2022).
42. Gaupp, R.; Ledala, N.; Somerville, G.A. Staphylococcal response to oxidative stress. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2012**, *2*, 33. [[CrossRef](#)]
43. Jenul, C.; Horswill, A.R. Regulation of *Staphylococcus aureus* Virulence. *Microbiol. Spectr.* **2019**, *7*. [[CrossRef](#)]
44. Götz, F. *Staphylococcus* and biofilms. *Mol. Microbiol.* **2002**, *43*, 1367–1378. [[CrossRef](#)]
45. Inose, Y.; Takeshita, S.L.; Hidaka, T.; Higashide, M.; Maruyama, A.; Hayashi, H.; Morikawa, K.; Ohta, T. Genetic characterization of the natural SigB variants found in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **2006**, *52*, 259–271. [[CrossRef](#)]
46. Painter, K.L.; Strange, E.; Parkhill, J.; Bamford, K.B.; Armstrong-James, D.; Edwards, A.M. *Staphylococcus aureus* adapts to oxidative stress by producing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-resistant small-colony variants via the SOS response. *Infect. Immun.* **2015**, *83*, 1830–1844. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



III. Superiority of manual disinfection using pre-soaked wipes over automatic UV-C radiation without prior cleaning

Veröffentlicht in:

Knobling B, Ulatowski A, Franke G, Belmar Campos C, Büttner H, Klupp EM *et al.* Superiority of manual disinfection using pre-soaked wipes over automatic UV-C radiation without prior cleaning. J Hosp Infect 2023;140:72–8. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2023.07.017>.



ELSEVIER

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

Journal of Hospital Infection

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jhin](http://www.elsevier.com/locate/jhin)



# Superiority of manual disinfection using pre-soaked wipes over automatic UV-C radiation without prior cleaning

B. Knobling<sup>a</sup>, A. Ulatowski<sup>b</sup>, G. Franke<sup>a</sup>, C. Belmar Campos<sup>a</sup>, H. Büttner<sup>a</sup>,  
E.M. Klupp<sup>a</sup>, P.M. Maurer<sup>a</sup>, F.H.H. Brill<sup>b</sup>, J.K. Knobloch<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Institute for Medical Microbiology, Virology and Hygiene, Department Infection Prevention and Control, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

<sup>b</sup> Dr. Brill + Partner GmbH Institute for Hygiene and Microbiology, Hamburg, Germany

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 1 June 2023

Accepted 30 July 2023

Available online 3 August 2023

### Keywords:

Automatic room  
decontamination

Disinfection

UV-C

Phase 3 testing

Field test



## SUMMARY

**Background:** The efficacy of ultraviolet C (UV–C) radiation against a broad spectrum of micro-organisms has been demonstrated in several studies, but differences in the specific doses and the extent of microbial reduction were found. Furthermore, the conditions of laboratory tests differ greatly from reality, such that efficacy achieved in tests may not necessarily be assumed in reality. Consequently, it is important to investigate the effectiveness of UV-C in representative field trials. The aim was therefore to develop and establish a field test to evaluate automatic UV-C in comparison to manual disinfection.

**Methods:** Before and after disinfection, samples were repeatedly collected from naturally highly contaminated surfaces using the swab technique to obtain representative data sets for disinfected and non-disinfected surfaces. Subsequently, the log reduction values (LRV) and the disinfection success were evaluated for UV-C radiation and full compliant manual disinfection using alcohol-based wipes.

**Results:** Surfaces that are naturally contaminated with bacteria on a regular and nearly uniform basis have been identified as particularly suitable for field testing. Mean contamination was reduced from 23.3 to 1.98 cfu/cm<sup>2</sup> (LRV 0.9) and 29.7 to 0.26 cfu/cm<sup>2</sup> (LRV 1.2) for UV-C and manual disinfection, respectively. UV-C disinfection achieved 75.5% successful disinfected surfaces, whereas manual disinfection showed 98.1%.

**Conclusions:** Full compliant manual disinfection showed slightly higher LRVs and disinfection success than automatic UV-C disinfection. Successful, operator-independent UV-C disinfection still has the potential to improve disinfection performance in addition to manual disinfection.

© 2023 The Healthcare Infection Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

\* Corresponding author. Address: Institute for Medical Microbiology, Virology and Hygiene, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Department Infection Prevention and Control, Martinistraße 52, 20251 Hamburg, Germany. Tel.: +49 40 7410 51720.

E-mail address: [j.knobloch@uke.de](mailto:j.knobloch@uke.de) (J.K. Knobloch).

## Introduction

The successful removal of microbiological contamination from frequently touched surfaces in the hospital environment basically depends on mechanical removal of dirt and organic

contaminants and the use of suitable products to inactivate micro-organisms [1]. Furthermore, the use of the correct formulation and application, manual distribution and compliance with the required contact time are crucial [2]. Standardized approval procedures and in-vitro studies enable reliable efficacy of disinfectants by defining clear exposure times and concentration to reach the required reduction of test organisms on surfaces [3]. However, these laboratory studies may not be suitable to ensure efficacy in reality, which implies, e.g., a variety of surface materials and potentially environmentally adapted pathogens [3]. This has recently been indicated by Uy et al., who observed reduced reductions in practical use compared with reported efficacy for disinfection in a laboratory setting [4]. In addition, another publication indicates no complete inactivation of staphylococci from surfaces after manual disinfection (MD), even though only a low microbial load was present before disinfection [5].

The discrepancy between the test conditions, the complexity of hospital environments and the insufficient compliance with cleaning and disinfection protocols were among other causes that lead to an increased risk of acquiring nosocomial pathogens and infections, if the patient room was previously occupied by an infected or colonized patient [6,7]. To reduce the risk of nosocomial infections from contaminated surfaces in the environment, the use of additional operator-independent, automated disinfection procedures has been discussed as a solution to increase effectiveness [2,8,9]. In particular, ultraviolet C (UV-C) radiation has become a common method, for which a high efficacy against a wide range of micro-organisms was verified in several laboratory studies (e.g., [10,11]). In addition, an achievable  $\log_{10}$  reduction of  $>4$  in simulated hospital settings for the relevant pathogens, meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and vancomycin-resistant enterococci (VRE), was shown [12].

