



Miljø- og  
Fødevareministeriet  
Miljøstyrelsen

# Biocider

## Risikofaktorer og resistens



Bekæmpelsesmiddel-  
forskning nr. 176

August 2018

Udgiver: Miljøstyrelsen

Forfattere: Kjeldgaard, J., Vegge, C.S., Schou, T.W., Fink, M., Jørgensen, C., Detmer, A., Ingmer, H.

ISBN: 978-87-93710-61-0

Miljøstyrelsen offentliggør rapporter og indlæg vedrørende forsknings- og udviklingsprojekter inden for miljøsektoren, som er finansieret af Miljøstyrelsen. Det skal bemærkes, at en sådan offentliggørelse ikke nødvendigvis betyder, at det pågældende indlæg giver udtryk for Miljøstyrelsens synspunkter. Offentliggørelsen betyder imidlertid, at Miljøstyrelsen finder, at indholdet udgør et væsentligt indlæg i debatten omkring den danske miljøpolitik.

Må citeres med kildeangivelse.

# Indhold

<b>1.</b>	<b>Forord</b>	<b>5</b>
<b>2.</b>	<b>Forkortelser</b>	<b>6</b>
<b>3.</b>	<b>Sammenfatning</b>	<b>7</b>
<b>4.</b>	<b>Summary</b>	<b>9</b>
<b>5.</b>	<b>Introduktion</b>	<b>11</b>
5.1	Baggrund	11
5.2	Hypoteser	13
5.3	Formål	13
5.4	Valg af biocider	14
5.5	Valg af bakterier	14
<b>6.</b>	<b>Metoder</b>	<b>16</b>
6.1	Karakterisering af bakterier	16
6.1.1	Medier	16
6.1.2	MIC bestemmelser	16
6.2	Eksponeringsforsøg	17
6.2.1	Biocid-eksponerings indvirkning på antibiotikaresistens	17
6.2.2	Biocid-eksponerings indvirkning på virulensgen-ekspression	17
6.3	Genomanalyser	18
6.4	Analyse af <i>qacA/B</i> -gener	18
6.5	Katalase-aktivitet	18
6.6	Overlevelse i høje koncentrationer af biocider	18
6.7	Kortlægning af desinfektionsmiddelforbruget på Hvidovre Hospital	18
6.8	Observation af rengøring og desinfektion af senge og hjælpemidler	19
6.9	Udvikling af konceptuel model for spredning af stafylokokker	19
6.10	Analyse af den anvendte sæbe	19
6.11	Kvantitativ bestemmelse af <i>Staphylococcus</i> spp.	19
6.11.1	MPN metoden	19
6.11.2	Mikrobiologisk prøvetagning	20
6.11.3	Bestemmelse af kimtal	20
6.11.4	Selektiv opformering af <i>Staphylococcus</i> spp.	21
6.11.5	Artsidentifikation ved MALDI-TOF	21
6.11.6	Model for spredning af <i>Staphylococcus</i> spp. og <i>qac</i> -gener	21
<b>7.</b>	<b>Resultater</b>	<b>22</b>
7.1	Karakterisering af bakterier	22
7.1.1	MIC bestemmelser	22
7.1.1.1	Hydrogenperoxid	22
7.1.1.2	Benzalkoniumklorid	25
7.1.1.3	Nanosølv	28
7.2	Længerevarende biocid-eksponeringsforsøg	29

7.2.1	Nomenklatur oversigt for biocideksponerede <i>S. aureus</i> og <i>L. monocytogenes</i> stammer.	30
7.3	Biocid tolerance hos biocid eksponerede stammer	31
7.3.1	Hydrogenperoxid	31
7.3.2	Benzalkoniumklorid	33
7.3.3	Nanosølv	36
7.3.4	Antibiotika krydsresistens	37
7.4	Biocid-eksponerings påvirkning af virulensgen-ekspression	39
7.5	Genomanalyser af biocid-eksponerede stammer	40
7.6	<i>qac</i> -gen analyser	42
7.6.1	Katalase-aktivitet	43
7.6.2	Overlevelse i høje koncentrationer af biocider	44
7.7	Kortlægning af desinfektionsmidler på Hvidovre Hospital	46
7.8	Procedurer for rengøring og desinfektion af senge og hjælpemidler	49
7.9	Konceptuel model over transmission af stafylokokker	49
7.10	Analyse af den anvendte sæbe	50
7.11	Kvantitativ bestemmelse af <i>Staphylococcus</i> spp.	51
7.12	Model for spredning af <i>Staphylococcus</i> spp. og <i>qac</i> -gener.	59
<b>8.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>61</b>
8.1	Længerevarende biocideksponerings indvirkning på bakterier	61
8.1.1	Hydrogenperoxid	61
8.1.2	Benzalkoniumklorid	62
8.1.3	Sølv-nanopartikler	63
8.2	Kortlægning af desinfektionsmidler på Hvidovre Hospital og procedurer for rengøring	64
8.2.1	Analyse af Mikro-Quat Extra brug i forhold til brugsanvisning	64
8.3	Konceptuel model over transmission af stafylokokker	65
8.4	Kvantitativ bestemmelse af <i>Staphylococcus</i> spp.	65
8.4.1	Kontaktrisiko	66
8.4.2	Forekomst af <i>qac</i> -bærende stafylokokker	67
8.5	Model for spredning af <i>Staphylococcus</i> spp. og <i>qac</i> -gener	67
<b>9.</b>	<b>Konklusioner</b>	<b>69</b>
<b>10.</b>	<b>Perspektivering</b>	<b>71</b>
<b>11.</b>	<b>Referencer</b>	<b>72</b>
	<b>Bilag 1.Analyserapport</b>	<b>76</b>
	<b>Bilag 2.Overfladearealer</b>	<b>77</b>
	<b>Bilag 3.Resultater af MPN bestemmelser</b>	<b>78</b>

