

## Srovnání citlivosti spor *Bacillus subtilis* a spor českých kmenů *Clostridium difficile* vůči dezinfekčním prostředkům

Votava M.<sup>1</sup>, Šlitrová B.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Mikrobiologický ústav LF MU a FN u svatě Anny, Brno

<sup>2</sup>Fakulta chemická, VUT Brno

### Souhrn

V prevenci nozokomiálních epidemií vyvolaných *Clostridium difficile* ribotyp 027 je důležitá kromě jiného dezinfekce okolí nemocného spolehlivě sporicidními dezinfekčními přípravky. Sporicidní aktivita konkrétních přípravků se zkouší na sporách *Bacillus subtilis*. Vyskytují se dotazy, zda přípravek, který účinkuje na spory *B. subtilis*, bude stejně dobře působit i na spory *C. difficile*. Proto jsme porovnali účinek pěti přípravků, jež jsou na českém trhu k dispozici, na spory sbírkových kmenů obou mikrobu a na spory deseti terénních kmenů *C. difficile* izolovaných ze stolic hospitalizovaných pacientů. Účinnými látkami byly: přípravek č. 1 chloramin B, č. 2 oxid chloričitý, č. 3 formaldehyd a ethan-2-dion, č. 4 kyseliny peroctová a octová a peroxid vodíku, č. 5 ethanol a propan-2-ol. K testování byla použita ředící neutralizační metoda podle ČSN EN 13704, za sporicidní byl považován přípravek snižující počet spor o více než 3 řády. Kromě standardního času 60 minut byla použita 15minutová expozice a účinek byl testován rovněž při bílkovinné zátěži. Přípravek č. 1 účinkoval na spory *C. difficile* lépe než na spory *B. subtilis*, a to i v nižší (1%) koncentraci. Rovněž vůči přípravkům č. 2 a č. 3 byly spory *C. difficile* o něco citlivější než spory *B. subtilis*. Přípravek č. 4 byl natolik sporicidní, že redukoval počet spor všech kmenů již za 15 minut o více než 4 řády; případný rozdíl v citlivosti spor nebyl patrný. Zatímco na spory *B. subtilis* přípravek č. 5 spolehlivě nepůsobil, vůči klinickým kmenům *C. difficile* překvapivě vykázal sporicidní účinek. Uzavíráme, že spory zejména terénních kmenů *C. difficile* se ukázaly být citlivější k dezinfekčním přípravkům než spory sbírkového kmene *B. subtilis*.

**Klíčová slova:** *Clostridium difficile* – *Bacillus subtilis* – spory – dezinfekce.

### Summary

#### Votava M., Šlitrová B. Comparison of Susceptibility of Spores of *Bacillus subtilis* and Czech Strains of *Clostridium difficile* to Disinfectants

An important factor in the prevention of nosocomial outbreaks caused by *Clostridium difficile* ribotype 027 is the disinfection of a patient environment by reliable sporicidal disinfectants. Sporicidal activity of particular agents is tested on spores of *Bacillus subtilis*. Questions are brought up if the disinfectant which works on *B. subtilis* spores will be equally effective on the spores of *C. difficile*. Therefore we have compared the effects of five disinfectants available on the Czech market on the spores of collection strains of both microbes and on the spores of ten *C. difficile* field strains isolated from feces of hospitalized patients. The effective substances were: disinfectant No. 1 chloramine B, No. 2 chlorine dioxide, No. 3 formaldehyde and ethan-2-dion, No. 4 peracetic and acetic acids and hydrogen peroxide, No. 5 ethanol and propan-2-ol. The testing was performed using the dilution neutralization method according to ČSN EN 13704, the agent reducing the number of spores by more than 3 orders was considered sporicidal. In addition to the standard time 60 min a 15-minutes exposition was used and the effect was tested also under the protein burden. Disinfectant No. 1 showed better effect on the *C. difficile* than *B. subtilis* spores, even in lower (1%) concentration. Similarly, the sensitivity of the *C. difficile* spores to disinfectants No. 2 and 3 was somewhat higher. The sporicidity of the disinfectant No. 4 was so high that it reduced the number of spores of all strains within 15 minutes by more than 4 orders; possible difference in the susceptibility of spores was not observed. Whereas the disinfectant No. 5 was not reliably effective on the spores of *B. subtilis*, surprisingly it showed the sporicidal effect on the spores of field *C. difficile* strains. We conclude that spores of field *C. difficile* strains in particular turned out to be more sensitive to disinfectants than the spores of the collection strain of *B. subtilis*. Therefore *B. subtilis* remains the right species for testing the sporicidal activity of disinfectants.