Despite the large number of existing studies showing efficacy, no general statement for required micro-organism-specific doses to achieve specified reductions can be made, which is mainly due to the absence of standardization in efficacy evaluation [13]. In addition, efficacy tests usually are carried out with defined standard test organisms. However, it has recently been demonstrated that these may not be sufficiently representative for the large number of clinical isolates in the hospital environment. This was supported by the detection of statistically significant differences in UV-C tolerance between genetically distinct clinical isolates of VRE and the test organism *E. hirae* ATCC 10541 [14]. Therefore, to obtain meaningful results, efficacy testing should be performed against naturally occurring pathogens. Furthermore, efficacy of UV-C radiation under practical conditions of hospital environment is dependent on multiple factors such as shadowing, surface material, organic soil and pathogens, which are individual for different room conditions [9,12,13]. Based on these observations, it is questionable whether efficacy testing in laboratory situations is sufficient to predict efficacy in practical use.

To address this topic, the current version of European standard DIN EN 14885 for Chemical disinfectants and anti-septics pointed out, that phase 3 tests (field tests) could be helpful to assess the efficacy of disinfectants under the typical operation conditions of a product and against naturally occurring micro-organisms [15]. In particular, for novel products such as automatic UV-C disinfection devices (UVCDs), it is recommended that field tests be conducted in the areas to be

disinfected [9,15]. However, due to the predominantly low surface contamination in the hospital environment [5,16] and the need for regularly and uniformly contaminated surfaces to enable comparable measurement, the implementation of field tests is challenging.

Therefore, the aim of the present work was to develop and establish a realistic, reproducible phase 3 field test, which enables the investigation of the efficacy of an automated UVCD robot in a complex treatment environment compared with full compliant MD with pre-soaked wipes. In order to be able to assess the sole effectiveness of UV-C irradiation in reducing microbial surface contamination, no prior cleaning was carried out contrary to common recommendations.

## Methods

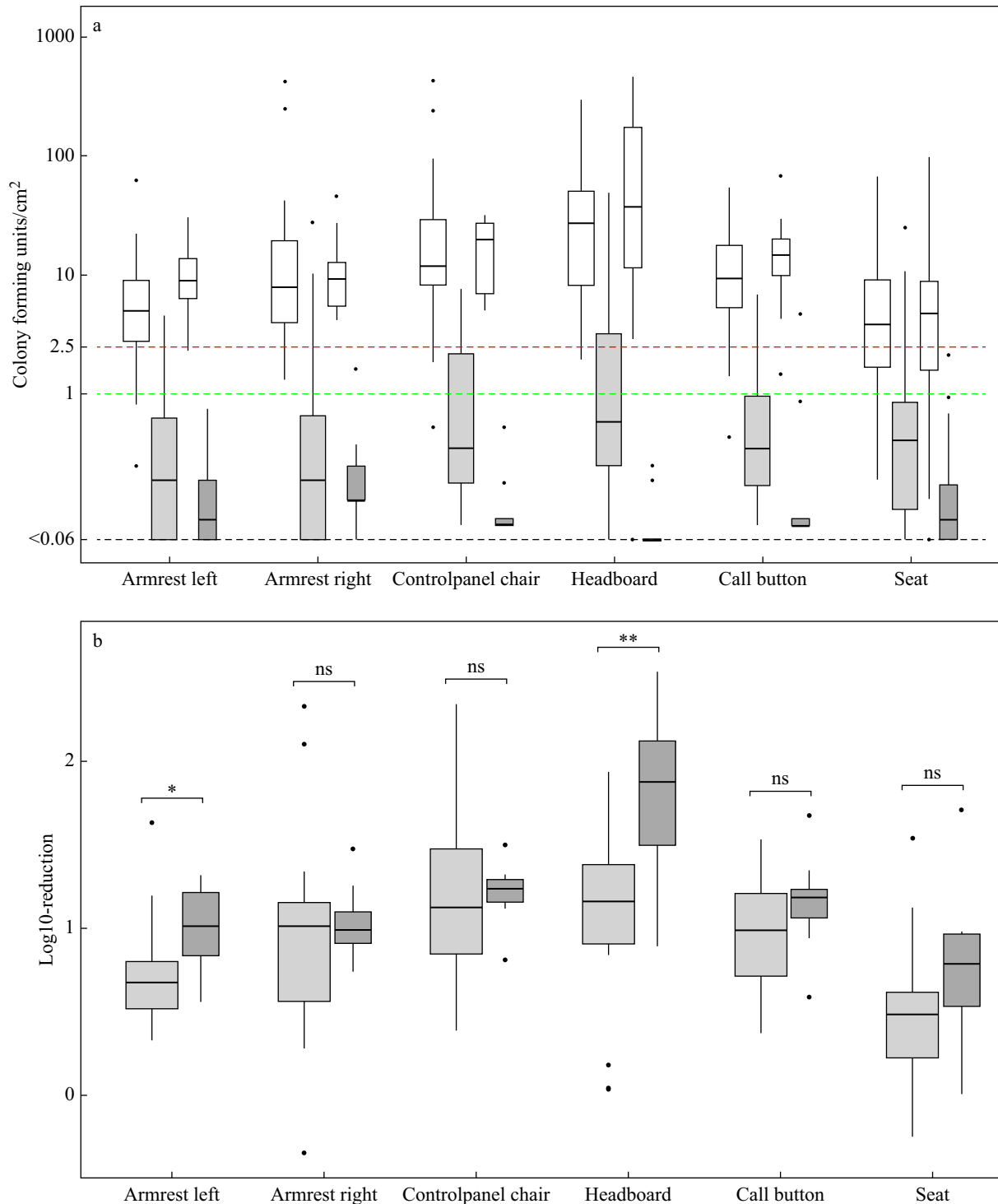
To evaluate the efficacy of an automatic UVCD device compared with compliant MD with pre-soaked alcohol wipes under real-life conditions, microbiological environmental samples were taken from examination chairs in three medical examination rooms of an oncology outpatient clinic immediately after the end of patient care and after each disinfection procedure.

Each examination room has the same layout and area ( $23.60 \pm 0.05 \text{ m}^2$ ) and is equipped with examination chairs of the same type. In each experiment (UVCD:  $N=6$ , MD:  $N=3$ ), two examination chairs were sampled before and two after the disinfection procedure per room whereby the order of sampling was changed between each experiment to ensure independence from the position in the room (Supplementary Figure S1).

UVCD was performed using the UVD robot model C (UVD Robots, Odense S, Denmark). All examination chairs were initially positioned in the same basic position to ensure comparability. For UVCD process, the UVD robot (average emittance  $2,500 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ ) was started at the window end of the room. After finishing the required 3-min warm-up phase and the additional 20 s of disinfection at first disinfection position, the robot drove a straight route with seven additional stops for 50 s each (Supplementary Figure S1). This irradiation time was based on results of previous studies with the same UV-C robot [14,17]. Compared with the UV-C doses used in these studies, a much higher irradiation dose was used in the field test to ensure that the effective dose was suitable to achieve bactericidal reduction even of more tolerant clinical isolates.

MD was carried out with alcoholic ready-to-use disinfectant wipes (Bacillol® AF Tissues, Paul Hartmann AG, Germany), observing the exposure time of 5 min specified by the manufacturer to achieve bactericidal efficacy. Each examination chair was disinfected using four wipes. The first for the armrests, the second and third for the headboard and seat, respectively, and the last for the control panel and the patient call button.

Environmental samples were taken from each examination chair at six standardized areas (Supplementary Figure S1). As it is known that, in particular, hand and skin contact surfaces of the patient can be relevant for transmission of pathogens, we focused the examination of such surfaces. To ensure sampling of standardized areas ( $100 \text{ cm}^2$ ) on the left and right armrest, in the middle of the headboard and on the seat, sterile square sampling templates of size  $10 \times 10 \text{ cm}$  (Copan Italia, Brescia, Italy) were used. In the case of the patient call ( $71.5 \text{ cm}^2$ ) and



**Figure 1.** Colony counts before and post ultraviolet-C (UV-C) and manual disinfection (a) and log reduction values (b). White boxplots represent colony-forming units (cfu)/cm<sup>2</sup> (a) before UV-C and manual disinfection per position. Light grey and grey filled boxplots display cfu/cm<sup>2</sup> post-UV-C and manual disinfection, respectively. The width of boxplots depends on the number of values (UV-C  $N=36$ , manual  $N=18$ ). Detection limit, limit for successful disinfection and limit for insufficient disinfection are represented by black, green and red dashed line. Log reduction values (b) of UV-C radiation are displayed by light grey and manual disinfection by grey filled boxplots. Results of the  $t$ -test comparisons per position are represented by significances above brackets (n.s. = not significant, \*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$ ).

the examination chair control panel (71.2 cm<sup>2</sup>), only the front side was sampled. As these hand contact surfaces are positioned on the top and front of the examination chairs, all surfaces were in direct radiation direction of the UV-C robot.

For microbiological examination of the surfaces flocced nylon swabs (SRK FLOQSwabs, Product Code 906C, Copan Italia, Brescia, Italy) were moistened with neutralizing transport medium and each surface was wiped following a standardized

**Table I**  
Evaluation of successful disinfection

Disinfection	Success	Proportion	Percentage
UV-C	Successfully disinfected ( $\leq 1$ cfu/cm <sup>2</sup> , no HAI pathogen)	163/216	75.5%
	Light growth ( $>1$ – $2.5$ cfu/cm <sup>2</sup> and no HAI pathogen)	17/216	7.9%
	Insufficient ( $>2.5$ cfu/cm <sup>2</sup> or HAI pathogen)	36/216	16.6%
Manual	Successful disinfected ( $\leq 1$ cfu/cm <sup>2</sup> , no HAI pathogen)	104/106	98.1%
	Light growth ( $>1$ – $2.5$ cfu/cm <sup>2</sup> and no HAI pathogen)	1/106	0.9%
	Insufficient ( $>2.5$ cfu/cm <sup>2</sup> or HAI pathogen)	1/106	0.9%

HAI, healthcare-associated infection.

procedure. After sampling, the swabs were placed in the associated screw cap tube with 2.5 mL neutralizing transport medium and were immediately transported to the laboratory.

Tubes with swabs were vortexed for 30 s to elute bacteria into transport medium. To determine total viable colony count (cfu/cm<sup>2</sup>) of surfaces, quantitative cultures were conducted in double determination by plating out 200  $\mu$ L (detection limit  $<6$  cfu/surface) of transport medium or an appropriate 10-fold dilution for untreated surfaces on Columbia agar with 5% Sheep Blood (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). In addition, 200  $\mu$ L each were spread out on Mannitol Salt Agar (Thermo Scientific, Schwerte, Germany), Slanetz and Bartley (Thermo Scientific), MaC Conkey (Thermo Scientific) and Sabouraud-Dextrose-Agar (Thermo Scientific) culture plates to detect relevant nosocomial pathogens. The plates were incubated for 48 h at 37 °C under aerobic conditions and colony counts were determined in correlation to the surface (cfu/cm<sup>2</sup>).

To detect relevant pathogens, morphologically conspicuous colonies were identified using matrix-assisted laser desorption/ionization–time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry and the MALDI Biotyper® database (Bruker, Bremen, Germany). If *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium* were identified, further investigation for the presence of oxacillin or vancomycin resistance were performed using VITEK 2 (bioMérieux, Nürtingen, Germany) for automated antibiotic susceptibility testing.

The effectiveness of the disinfection was assessed using two different evaluation criteria, the total colony counts and the detection of relevant pathogens. Successful disinfection was defined as total colony count of  $<1$  cfu/cm<sup>2</sup> and lack of potential pathogens. Subsequently, logarithmic reduction values (LRVs) were calculated by subtracting the log<sub>10</sub> value of mean total colony count per room and position before and after disinfection. If the calculated mean value per cm<sup>2</sup> was less than 1, log<sub>10</sub> of 1 was used to calculate LRVs, analogues to DIN EN 17272 [18]. Finally, the LRVs of UVCD and MD were compared. Therefore, pairwise comparison using *t*-test was performed with statistical software R (version 4.2.2 [19]) and R studio (version 2022.12.0 [20]) and activated package *rstatix* [21]. As described in DIN EN 14885, differences were defined as significant if *P*-value was less than 0.05 [15].

## Results

The examination of defined surfaces of examination chairs before UVCD and MD showed a mean contamination of 23.3 and 29.7 cfu/cm<sup>2</sup>, respectively. No relevant difference in mean contamination before UVCD and MD at the individual sampling areas was observed. Of the surfaces examined, the headboard

was the most contaminated surface for both examination time points (median: 27.4 cfu/cm<sup>2</sup>, inter-quartile range (IQR) 42.2 and median 37.3 cfu/cm<sup>2</sup>, IQR: 171.0) followed by control panel (median: 12.1 cfu/cm<sup>2</sup>, IQR: 21.1 and 19.8 cfu/cm<sup>2</sup>, IQR: 20.6), patient call button (median: 9.3 cfu/cm<sup>2</sup>, IQR: 12.7 and 14.8 cfu/cm<sup>2</sup>, IQR: 10.3), armrest right (median: 8.0 cfu/cm<sup>2</sup>, IQR: 15.4 and 9.3 cfu/cm<sup>2</sup>, IQR: 7.4), armrest left (median 5.0 cfu/cm<sup>2</sup>, IQR: 6.2 and 9.1 cfu/cm<sup>2</sup>, IQR: 7.3) and seat (median: 3.9 cfu/cm<sup>2</sup>, IQR: 7.4 and 4.8 cfu/cm<sup>2</sup>, IQR: 7.3) (Figure 1a).