**Key words:** *Clostridium difficile* – *Bacillus subtilis* – spores – disinfection.

Tab. 1. Testované dezinfekční přípravky

Table 1. Disinfectants tested

Č.	Zkušební koncentrace přípravku (%)	Koncentrace účinné látky (%)	Účinná látka
1	1; 2	0,19; 0,38	chloramin B
2	0,075; 0,15	0,015; 0,03	oxid chloričitý
3	0,25; 2	0,06; 0,48 0,02; 0,17	formaldehyd glyoxal
4	0,2; 0,3	0,02; 0,03 0,12; 0,18 0,05; 0,075	kyselina peroctová peroxid vodíku kyselina octová
5	100 (80)	45 (36) 30 (24)	ethanol isopropanol

V r. 2003 byly nejprve v severoamerických nemocnicích a poté zejména ve Velké Británii i v dalších evropských zemích popsány nozokomiální epidemie vyvolané vysoce virulentním kmenem *Clostridium difficile* ribotypu 027 [13, 16]. Do června 2008 byl zaznamenán v 16 zemích, z toho v 9 vyvolal epidemie [9, 12]. Onemocnění vyvolané *C. difficile* (*C. difficile*-associated disease, CDAD) se přenáší jako typická nozokomiální infekce, probíhá jako pseudomembranózní kolitida, je provázeno průjmem a v případech typu 027 se vyznačuje těžším průběhem a vyšší mortalitou [1, 2].

Epidemiologicky závažná je rychlá kontaminace okolí průjmujícího pacienta spory *C. difficile* se v nemocničním prostředí velmi rychle šíří a jeho spory v něm přežívají po řadu měsíců. Mezi opatření, která omezují výskyt infekcí vyvolaných *C. difficile*, patří kromě jiného denní dezinfekce okolí nemocného spolehlivě sporicidními dezinfekčními přípravky [11, 21]. Mezi ně patří obecně činidla alkylační (hlavně glutaraldehyd) a oxidační (např. kyselina peroctová) včetně halogenů (pro běžnou dezinfekci především preparáty na bázi chlornanu sodného) [14].

Výběr vhodného dezinfekčního prostředku je zcela zásadní, některé přípravky nemající sporicidní aktivitu mohou dokonce zvýšit tvorbu spor. Je-li *C. difficile* vystaveno účinkům takových dezinfekčních přípravků, ocitá se ve stresu, a proto intenzivněji sporuluje [24].

Sporicidní aktivita konkrétních dezinfekčních přípravků se podle normy ČSN EN 13704 [6] zkouší na sporách kmene *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Ze strany výrobců se nyní stále častěji setkáváme s dotazem, jestli přípravek, který účinkuje na spory *B. subtilis*, bude stejně dobře působit i na spory *C. difficile*. Proto jsme se rozhodli srovnat účinek různých dezinfekčních přípravků, které jsou k dispozici v České republice, na spory obou druhů a zjistit, zda *B. subtilis* je tím správným modelovým mikroorganismem ke zjišťování sporicidní aktivity i vůči sporám *C. difficile*.

## Materiál a metody

### Použité mikroorganismy

**a) Sbírkové kmeny:** *Bacillus subtilis* ATCC 6633 a *Clostridium difficile* CCM 3593.

**b) Terénní kmeny *C. difficile*:** *C. difficile* 1 (N438053/1), 2 (N440820), 3 (N450803), 4 (N449415/1), 5 (N448876), 6 (N446248/1), 7 (N434201), 8 (N417138), 9 (N412277/2) a 10 (N406658/1). Všechny 10 kmenů bylo izolováno ze stolice pacientů Nemocnice Na Homolce v Praze. Tři nemocní byli z Prahy, ostatní pocházeli ze šesti různých okresů v Čechách.

### Testované dezinfekční přípravky

Přehled zkušebních koncentrací a druh účinné látky uvádí tab. 1. Všechny přípravky byly určeny k dezinfekci ploch a povrchů, příp. předmětů. Sporicidní účinnost výrobci deklarovali u přípravků č. 2 a 4. Testovací roztoky přípravků byly připraveny v tvrdé vodě, a to ve dvou koncentracích. Protože během testu dochází přidáním suspenze spor a zátěžových podmínek ke zředění přípravku, vycházelo se z 1,25násobku požadované zkušební koncentrace. Přípravek č. 5 bylo možno vzhledem ke zmíněnému zředění testovat nejvýše jako 80%.