Before UVCD, *E. faecium* was detected on 5/216 and *S. aureus* on 18/216 surfaces. Meticillin resistance was found in seven of 18 *S. aureus* whereas for the detected *E. faecium* no vancomycin resistance was observed. Before MD, *E. faecium* were identified on 6/106 and *S. aureus* on 12/106 surfaces. Here, four of six *E. faecium* were classified as vancomycin-resistant (VRE). However, no MRSA was observed (Supplementary Table S1).

After UVCD a median contamination of 0.35 cfu/cm<sup>2</sup> was determined. Overall, 163 of 216 (75.5%) surfaces were disinfected successfully (Table I). However, 16.6% of the examined surfaces showed insufficient disinfection (Table I). On three surfaces, *S. aureus* and *E. faecium* were detected even after UVCD (Supplementary Table S1). The UVCD without prior cleaning achieved mean LRVs in the range of 0.5–1.2 log<sub>10</sub> (Figure 1b, Supplementary Table S2).

Following MD with alcohol-soaked wipes, a median surface contamination of 0.1 cfu/cm<sup>2</sup> was detected. A total of 104 of 106 (98.1%) of the investigated surfaces were classified as successfully disinfected. Insufficient disinfection was detected on one of 106 surfaces, whereby no *S. aureus* and *E. faecium* were identified (Supplementary Table S1). Performing MD resulted in mean LRV in a range between 0.8 and 1.8 log<sub>10</sub> (Figure 1b, Supplementary Table S2).

Pairwise *t*-test revealed no statistically significant differences in LRV at armrest right, control panel, call button and seat. LRVs at headboard (95% confidence interval (-1.17; -0.25), *P*=0.004) and armrest left (95% confidence interval (-0.516; -0.009), *P*=0.04) were observed to be statistically significant different (Figure 1a).

## Discussion

To reduce the risk of patients acquiring nosocomial infections because they are cared for in patient rooms previously occupied by infected or colonized patients and to improve disinfection success, the use of automatic UVCD devices in hospitals has increased in recent years. Although there is no appropriate harmonized European or international standard for efficacy evaluation today, with the exception of the recently

published British Standard BS 8628:2022 [13], inactivation of various pathogens on surfaces following irradiation with whole-room UVCD devices was claimed by the manufacturers [22]. Additionally, the stated efficacy in the manufacturer's instructions and in the literature are mostly not comparable, due to differences in test procedures, surface properties, target pathogens, room conditions and the diversity of the devices [13]. Furthermore, there is indication that test organisms used in laboratory testing may not be sufficiently representative for assessing efficacy, as clinical isolates may have an increased tolerance to UV-C [14]. To achieve effective disinfection and improvement of patient safety, efficacy testing standards which are rigorous, reliable and meaningful for reality are required [23].

Even though appropriate standards for efficacy testing in the laboratory could be created, the clinical settings in which the devices are used are very different and individual. Therefore, verification testing in the respective clinical environment is recommended [9]. In particular, when considering replacing standard disinfection procedures with novel products for which no suitable standardized test procedure exists, it is recommended that comparable field tests are performed to verify that the test product is as least as effective as established product [15].

Developing a reproducible and meaningful test procedure to verify effectiveness in the real world is often a challenge. Contamination of inanimate surfaces in hospital environment is generally low [5,15,16], such that calculation of typical logarithmic reduction is not appropriate [15]. Therefore, an adaptation in evaluation criteria has to be made. The absence of statistically significant differences between the results of the established and the novel procedures was used as an effectiveness criterion according to DIN EN 14885 [15]. As this can also occur when both procedures are equally inadequate, the evaluation criteria "achieve a state of a clean surface" was added. Both criteria together enable a realistic verification of efficacy in reality. To be able to use these evaluation criteria at all, it is necessary to have naturally regularly and uniformly contaminated surfaces, which is often a crucial problem in reality. Due to the daily uniform use, with long contact times the hand contact surfaces selected in this study were shown to fulfil these criteria. During the study period of nine weeks, comparable bacterial counts of 23.3 and 29.7 cfu/cm<sup>2</sup> on average were detected for the examination chairs, indicating a suitable setting for efficacy testing of disinfection procedures. Furthermore, the tested surfaces are made of typical clinical surface material such as coated plastics and imitation leather and frequently showed visible organic contamination with blood residues, skin flakes and fat. In addition, relevant nosocomial pathogens *E. faecium* and *S. aureus* were found. These highly challenging but realistic conditions enable the evaluation of efficacy under real conditions.

The headboard was identified as the most contaminated surface, which is plausible due to the permanent direct contact with the head of the patient without the presence of clothes. The control panel and call button were also in direct contact with the skin and had higher contamination levels, while the seat and armrests were less contaminated. On approximately 11% and 19% of surfaces *E. faecium* or *S. aureus* were detected before UVCD and MD, respectively. Although a much higher UV-C dose was used compared to previous studies [14,17] and bacterial contamination is lower, *E. faecium* and *S. aureus* were

detected even after UVCD, while no detection occurred after MD.

The total number of colony forming units was decreased from an average of 23.3 before to 1.98 cfu/cm<sup>2</sup> after UVCD and 29.7 before to 0.26 cfu/cm<sup>2</sup> after MD. Rutala *et al.* reported a similar decrease of 384 cfu per site to 19 cfu after UVCD without prior cleaning [24]. In another study, the median number of cfu per sample was reduced from 110 to 4 [25]. Both the results of the cited studies and the present results showed LRVs in the range of 0.9–1.3. These reductions differ from LRVs of >3–4 for various multi-drug-resistant pathogens evaluated in laboratory experiments [12]. However, this is comprehensible when test conditions were taken into account. Besides a rather low surface load in reality, the presence of dirt and shadows, among other things [9,13,26], influences the achievable reduction. Also the incomplete inactivation of microorganisms after full compliant alcohol-based disinfection is consistent with previously published findings. Frickmann *et al.* observed that the microbial bioburden on medical devices was not completely removed after performing disinfectant cleaning [5]. Similar results were obtained by Cheng *et al.* who investigated the efficacy of the wipe-rinse disinfection method with sodium hypochlorite for decontaminating MRSA-contaminated bed rails [27]. MRSA was shown to be reduced from 4.4 cfu/cm<sup>2</sup> before to 0.4 cfu/cm<sup>2</sup> after MD [27]. In another publication pre-moistened alcohol-based disinfection wipes were tested to inactivate microbial bioburden on keyboards in a veterinary teaching hospital [28]. The mean contamination on the surface was reduced from 47.42 to 17.02 cfu/cm<sup>2</sup> after MD [28].

In addition to the reduction, the success of disinfection was evaluated. In contrast to previously defined benchmarks [29,30], surfaces with <1 cfu/cm<sup>2</sup> and no detection of healthcare-associated pathogens were assessed as successfully disinfected. This deviating definition was made because the evaluation criteria usually refer to assessment of cleanliness in routine [29,30]. As the samples were taken immediately after the end of the exposure time, a more critical value was defined, as the period of recontamination, was only very short. This was in contrast to routine operation, where the influence of recontamination needs to be considered when setting benchmarks. Automated UVCD achieved 76% successful disinfection whereas MD reached 98%. When evaluating these results, it must be considered that MD was performed always by one well-trained investigator, who operated in full accordance with manufacturer's instructions and specified disinfection procedures. Successful MD is mainly dependent on correct application technique, compliance with the required exposure times and selection of appropriate products [1]. However, achieving full compliance with this is difficult, because the process is always subject to human behaviour, which is influenced by time pressures, usually poor remuneration, repetitive and physically demanding work and, frequently, language barriers [8,31]. As these factors had no influence in this study, the results obtained here are to be evaluated as the result of an optimally performed disinfection.

The statistical comparison of the differences in LRVs showed significant results at headboard ( $P<0.01$ ) and armrest right ( $P<0.05$ ). These results indicate that, assuming full compliance with standard disinfection protocol, pre-soaked alcohol-based wipe disinfection achieves greater reduction than UVCD without prior cleaning. However, significant differences in LRVs were only observed at two of six surfaces tested.

As previously shown with monitoring by fluorescent marker method, MD compliance was in the range of 49% [32] to 63% [33]. In addition, 55% of the surfaces were found to be contaminated with multi-resistant pathogens even after terminal disinfection [34]. Based on this knowledge, it can be assumed that person-independent whole-room UVCD has the potential to increase disinfection success in routine, even without prior cleaning. However, claimed reductions achieved in laboratory experiments are not accessible in routine practice.

Some limitations need to be mentioned. Calculated LRVs were partly dependent on the number of colonies detected before disinfection. As the bacterial count before MD was slightly higher (statistically not significant) than before UVCD, the calculated LRV for MD may be overestimated. Because natural surface contamination fluctuates depending on use, environmental conditions and micro-organisms, this is a factor whose influence cannot be avoided. The large number of examinations nevertheless makes it possible to draw conclusions about the effectiveness. In addition, the detection of relevant pathogens after disinfection, although a UVCD that was effective in laboratory experiments was used, underlines the importance of field tests, even if slight fluctuations have to be accepted for this. Another fact to consider is that contrary to the usual recommendations for the use of automatic UVCD processes, the efficacy was tested without prior cleaning. Dirt and organic material present on the surface can reduce the effectiveness of UVCD by protecting micro-organisms underneath from direct irradiation through shadowing [9,26]. However, because it is known that physical wiping and cleaning not only removes organic material but also micro-organisms [31], a measurement and determination of reduction with prior cleaning would not allow a statement on the sole effectiveness of UVCD, but only on the effect combined with the cleaning performance. However, it can be assumed that higher LRVs could be achieved if organic material were removed in advance. To address this topic, future work should be investigated.

Overall, this field test showed that UVCD without prior mechanical cleaning could not achieve complete disinfection success in practice. This observation is in accordance with current recommendations for use and implementation [9]. With regard to usability, UVCD as an additive is time-consuming and difficult to integrate into routine processes of environmental cleaning. In cases of single-bed rooms, after the end of contact isolation measures due to pathogens with high tenacity and in areas where patients are possibly at risk for acquiring hospital pathogens and no persons are present outside operating hours, an additional use of automated UVCD might be suitable to close the gap of insufficient MD. However, at this stage, it cannot be recommended to replace MD.

To date there is no appropriate harmonized standard for laboratory efficacy testing of whole-room UVCD devices. Furthermore, it is known that the effectiveness in reality can differ greatly from the effectiveness under test conditions. Therefore, establishment of reproducible and realistic field tests to evaluate efficacy and to compare standard procedures with novel products is of great importance. A comparison between fully compliant MD with alcoholic pre-soaked wipes and UVCD without prior cleaning of naturally contaminated surfaces showed a greater reduction after MD for two of six surfaces. However, operator-independent UVCD already reached successful disinfection of 75%, which might be

increased by prior cleaning of the surfaces. Considering the low success rate of disinfection in hospitals, this result nevertheless offers the possibility of improving disinfection performance when used in combination with mechanical cleaning or disinfection. Conducting such field tests prior to implementation of novel procedures enables important knowledge about efficacy of disinfection in hospital environment.

## Acknowledgements

We thank Rieke Hinrichs and Laura Carlsen for excellent technical assistance.

### Author contributions

B.K.: Methodology, software, formal analysis, investigation, data curation, writing – original draft, visualization. A.U.: Conceptualization, validation, writing – review and editing, supervision. G.F.: Formal analysis, investigation, visualization, writing – original draft. C.B.C.: Validation, formal analysis, writing – review and editing, project administration. H.B.: Methodology, software, visualization, writing – review and editing. E.M.K.: Validation, data curation, writing – review and editing. P.M.M.: Investigation, writing – original draft. F.H.H.B.: Conceptualization, methodology, resources, writing – original draft, writing – review and editing, supervision, project administration, funding acquisition. J.K.: Conceptualization, methodology, resources, writing – original draft, supervision, funding acquisition.

### Conflict of interest statement

The authors declare that they have no competing interests.

### Funding

This work was supported by the Freie und Hansestadt Hamburg, Behörde für Arbeit, Gesundheit, Soziales, Familie und Integration [grant number Z|92961|2020|G500-02.10/10,014]. The manufacturer of the UV-C robot enabled an exchange of model B for model C free of charge.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2023.07.017>.

## References

- [1] Hall L, Mitchell BG. Cleaning and decontamination of the healthcare environment. In: *Decontamination in hospitals and healthcare*. Elsevier; 2020. p. 227–39.
- [2] Otter JA, Yezli S, Barbut F, Perl TM. An overview of automated room disinfection systems: when to use them and how to choose them. In: *Decontamination in hospitals and healthcare*. Elsevier; 2020. p. 323–69.
- [3] Christenson EC, Cronk R, Atkinson H, Bhatt A, Berdiel E, Cawley M, et al. Evidence map and systematic review of disinfection efficacy on environmental surfaces in healthcare facilities. *Int J Environ Res Public Health* 2021;18:11100.
- [4] Uy B, Read H, van de Pas S, Marnane R, Casu F, Swift S, et al. The efficacy of commercial decontamination agents differs between standardised test settings and research laboratory usage for a variety of bacterial species. *PeerJ* 2022;10:e13646.