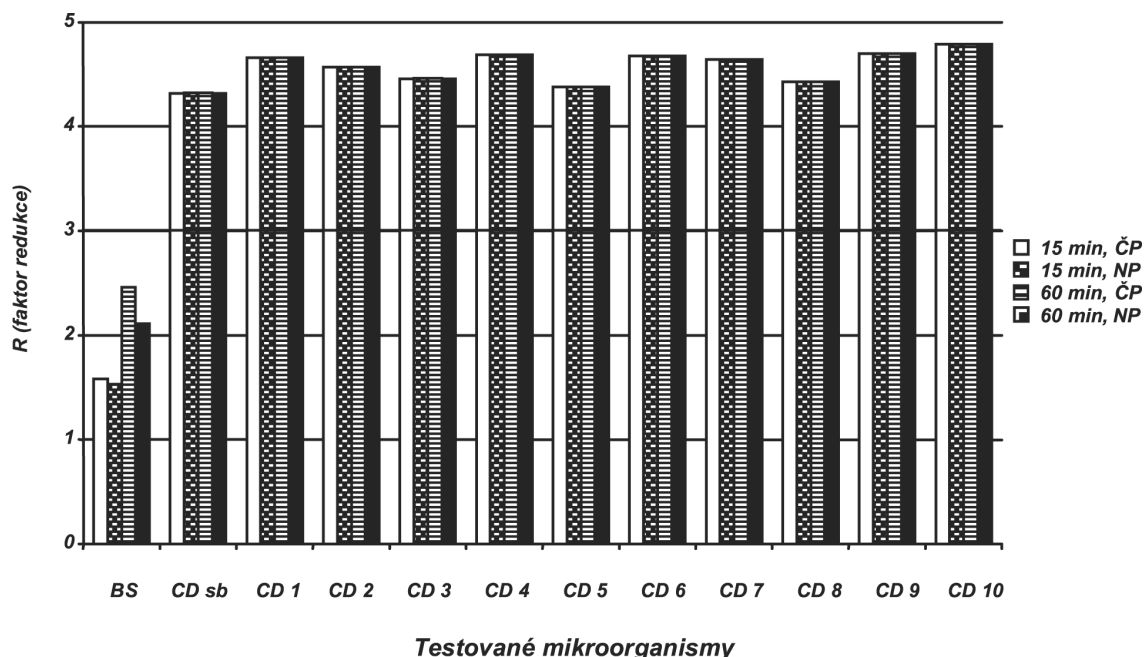
### Zkouška sporicidní aktivity

Postup vycházel z normy ČSN EN 13704 Chemické dezinfekční přípravky – Kvantitativní zkouška s použitím suspenze ke stanovení sporicidního účinku chemických dezinfekčních přípravků používaných pro potraviny, průmysl, domácnosti a veřejné prostory – Zkušební metoda a požadavky (fáze 2/stupeň 1) – což je metoda ředící neutralizační [6].

**Testovací podmínky.** Teplota: 20 °C ± 1 °C. Doba kontaktu: 15 min ± 10 s a 60 min ± 10 s. Bílkovinná zátěž: 0,3 g/l bovinního albuminu (čisté podmínky) a 3 g/l bovinního albuminu a 3 ml/l praných ovčích erytrocytů (nečisté podmínky).

**Příprava ingrediencí a provedení.** Příprava tvrdé vody a zásobní a testovací suspenze spor *B. subtilis* probíhala podle citované normy [6]. Analogicky, ovšem za podmínek anaerobní kultivace, se připravovaly zásobní a testovací suspenze spor kmenů *C. difficile*.

**Vlastní zkouška.** Všechna činidla byla vytemperována na teplotu testování. Do zkumavky byl přenesen 1 ml bílkovinné zátěže a 1 ml bakteriální suspenze spor příslušné denzity. Směs byla promíchána. Poté se přidalo 8 ml testovaného přípravku a směs byla opět promíchána. Po uplynutí požadované zkušební doby byl přenesen 1 ml směsi do 9 ml neutralizátoru obsahujícího tween 80, lecithin a cystein a obsah zkumavky byl zamíchán. Suspenze byla ponechána 2 minuty odstát. Po promíchání se z každé zkumavky přeneslo do dvou Petriho misek o průměru 9 cm po 0,5 ml suspenze a zalilo 15 ml tryptonosójeového agaru ochlazeného na 45 °C ± 5 °C. Kultivace



**Obr. 1.** Sporicidní účinnost přípravku č. 1 v 1% koncentraci. BS – *B. subtilis*; CD sb – sbírkový kmen *C. difficile*; CD 1 až CD 10 – kmeny *C. difficile* izolované ze stolice; R – faktor redukce (rozdíl logaritmu počtu spor v kontrolní suspenzi a v suspenzi po vystavení účinku dezinfekčního přípravku, pro sporicidní účinnost musí být  $R > 3$  (sloupec musí převyšovat silnou čáru); ČP – čisté podmínky testování; NP – nečisté podmínky; 15 a 60 min – testovací časy

**Fig. 1.** Sporicidal activity of disinfectant No. 1 in 1% concentration. BS – *B. subtilis*; CD sb – collection strain of *C. difficile*; CD 1 to CD 10 – *C. difficile* strains isolated from feces; R – reduction factor (the difference of spores logarithms number in the control suspension and in the suspension after the exposition to the disinfectant, for the sporicidal effect  $R > 3$  (the column must stand higher than the heavy line); ČP – clean conditions of testing; NP – dirty conditions of testing; 15 and 60 min – testing time

probíhala po 3 dny při  $30 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  pro *B. subtilis* a anaerobně při  $37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  pro *C. difficile*.

**Vyhodnocení testu.** Byly spočítány kolonie (CFU) ze všech inkubovaných misek. Hodnoty  $N_0$  a  $N_d$ , tedy počty spor v testovací suspenzi ve vodě a testovací suspenzi po vystavení působení dezinfekčního přípravku, byly stanoveny jako průměry počtu CFU vždy ze dvou Petriho misek po přepočtu na 1 ml.

Poté byly obě hodnoty ( $N_0$  a  $N_d$ ) zlogaritmovány a byl získán rozdíl těchto logaritmů  $R = \log N_0 - \log N_d$ .