- [5] Frickmann H, Bachert S, Warnke P, Podbielski A. Validated measurements of microbial loads on environmental surfaces in intensive care units before and after disinfecting cleaning. *J Appl Microbiol* 2018;124:874–80.
- [6] Wu Y-L, Yang X-Y, Ding X-X, Li R-J, Pan M-S, Zhao X, et al. Exposure to infected/colonized roommates and prior room occupants increases the risks of healthcare-associated infections with the same organism. *J Hosp Infect* 2019;101:231–9.
- [7] Cohen B, Cohen CC, Løyland B, Larson EL. Transmission of health care-associated infections from roommates and prior room occupants: a systematic review. *Clin Epidemiol* 2017;9:297–310.
- [8] Assadian O, Harbarth S, Vos M, Knobloch JK, Asensio A, Widmer AF. Practical recommendations for routine cleaning and disinfection procedures in healthcare institutions: a narrative review. *J Hosp Infect* 2021;113:104–14.
- [9] Beswick AJ, Fry C, Bradley CR, Pottage T, Sharpe S, Hail CF, et al. Automated room decontamination: report of a Healthcare Infection Society Working Party. *J Hosp Infect* 2022;124:97–120.
- [10] Masjoudi M, Mohseni M, Bolton JR. Sensitivity of bacteria, protozoa, viruses, and other microorganisms to ultraviolet radiation. *J Res Nat Inst Stand Tech* 2021;126:126021.
- [11] Mariita RM, Randive RV. Disinfection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Acinetobacter baumannii* using Klaran WD array system. *Access Microbiol* 2021;3:194.
- [12] Jelden KC, Gibbs SG, Smith PW, Hewlett AL, Iwen PC, Schmid KK, et al. Comparison of hospital room surface disinfection using a novel ultraviolet germicidal irradiation (UVGI) generator. *J Occup Environ Hyg* 2016;13(9):690–8.
- [13] Demeersseman N, Saegeman V, Cossey V, Devriese H, Schuermans A. Shedding a light on ultraviolet-C technologies in the hospital environment. *J Hosp Infect* 2023;132:85–92.
- [14] Knobling B, Franke G, Belmar Campos C, Büttner H, Christner M, Klupp EM, et al. Tolerance of clinical vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates against UV-C light from a mobile source. *Antimicrob Resist Infect Control* 2023;12(1):63.
- [15] DIN - German Institute for Standardization e.V. Chemical disinfectants and antiseptics – application of European Standards for chemical disinfectants and antiseptics; German version EN 14885:2022 + AC:2023(DIN EN 14885:2023-07). Berlin: Beuth Verlag GmbH.
- [16] Tanner WD, Leecaster MK, Zhang Y, Stratford KM, Mayer J, Visnovsky LD, et al. Environmental contamination of contact precaution and non-contact precaution patient rooms in six acute care facilities. *Clin Infect Dis* 2021;72:58–16.
- [17] Knobling B, Franke G, Carlsen L, Belmar Campos C, Büttner H, Klupp EM, et al. Phenotypic variation in clinical *S. aureus* isolates did not affect disinfection efficacy using short-term UV-C radiation. *Microorganisms* 2023;11:1332.
- [18] DIN - German Institute for Standardization e.V. Chemical disinfectants and antiseptics – methods of airborne room disinfection by automated process – determination of bactericidal, mycobactericidal, sporicidal, fungicidal, yeasticidal, virucidal and phagocidal activities; German version EN 17272:2020. Berlin: Beuth Verlag GmbH.
- [19] R Core Team. R. A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2022.
- [20] Posit team. RStudio: integrated development environment for R. Posit software. Boston, MA: Posit Software, PBC; 2022.
- [21] Kassambara Alboukadel. Rstatix: pipe-friendly framework for basic statistical tests. 2021.
- [22] Vincent RL, Rudnick SN, McDevitt JJ, Wallach FR. Toward a test protocol for surface decontamination using a mobile whole-room UVGI device. *Photochem Photobiol* 2021;97(3):552–9.
- [23] Kreitenberg A, Martinello RA. Perspectives and recommendations regarding standards for ultraviolet-C whole-room disinfection in healthcare. *J Res Nat Inst Stand Tech* 2021;126:126015.
- [24] Rutala WA, Gergen MF, Weber DJ. Room decontamination with UV radiation. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2010;31:1025–9.
- [25] Anderson DJ, Gergen MF, Smathers E, Sexton DJ, Chen LF, Weber DJ, et al. Decontamination of targeted pathogens from patient rooms using an automated ultraviolet-C-emitting device. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2013;34:466–71.
- [26] Mehta I, Hsueh H-Y, Taghipour S, Li W, Saeedi S. UV disinfection robots: a review. *Rob Auton Syst* 2023;161:104332.
- [27] Cheng KL, Boost MV, Chung JWY. Study on the effectiveness of disinfection with wipes against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and implications for hospital hygiene. *Am J Infect Control* 2011;39:577–80.
- [28] Wong EK, Burgess BA, Brainard BM, Greene CE, Hurley DJ, Koenig A. The comparative efficacy of disinfectant wipes on common-use computer keyboards in a veterinary teaching hospital. *Can Vet J* 2020;61:69–74.
- [29] Malik RE, Cooper RA, Griffith CJ. Use of audit tools to evaluate the efficacy of cleaning systems in hospitals. *Am J Infect Control* 2003;31:181–7.
- [30] Dancer SJ. Controlling hospital-acquired infection: focus on the role of the environment and new technologies for decontamination. *Clin Microbiol Rev* 2014;27(4):665–90.
- [31] Dancer SJ, Kramer A. Four steps to clean hospitals: LOOK, PLAN, CLEAN and DRY. *J Hosp Infect* 2019;103:e1–8.
- [32] Carling PC, Parry MF, Bruno-Murtha LA, Dick B. Improving environmental hygiene in 27 intensive care units to decrease multidrug-resistant bacterial transmission. *Crit Care Med* 2010;38:1054–9.
- [33] Meyer J, Nippak P, Cumming A. An evaluation of cleaning practices at a teaching hospital. *Am J Infect Control* 2021;49:40–3.
- [34] Chen LF, Knelson LP, Gergen MF, Better OM, Nicholson BP, Woods CW, et al. A prospective study of transmission of multidrug-resistant organisms (MDROs) between environmental sites and hospitalized patients—the TRANSFER study. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2019;40(1):47–52.