**Požadavky normy.** Podle normy ČSN EN 13704 má sporicidní účinnost přípravek, který je schopen při  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  a za čistých podmínek po 60 minutách kontaktního času redukovat počet spor *B. subtilis* o více než 3 řády ( $R > 3$ ). Přitom se počty CFU v testovací suspenzi s vodou ( $N_0$ ) mají nacházet v intervalu  $1,5 \times 10^6 - 5 \times 10^6$  [6].

Pokusy jsme rozšířili o doplňující kontaktní čas 15 minut a o nečisté podmínky (3 g/l bovinního albuminu a 3 ml/l erytrocytů), o sbírkový kmen *C. difficile* a o deset kmenů *C. difficile* izolovaných z klinického materiálu.

## Výsledky

### 1. Sporicidní účinnost dezinfekčního přípravku č. 1 (účinná látka chloramin B)

Testovaný přípravek č. 1 v 1% koncentraci v časech působení 15 a 60 minut za podmínek nižšího i vyššího znečištění metodou ředící neutralizační titr spor *B. subtilis* o více jak 3 řády neredukoval. Za stejných podmínek ale snižoval titr

spor sbírkového kmene i všech 10 kmenů *C. difficile* izolovaných z klinického materiálu o více než 4 řády (obr. 1).

Ve 2% koncentraci přípravek č. 1 během 15 minut titr spor *B. subtilis* o více jak 3 řády ještě neredukoval, po 60 minutách však již sporicidní účinnost prokázal. Titr spor všech kmenů *C. difficile* ale snížil i během pouhých 15 minut o více než 4 řády.

Na spory *C. difficile* tedy přípravek č. 1 účinkoval lépe než na spory *B. subtilis*, a to i v nižší (1%) koncentraci.

### 2. Sporicidní účinnost dezinfekčního přípravku č. 2 (účinná látka oxid chloričitý generovaný in situ)

V nižší koncentraci (0,075%) přípravek č. 2 redukoval počet spor *B. subtilis* o více než 3 řády až po 60 minutách, a to jen za podmínky nižšího znečištění (požadavkům normy tedy ale vyhověl). S výjimkou sbírkového kmene a terénního kmene č. 3 však v této koncentraci redukoval počet spor *C. difficile* o více než 3 řády již během 15 minut, a to i za nečistých podmínek. Za 60 minut byl i pro zmíněné dva kmeny spolehlivě sporicidní.

V 0,15% koncentraci přípravek č. 2 selhal jen v případě spor *B. subtilis* při 15minutové expozici za vyššího znečištění, kdy redukoval počet spor

jen o 2 řády. V ostatních případech u *B. subtilis* vyhověl požadavku normy na redukci počtu spor o více než 3 řády a titer spor *C. difficile* snižoval dokonce o více než 4 řády.

Z uvedeného plyne, že vůči přípravku č. 2 byly spory *C. difficile* o něco citlivější než spory *B. subtilis*.

### 3. Sporocidní účinnost dezinfekčního přípravku č. 3 (účinné látky formaldehyd a glyoxal)

V nižší koncentraci (0,25 %) snížil testovaný přípravek č. 3 titer spor standardního kmene *B. subtilis* o více než 3 řády až po 60minutové expozici. Pokud jde o spory *C. difficile*, u sbírkového kmene a čtyř terénních kmenů se jejich titer snížil o 3 řády již po 15 minutách i v podmínkách vyššího znečištění. Titer spor dalších tří kmenů byl po 15 minutách redukován o 3 řády jen za čistých podmínek, titer zbývajících tří terénních kmenů se za vyššího znečištění podařilo snížit o 3 řády až po 60 minutách.

I osmkrát koncentrovanější (2%) přípravek č. 3 snížil titer spor *B. subtilis* o 3 řády až po 60 minutách. U sbírkového kmene *C. difficile* a tří terénních kmenů se redukce počtu spor po 15 minutách blížila 3 řádům, ale nepřesáhla je. Šedesátiminutová expozice vedla spolehlivě ke snížení titru spor u všech klostridiových kmenů o více než 4 řády.

I vůči přípravku č. 3 se spory *C. difficile* jevíly citlivější než spory *B. subtilis*.

### 4. Sporocidní účinnost dezinfekčního přípravku č. 4 (účinné látky peroxid vodíku a kyseliny peroctová a octová)

V obou testovaných koncentracích (0,2 a 0,3 %) a za obou podmínek znečištění snižoval přípravek č. 4 počet spor jak *B. subtilis*, tak všech kmenů *C. difficile* již za 15 minut o více než 4 řády a prokázal tedy spolehlivou sporocidní účinnost. Případný rozdíl v citlivosti spor obou bakteriálních druhů nebyl patrný.

### 5. Sporocidní účinnost dezinfekčního přípravku č. 5 (účinné látky ethanol a isopropanol)

Přípravek č. 5 (přidáním suspenze spor a bílkovinné zátěže zředěný na 80 %) neredukoval počet spor *B. subtilis* ani sbírkového kmene *C. difficile* o 3 řády ani za 60 minut. Překvapivě však snižoval počet spor všech klinických kmenů *C. difficile* o více než 3 řády po 60 minutách, z toho u 3 kmenů již během 15 minut i za podmínek vyššího znečištění. Zatímco na spory *B. subtilis* přípravek č. 5 spolehlivě nepůsobil, u klinických kmenů *C. difficile* se projevil v různém stupni jako sporocidní.

## Diskuse

Jedním z hlavních rezervoárů spor *C. difficile* mohou být předměty, podlahy a povrchy, které jsou kontaminovány spory této bakterie od kolonizovaného pacienta nebo asymptomatického přenašeče. Proto je výběr vhodného způsobu dezinfekce nemocničního prostředí jedním ze stěžejních prvků prevence. Nejčastěji se k běžné dezinfekci používají chlorové preparáty, jsou levné a spolehlivě účinkují na spory [10, 11, 21]. Bylo prokázáno, že počet pacientů s CDAD klesl o více než 60 % po výměně přípravku založeného na kvarterní amoniové soli za dezinfekční prostředek na chlornanové bázi [15]. Po zavedení komplexního přístupu včetně dezinfekce nemocničního prostředí 10% roztokem chlornanu sodného se podařilo dosáhnout 66% snížení počtu nozokomiálních infekcí *C. difficile* [23]. V souvislosti s dezinfekcí prostředí jsou důležité dva nálezy – jednak nedostatečné koncentrace některých dezinfekčních, resp. čisticích prostředků mohou sporulaci *C. difficile* zesilovat [24], jednak epidemicky závažné kmeny mají sklon ke zvýšené tvorbě spor [cit. dle 11 a 21].

V porovnávání látek uvolňujících chlor jako účinnou látku měl největší sporocidní aktivitu na spory *B. subtilis* chlornan sodný. Nižší aktivitu vykázal dichlorisokyanurát sodný a nejnižší chloramín T [4]. V naší studii přípravek č. 1, který je na chloraminové bázi, dokázal v 1% koncentraci inaktivovat spory všech kmenů *C. difficile* již během 15 min, ale počet spor *B. subtilis* redukoval dostatečně jen ve dvojnásobné koncentraci a až po 60 min.

Lepší účinnost než samotný chlornan sodný měly na spory *B. subtilis* jeho směsi s methanolem, jako neúčinnější se ukázala směs obsahující 50 % methanolu a chlornanu (2000 mg volného chloru/l) [5]. Protože však chlornan ve vyšších koncentracích způsobuje korozi, v navazující studii autoři testovali směsi s nižší koncentrací, ale upraveným pH. Srovnatelnou aktivitu jako výše uvedená směs prokázal 1% methanol s chlornanem (100 mg chloru/l) v rozmezí pH 7,6 – 8,1 [7].

Další studie [17] srovnávala účinek běžného chlornanového přípravku pro domácnost jednak samotného, jednak okyseleného octem, dále roztoku vyvíjejícího oxid chloričitý a přípravku se 7% peroxidem vodíku na spory *B. subtilis*, *C. sporogenes* a *C. difficile* zaschlé na nosičích. Nejrychleji (během 10 minut) snížily počet spor všech tří druhů o 6 řádů chlornan (s 5000 mg volného Cl<sub>2</sub>/l) a okyselený chlornan, přípravek s peroxidem jen u *C. difficile*. Oxid chloričitý inaktivoval spory *B. subtilis* a *Clostridium sporogenes* do 15 minut,

spory *C. difficile* do 30 min. Relativní citlivost spor *C. difficile* kromě typu přípravku závisela i na kultivačním médiu, v němž se jejich suspenze připravovala, jednoznačné závěry ale z výsledků nevyplynuly.

Superoxidovaná voda obsahující směs 1,44% kyseliny chlorné a volných chlorových radikálů inaktivovala spory *C. difficile* během 10 minut o více než 6 řádů, ovšem v přítomnosti 5 % koňského séra jen o 4 řády [20].

V naší studii přípravek č. 2 generující oxid chloričitý *in situ* redukoval počet spor všech testovaných mikroorganismů o 3 řády až během 60 minut. V čase 15 minut v přítomnosti vyšší bílkovinné zátěže ale signifikantně snížit počet spor *B. subtilis* nedokázal. Spory *C. difficile* byly vůči přípravku č. 2 asi o jeden řád citlivější než spory *B. subtilis*.

Účinky glutaraldehydu, formaldehydu, peroxidu vodíku, peroctové kyseliny, chlornanu sodného a fenolu na spory *B. subtilis* srovnává studie z r. 1996 [19]. Sporicidní aktivita těchto látek klesala od peroxidu vodíku přes glutaraldehyd ke kyselině peroctové, která působila srovnatelně jako chlornan sodný; nižší aktivitu měl formaldehyd a zcela nejnižší fenol. I v naší práci přípravek č. 4 s kyselinou peroctovou a peroxidem vodíku byl účinnější než přípravek č. 3 obsahující formaldehyd. Glutaraldehyd v různých koncentracích testovali na sporách *C. difficile* Rutala et al. [18]. Dospěli k závěru, že pro expozice 10 až 30 minut nesmí účinná koncentrace glutaraldehydu klesnout pod 2 % a aniž uvádějí konkrétní data, citují [8], že vůči glutaraldehydu jsou spory *C. difficile* citlivější než spory mikroorganismů doporučených ve sporicidním testu americké Association of Official Analytical Chemists, totiž *B. subtilis* a *C. sporogenes*.