## 5 Zusammenfassung

Zur Verbesserung von Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen in Krankenhäusern werden automatische Ultraviolett-C (UV-C) Raumdeshinfektionsgeräte vielfach als Lösungsansatz diskutiert. Die Wirksamkeit von UV-C wurde bereits gegen ein breites Spektrum von Mikroorganismen nachgewiesen. Hierbei wurden Unterschiede in den spezifischen Dosen und dem Ausmaß der Keimreduktion festgestellt. Da Mikroorganismen unter umweltbedingtem Stress eine Vielzahl von Schutzfaktoren ausbilden können, um ihre Tenazität und somit unter Umständen auch die Toleranz gegenüber UV-C Strahlen zu erhöhen, ist es fraglich, inwiefern sich genetisch diverse klinische Isolate im Vergleich zu Standardtestorganismen (StO) unterschiedlich verhalten. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurden Oberflächen mit 10 genetisch divergenten Vancomycin-resistenten *Enterococcus faecium* (VRE), acht Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) und einem gering pigmentierten klinischen *S. aureus* Isolat sowie dem jeweiligen StO kontaminiert und unter standardisierten Bedingungen mit UV-C Dosen von 22 und 50 mJ/cm<sup>2</sup> bestrahlt. Der Vergleich der erzielten Reduktionen ergab signifikante Unterschiede sowohl zwischen den klinischen VRE Isolaten als auch dem StO, während für MRSA mit Ausnahme eines Vergleiches keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt wurden. Klinische Isolate können demnach unter Umständen toleranter gegen UV-C sein als StO. Zudem unterscheiden sich die Wirksamkeitsprüfungen unter Laborbedingungen stark von der Realität. Es ist daher fraglich, ob unter diesen Bedingungen erzielte Reduktionen auch in der Realität erreicht werden. Deshalb ist die Entwicklung und Etablierung von repräsentativen Feldstudien zur Prüfung der Wirksamkeit von UV-C Desinfektionsverfahren (UVCD) in der komplexen Krankenhausumgebung entscheidend. In der vorliegenden Arbeit konnten Oberflächen identifiziert werden, welche natürliche und nahezu gleichmäßige bakterielle Kontaminationen aufweisen, sodass die Durchführung von Feldstudien ermöglicht wird. Unter diesen Bedingungen wurde die Desinfektionsleistung eines automatischen UV-C Roboters ohne vorherige Reinigung mit vollständig konformer manueller Desinfektion (MD) mit vorgetränkten Wischtüchern verglichen. Für die automatische UVCD und MD wurde eine Reduktion der Bakterienzahl von 0,9 log<sub>10</sub> bzw. 1,2 log<sub>10</sub> und ein Desinfektionserfolg von 75,5 % bzw. 98,1 % ermittelt. Im Vergleich zu den Laborexperimenten wurden in der Feldstudie deutlich geringere Reduktionen erzielt. Zudem wurden relevante klinische Erreger bei der UVCD, trotz der Anwendung von unter Laborbedingungen wirksamen UV-C Dosen, nicht vollständig entfernt. Diese Ergebnisse untermauern die Notwendigkeit von Feldstudien, um die Wirksamkeit von UVCD in der Realität beurteilen zu können. Vor dem Hintergrund unzureichender Desinfektionserfolge manueller Verfahren im Krankenhausalltag, bietet die Anwendung bedienerunabhängiger UVCD durchaus ein Verbesserungspotential. Insbesondere als Zusatz zur manuellen Reinigung können solche Geräte einen zuverlässigen Lückenschluss unzureichender manueller Verfahren und somit die Erhöhung der Patientensicherheit ermöglichen.

## 6 Summary

To improve cleaning and disinfection performance in hospitals, automatic ultraviolet C (UV-C) room disinfection devices are often discussed as a solution. The effectiveness of UV-C has already been demonstrated against a broad spectrum of microorganisms, but differences in the specific doses and the extent of germ reduction have been observed. Since microorganisms under environmental stress can develop a variety of protective factors to increase their tenacity and thus possibly also their tolerance to UV-C radiation, it is questionable to what extent genetically diverse clinical isolates behave differently compared to standard test organisms (StO). To answer this question, surfaces were contaminated with 10 genetically divergent vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VRE), eight methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and one low-pigmented clinical *S. aureus* isolate as well as the respective StO and irradiated with UV-C doses of 22 and 50 mJ/cm<sup>2</sup> under standardized conditions. The comparison of the achieved reductions showed significant differences between the clinical VRE isolates and the StO, while no statistically significant differences were found for MRSA, with the exception of one comparison. Clinical isolates may therefore be more tolerant to UV-C than StO. In addition, the efficacy tests under laboratory conditions differ greatly from reality. It is therefore questionable whether reductions achieved under these conditions will also be achieved in reality. Therefore, the development and establishment of representative field studies to test the efficacy of UV-C disinfection in the complex hospital environment is crucial. In the present work, it was possible to identify surfaces that exhibit regular and almost uniform bacterial contamination, so that field studies can be carried out. Under these conditions, the disinfection performance of an automatic UV-C robot without prior cleaning was compared with fully compliant manual disinfection (MD) using pre-soaked wipes. For the automatic UV-C disinfection and MD, a reduction in bacterial count of 0.9 log<sub>10</sub> and 1.2 log<sub>10</sub> and a disinfection success of 75.5% and 98.1% were determined, respectively. Compared to laboratory experiments, the reductions achieved in the field study were significantly lower. Furthermore, relevant clinical pathogens were not completely removed during UV-C disinfection, despite the application of irradiation doses, which were effective under laboratory conditions. These results demonstrate the need to perform field studies to assess the efficacy of UV-C disinfection procedures in reality. Considering the insufficient disinfection success of manual procedures in everyday hospital practice, the use of operator-independent UV-C disinfection robots certainly offers potential for improvement. Especially as a supplement to manual cleaning and disinfection, such devices can reliably close the gap of insufficient manual procedures and thus increase patient safety.

## **7 Erklärung des Eigenanteils an den Publikationen**

Die Idee und Konzeption für die vorliegende kumulative Dissertation wurde in Zusammenarbeit zwischen dem Betreuer Prof. Dr. med. Johannes Knobloch und der Promovierenden entwickelt. Das jeweilige methodische Vorgehen in den einzelnen Publikationen wurde durch die Promovierende in Abstimmung mit dem Betreuer erarbeitet.