Účinek 2% glutaraldehydu, 1,6% kyseliny peroctové, 70% isopropanolu a okyseleného dusitanu na spory *C. difficile* zkoumala Wulltová et al. [25]. Peroctové ionty redukovaly titer spor o více než 4 řády již ve velmi krátkých kontaktních časech, 2% glutaraldehyd a okyselený dusitan až v průběhu 30 minut. I v další studii prokázala výborný sporicidní účinek kyselina peroctová: snižovala počet spor *C. difficile* již během 10 minut o 6 řádů, kdežto dichlorisokyanurát sodný jen o 1,5 řádu [3]. To jsme si ověřili i my, přípravek č. 4, jenž kyselinu peroctovou obsahoval, účinkoval spolehlivě bez ohledu na stupeň znečištění v obou časech, v nižší i vyšší koncentraci na spory všech testovaných kmenů. Naproti tomu autoři, kteří srovnávali účinek kyseliny peroctové a dichlorisokyanurátu na spory epidemického kmene *C. difficile* 027 [22], pozorovali, že za čistých podmínek snížil komerční preparát s dichlorisokyanurátem počet spor o 3 řády již za

3 minuty, zatímco přípravek s kyselinou peroctovou až za 30 min, ovšem v přítomnosti organické zátěže nebyl mezi oběma přípravky podstatný rozdíl.

Účinek kyseliny monopercitronové (MPCA), která na rozdíl od kyseliny peroctové nepáchne, na spory různých klostridií testovali Wutzler et al. [26]. Nejdolnější byly spory *Clostridium septicum*, které 1% MPCA zničila během minuty, 0,1% během 30 minut. Méně odolné byly spory *Clostridium novyi* a *Clostridium perfringens*, nejméně pak spory *Clostridium tetani*. Zajímavé je, že autoři tvrdí, že spory druhů rodu *Bacillus* jsou méně odolné než spory klostridií.

Zatímco alkoholový přípravek č. 5 na spory *B. subtilis* a sbírkového kmene *C. difficile* spolehlivě nepůsobil, což se očekávalo, u všech 10 klinických kmenů *C. difficile* překvapivě vykázal sporicidní účinek – u tří kmenů snížil počet spor o 3 řády dokonce již za 15 minut, u zbytku po 60 minutách. Přípravek obsahoval 45 % ethanolu a 30 % isopropanolu. Vzhledem ke krátké době, po níž se nechávají alkoholové přípravky určené k dezinfekci rukou působit, nemá ale naše zjištění praktický význam.

Ve zmíněné švédské studii [25] byla sporicidní účinnost 70% isopropanolu během 5 až 30 minut „nepatrná nebo žádná“. I zde autoři použili několik terénních kmenů, rozdíl ale spočíval v tom, že spory připravovali v mozko-srdcové infuzi, kdežto my jsme postupovali podle normy ČSN EN 13704 a užívali tryptózosójový bujon. Závislost výsledků na kultivační půdě zaznamenali u *C. difficile* Perez et al. [17]. Zjistili, že spory vyrostlé v mozko-srdcové infuzi byly odolnější např. vůči oxidu chloričitému, okyselenému chlornanu a peroxidu vodíku.

Cílem naší studie bylo ověřit, zda jsou spory *C. difficile* citlivější či odolnější vůči různým dezinfekčním přípravkům než spory sbírkového kmene *B. subtilis* a zjistit, zda tak *B. subtilis* je či není tím správným referenčním kmenem.

Zjistili jsme, že na spory *C. difficile* přípravek č. 1 obsahující chloramin B účinkoval lépe než na spory *B. subtilis*, a to i v nižší koncentraci. Rovněž vůči přípravku č. 2, který generuje oxid chloričitý *in situ*, byly spory *C. difficile* o něco citlivější než spory *B. subtilis*. Totéž platilo pro přípravek č. 3 s účinnými látkami formaldehydem a glyoxalem. Pouze u přípravku č. 4 s kyselinou peroctovou a peroxidem vodíku případný rozdíl v citlivosti spor obou bakteriálních druhů nebyl patrný, ovšem jen proto, že tento preparát redukoval o více než 3 řády spory veškerých testovaných kmenů během 30 i 15 minut, za podmínky vyššího i nižšího znečištění a v obou zkoumaných koncentracích. Jako jediný tak prokázal sporicidní aktivitu za všech podmínek

testování. Zatímco na spory *B. subtilis* alkoholový přípravek č. 5 spolehlivě nepůsobil, překvapivým zjištěním bylo, že u klinických kmenů *C. difficile* vykázal – ovšem většinou až po 60 minutách a bez bílkovinné zátěže – zřetelný sporicidní účinek.

Uzavíráme, že spory zejména terénních kmenů *C. difficile* se ukázaly být citlivější k dezinfekčním přípravkům než spory sbírkového kmene *B. subtilis*. *B. subtilis* tedy je tím správným referenčním kmenem k testování sporicidní účinnosti i vůči *C. difficile*. Nakolik jsou vůči dezinfekci odolné spory hypervirulentního kmene *C. difficile* ribotyp 027, zůstává zatím otázkou, první publikované výsledky [22] ale na případnou vyšší rezistenci vůči dezinfekčním látkám ani v nejmenším neukazují.

### Poděkování

Autoři děkují prim. MUDr. Vlastimilu Jindrákovi a RNDr. Zuzaně Zemanové z Oddělení klinické mikrobiologie a antibiotické stanice Nemocnice Na Homolce za poskytnutí terénních kmenů *C. difficile*, paní Zuzaně Matuškové z vedení fy Chemila Hodonín za cenné rady a možnost použití metodiky, materiálů a prostoru k experimentům a Mgr. Radku Přikrylovi, Ph.D., proděkanu Fakulty chemické Vysokého učení technického v Brně, za svolení k publikaci výsledků bakalářské práce autorky B. Š.

### Literatura

- Barbut, P., Petit, J.-C. Epidemiology of *Clostridium difficile*-associated infections. *Clin Microbiol Infect*, 2001, 7, p. 405-410.
- Bartlett, J.G., Perl, T.M. The new *Clostridium difficile* – what does it mean? *N Engl J Med*, 2005, 353, p. 2503-2505.
- Block, C. The effect of Perasafe® and sodium dichlorisocyanurate (NaDCC) against spores of *Clostridium difficile* and *Bacillus atrophaeus* on stainless steel and polyvinyl chloride surfaces. *J Hosp Inf*, 2004, 57, p.144-148.
- Bloomfield, S. F., Arthur, M. Interaction of *Bacillus subtilis* spores with sodium hypochlorite, sodium dichlorisocyanurate and chloramine T. *J Appl Bact*, 1992, 72, p. 166-172.
- Coates, D., Death, J.E. Sporicidal activity of mixtures of alcohol and hypochlorite. *J Clin Pathol*, 1978, 31, p. 148-152.
- ČSN EN 13704. Chemické dezinfekční přípravky – Kvantitativní zkouška s použitím suspenze ke stanovení sporicidního účinku chemických dezinfekčních přípravků používaných pro potraviny, průmysl, domácnosti a veřejné prostory – Zkušební metoda a požadavky (fáze 2/ stupeň 1). Brusel: CEN, 2002. 34 s.
- Death, J.E., Coates, D. Effect of pH on sporicidal and microbicidal activity of buffered mixtures of alcohol and sodium hypochlorite. *J Clin Pathol*, 1979, 32, p. 148-153.
- Dyas, A., Das, B.C. The activity of glutaraldehyde against *Clostridium difficile*. *J Hosp Infect*, 1985, 6, p. 41-45.
- Džupová, O., Beneš, J. *Clostridium difficile* a klostridiová kolitida: co je nového. *Klin Mikrobiol inf Lék*, 2008, 14, 115-117.
- Eckstein, B.C., Adams, D.A., Eckstein, E.C., Rao, A. et al. Reduction of *Clostridium difficile* and vancomycin-resistant *Enterococcus* contamination of environmental surfaces after an intervention to improve cleaning methods. *BMC Infect Dis*, 2007, 7, 61. Available online: <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/7/61>.
- Gerding, D.N., Muto, C.A., Owens, R.C.Jr. Measures to control and prevent *Clostridium difficile* infection. *Clin Infect Dis*, 2008, 46, Suppl.1, p. S43-S49.
- Kuijper, E.J., Barbut, F., Brazier, J.S., Kleinkauf, N. et al. Update of *Clostridium difficile* infection due to PCR ribotype 027 in Europe. *Euro Surveill*, 2008, 13(31):pii=18942. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=18942>.
- Kuijper, E.J., Coignerd, B., Tüll, P. Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe. *Clin Microbiol Infect*, 2006, 12, Suppl. 6, p. 2-18.
- Lambert, P.A. Resistance of bacterial spores to chemical agents. In Fraise, A.P. et al. (ed.): *Principles and Practice of Disinfection, Preservation & Sterilization, 4<sup>th</sup> Ed.* Oxford: Blackwell Publishing, 2004. 184-190. ISBN 1-4051-0199-7.
- Mayfield, J.L., Leet, T., Miller, J., Mundy, L.M. Environmental control to reduce transmission of *Clostridium difficile*. *Clin Infect Dis*, 2000, 31, p. 995-1000.
- Nyč, O., Jindrák, V., Hedlová, D., Urbášková, P. *Clostridium difficile* – aktuální informace a výsledky předběžného dotazníkového šetření v nemocnicích ČR. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)*, 2007, 16, s. 410-411.
- Perez, J., Springthorpe, V.S., Sattar, S.A. Activity of selected oxidizing microbicides against the spores of *Clostridium difficile*: Relevance to environmental control. *Am J Infect Control*, 2005, 33, p. 320-325.
- Rutala, W.A., Gergen, M.F., Weber, D.J. Inactivation of *Clostridium difficile* spores by disinfectants. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 1993, 14, p. 36-39.
- Sagripani, J.-L., Bonifacino, A. Comparative sporicidal effect of liquid chemical germicides on three medical devices contaminated with spores of *Bacillus subtilis*. *Am J Infect Control*, 1996, 24, p. 364-371.
- Shetty, N., Srinivasan, S., Holton, J., Ridgway, G.L. Evaluation of microbicidal activity of a new disinfectant: Sterilox® 2500 against *Clostridium difficile* spores, *Helicobacter pylori*, vancomycin resistant *Enterococcus* species, *Candida albicans* and several *Mycobacterium* species. *J Hosp Infect*, 1999, 41, p. 101-105.
- Vonberg, R.-P., Kuijper, E.J., Wilcox, M.H., Barbut, F. et al. Infection control measures to limit the spread of *Clostridium difficile*. *Clin Microbiol Infect*, 2008, 14, Suppl. 5, p. 2-20.
- Wheeldon, L.J., Worthington, T., Hilton, A.C., Lambert, P.A. et al. Sporicidal activity of two disinfectants against *Clostridium difficile* spores. *Brit J Nursing*, 2008, 17, p. 316-320.
- Whitaker, J., Brown, B.S., Vidal, S., Calcaterra, M. Designing a protocol that eliminates *Clostridium difficile*: a collaborative venture. *Am J Infect Control*, 2007, 34, p. 310-314.