Sowohl die experimentellen Studien als auch die Feldstudie wurden durch die Promovierende durchgeführt. Zudem hatte die Promovierende folgende Anteile an den einzelnen Publikationen (Publikation I bis III):

- Auswertung der ermittelten Daten und Interpretation der Ergebnisse
- Durchführung der statistischen Analysen nach vorheriger Kurzberatung durch die Mitarbeitenden des Instituts für Biometrie und Epidemiologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf.
- Erstellung der Manuskripte der eingeschlossenen Publikationen
- Erstellung der verwendeten Abbildungen und Tabellen

Im Veröffentlichungsprozess der Publikationen hatte die Promovierende als Erstautorin jeweils die Hauptverantwortung.

Die zusammenfassende Darstellung der Publikationen im Rahmen der vorliegenden Synopse wurde durch die Promovierende erstellt.

## 8 Danksagung

Während meiner Promotionszeit haben mich viele Menschen sowohl fachlich als auch persönliche unterstützt, bei denen ich mich an dieser Stelle bedanken möchte.

Einen besonderen Dank richte ich an meinen Doktorvater Prof. Dr. med. Johannes Knobloch für die Überlassung des spannenden Themas im Forschungsfeld der Automatischen Raumesinfektionsverfahren, die Unterstützung bei Umsetzung der Projekte und das Ermöglichen von Teilnahmen an Kongressen und von fachlichem Austausch. Vor allem für die Vielzahl fachlich wertvoller Diskussionen, die immer kurzfristige Erreichbarkeit und Möglichkeiten zum konstruktiven Austausch sowie die Förderung meiner Fähigkeiten in der Forschung und beim wissenschaftlichen Arbeiten möchte ich mich bedanken.

Meiner Kollegin Dr. med. Gefion Franke danke ich insbesondere für die häufig sehr kurzfristige Unterstützung beim Korrekturlesen von Manuskripten, *Cover-* und *Rebuttal-Lettern* und dieser Dissertation sowie für dein immer offenes Ohr und hilfreichen Ratschläge.

Für die konstruktiven und sehr interessanten Diskussionen im Rahmen der Thesis-Komitee Besprechungen möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Katja Weisel und PD Dr. med. Schulze zur Wiesch bedanken. Zudem geht ein großer Dank an meine Kollegen der AG Knobloch, Rieke Hinrichs, Laura Carlsen und Tatjana Dill, für ihre Unterstützung bei der Laborarbeit und die immer positive Atmosphäre, auch noch in den Abendstunden. Meinen Kollegen aus dem Arbeitsbereich Krankenhaushygiene danke ich für den fachlichen Input, die wertvollen Anmerkungen und Tipps bei der Erstellung und Revision der Manuskripte und die tolle Zusammenarbeit.

Mein abschließender Dank geht an meine Familie und Freunde, die mich während meiner Promotionszeit auf ganz individuelle Weise unterstützt haben. Insbesondere meinen Eltern, Juliane und Felix, danke ich für ihre Fürsorge und ihr Vertrauen in mich, ihre bedingungslose Unterstützung und für die Begleitung durch alle Höhen und Tiefen. Jonas, vielen Dank für dein großes Verständnis, Geduld, Rückhalt und die viele positive Energie die du mir während der Erstellung dieser Arbeit gegeben hast. Ein herzlicher Dank geht an meine Geschwister und Freunde für ihr immer offenes Ohr und die tollen gemeinsamen Erlebnisse und Abende, die ermöglicht haben, dass meine Freizeit immer eine optimale Ablenkung, Spaß, Erholung und Energie- und Motivationsquelle war.

## 9 Lebenslauf

„Der Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.“

### Publikationen

Anmerkung: Die Anordnung der Publikationen ist antichronologisch.

#### Publikationen der Dissertation

Knobling B, Ulatowski A, Franke G, Belmar Campos C, Büttner H, Klupp EM *et al.* Superiority of manual disinfection using pre-soaked wipes over automatic UV-C radiation without prior cleaning. *J Hosp Infect* 2023;140:72–78. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2023.07.017>.

Knobling B, Franke G, Belmar Campos C, Büttner H, Christner M, Klupp EM *et al.* Tolerance of clinical vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates against UV-C light from a mobile source. *Antimicrob Resist Infect Control* 2023;12(1):63. <https://doi.org/10.1186/s13756-023-01259-3>

Knobling B, Franke G, Carlsen L, Belmar Campos C, Büttner H, Klupp EM *et al.* Phenotypic Variation in Clinical *S. aureus* Isolates Did Not Affect Disinfection Efficacy Using Short-Term UV-C Radiation. *Microorganisms* 2023;11(5). <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051332>.

#### Weitere Publikationen

Mayr A, Knobloch JK, Hinterberger G, Seewald V, Wille I, Kaltseis J *et al.* Interlaboratory reproducibility of a touch-transfer assay for the assessment of antimicrobial surfaces. *J Hosp Infect* 2023;134:1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2023.01.016>.

Knobloch JK, Franke G, Knobloch MJ, Knobling B, Kampf G. Overview of tight fit and infection prevention benefits of respirators (filtering face pieces). *J Hosp Infect* 2023; 134:89–96. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2023.01.009>.

Knobloch JK, Pfefferle S, Lütgehetmann M, Nörz D, Klupp EM, Belmar Campos CE *et al.* Infectivity of SARS-CoV-2 on Inanimate Surfaces: Don't Trust Ct Value. *Int J Environ Res Public Health* 2022;19(24). <https://doi.org/10.3390/ijerph192417074>

Knobling B, Franke G, Beike L, Dickhuth T, Knobloch JK. Reading the Score of the Air-Change in Airborne Microbial Load in Contrast to Particulate Matter during Music Making. *Int J Environ Res Public Health* 2022;19(16). <https://doi.org/10.3390/ijerph19169939>

Nörz D, Pfefferle S, Brehm TT, Franke G, Grewe I, Knobling B *et al.* Evidence of surface contamination in hospital rooms occupied by patients infected with monkeypox, Germany, June 2022. *Euro Surveill* 2022;27(26). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2022.27.26.2200477>

Carlsen L, Büttner H, Christner M, Franke G, Indenbirken D, Knobling B *et al.* High burden and diversity of carbapenemase-producing *Enterobacterales* observed in wastewater of a tertiary care hospital in Germany. *Int J Hyg Environ Health* 2022;242:113968. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2022.113968>

Franke G, Knobling B, Brill FH, Becker B, Klupp EM, Belmar Campos C *et al.* An automated room disinfection system using ozone is highly active against surrogates for SARS-CoV-2. *J Hosp Infect* 2021;112:108–13. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2021.04.007>

Knobling B, Franke G, Klupp EM, Belmar Campos C, Knobloch JK. Evaluation of the Effectiveness of Two Automated Room Decontamination Devices Under Real-Life Conditions. *Front Public Health* 2021;9:618263. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2021.618263>.

## **10 Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: .....