24. **Wilcox, M.H., Fawley, W.N.** Hospital disinfectants and spore formation by *Clostridium difficile*. Lancet, 2000, 356, p. 1324.
25. **Wullt, M., Odenholt, I., Walder, M.** Activity of three disinfectants and acidified nitrite against *Clostridium difficile* spores. Infect. Control Hosp Epidemiol, 2003, 24, p. 765-768.
26. **Wutzler, P., Sauerbrei, A., Schau, H.-P.** Monoperacetic acid – a new disinfectant with excellent activity towards clostridial spores. J Hosp Infect, 2005, 59, p. 75-76.

Do redakce došlo 11.8.2008

Prof. MUDr. Miroslav Votava, CSc.  
Mikrobiologický ústav LF MU  
a FN u sv. Anny v Brně  
Pekařská 53  
656 91 Brno  
e-mail: mvotava@med.muni.cz



## ČESKÁ LÉKAŘSKÁ SPOLEČNOST J. E. PURKYNĚ

ve spolupráci se

Společností pro epidemiologii a mikrobiologii ČLS JEP,  
Společností infekčního lékařství ČLS JEP, Společností všeobecného lékařství ČLS JEP  
Odbornou společností praktických dětských lékařů ČLS JEP, Veterinární a farmaceutickou univerzitou v Brně  
a  
Slovenskou lékařskou spoločnosťou  
pořádá

## XIX. KONGRES ČLS JEP S MEZINÁRODNÍ ÚČASTÍ ZONÓZY, NÁKAZY S PŘÍRODNÍ OHNISKOVOSTÍ



22. 4. 2009, Praha, Hotel Olympik

Registrace a informace na

[www.cls.cz](http://www.cls.cz)

### PREZIDENTI KONGRESU

Prof. MUDr. Jaroslav Blahoš, DrSc.  
předseda České lékařské společnosti J. E. Purkyně

Prof. MUDr. Peter Krištúfek, CSc.  
prezident Slovenskej lekárskej spoločnosti

### ODBORNÁ GARANCE

MUDr. Pavla Křížová, CSc.  
předsedkyně Společnosti pro epidemiologii a mikrobiologii ČLS JEP

Doc. MUDr. Marie Staňková, CSc.  
předsedkyně Společnosti infekčního lékařství ČLS JEP

Prof. MVDr. Zdeněk Pospíšil, DrSc.  
prodekan, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Doc. MUDr. Svatopluk Býma, CSc.  
předseda Společnosti všeobecného lékařství ČLS JEP

MUDr. Hana Cabmochová  
předsedkyně Odborné společnosti praktických dětských lékařů ČLS JEP

### HLAVNÍ TÉMATA

Zoonózy obecně (včetně vzácných zoonóz - Q horečka, brucelóza, West-Nile, Leishmanióza) - Rizika zoonóz cestovatelů (malárie, schistozomiáza...) - Salmonelózy a kamylobakterií - Toxoplasmóza - Zoonózy: klinika, terapie - Rezervoáry klíšťat, předpovědi density klíšťat - Klíšťová encefalitida: očkování - Lymfská borelióza - Tularémie - Migrace lidí a patogenů

### SEKRETARIÁT KONGRESU

AMCA, spol. s r.o., Újezd 450/40, 118 01 Praha 1  
tel.: +420 257 007 629, mobil: +420 731 496 060, fax: +420 257 007 622, e-mail: amca@amca.cz, www.cls.cz