# 1. Forord

Dette projekt om risikofaktorer og resistens ved brug af antimikrobielle biocider i miljøer som hospitaler og fødevarereproduktioner blev gennemført i perioden juli 2014 til december 2016 og er finansieret af Miljøstyrelsens program for forskning i bekæmpelsesmidler.

Projektet blev udført som et samarbejde mellem Institut for Veterinær Sygdomsbiologi (IVS), Københavns Universitet (Professor Hanne Ingmer) og DHI (Seniortoksikolog Ann Detmer).

Fra disse institutioner har følgende personer været involveret i projektets gennemførelse:

Christina Skovgaard Vegge, Jette Kjeldgaard og Hanne Ingmer (IVS, Københavns Universitet), Torben Wilde Schou, Claus Jørgensen, Michael Fink og Ann Detmer (DHI).

Tak til medlemmer af følgegruppen "Jordbundsøkologi & Pesticider" for kommentarer og forslag i projektperioden: Birte Vogel (Miljøstyrelsen), Jes Vollertsen (Institut for Byggeri og Anlæg, Aalborg Universitet), Kristian Brandt (Institut for Plante- og Miljøvidenskab, Københavns Universitet) og Lars-Flemming Pedersen (DTU Aqua)

Tak også til Margit Ina Larsen, Lillian Enebakk og Anne-Marie Mikkelsen (Hvidovre Hospital) som alle har bidraget til kortlægningen af desinfektionsmiddel-forbruget på Hvidovre Hospital samt til Paal Skytt Andersen og Marc Stegger (SSI) for at udføre genomsekventering og SNP-analyser.

## 2. Forkortelser

Ag-NP: Sølv-nanopartikler

BZK: Benzalkoniumklorid

CFU: Colony forming units; antal kolonier

CoNS: Koagolasenegative stafylokokker

HH: Hvidovre Hospital

ICU: Intensive Care Unit, Intensivafdeling

KU: Københavns Universitet

LC-MS: Liquid Chromatography–Mass Spectrometry

LoD: Limit of Detection

MH: Mueller-Hinton medium

MIC: Minimal inhibitory concentration

MPN: Most Probable Number

MRSA – Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*

MSSA- Methicillin susceptible *Staphylococcus aureus*

OD: Optisk densitet

QAC: kvaternære ammonium forbindelser; en gruppe af biocider

SDS: Sikkerhedsdatablad (Safety Data Sheet)

SNP: Single Nucleotide Polymorphism – analyse af ændringer i enkelte nukleotider i genomet

TSA: Tryptone Soya Agar

TSB: Tryptone Soya Bouillon

WT: Wild Type – den oprindeligt anvendte bakterie inden eksponeringer

X-gal: kromogent substrat for  $\beta$ -galactosidase (5-bromo-4-chloro-3-indolyl--D-galactopyranoside)

# 3. Sammenfatning

Denne rapport omhandler bakteriers tilpasningsevne (adaptering) og overlevelse i kontakt med antimikrobielle biocider der er bredt anvendt i bl.a. hospitaler og fødevareproduktioner. Som modelorganismer blev der arbejdet med to hyppigt forekommende og sygdomsfremkaldende bakterier; *Listeria monocytogenes* og *Staphylococcus aureus*, hvor den ene stamme af sidstnævnte er MRSA og resistent overfor methicillin. De anvendte biocider var hydrogenperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) og benzalkoniumklorid (BZK) samt sølv-nanopartikler (Ag-NP). Desuden blev der foretaget undersøgelser af et dansk hospitals sengevask, hvor forekomsten af *Staphylococcus* spp. blev målt før og efter vask og desinfektion af hospitalsudstyr som senge, vugger og kørestole.

Et formål med projektet var at bedømme hvilke ændringer der sker i bakterier efter længere tids påvirkning med ikke-dræbende koncentrationer af biocider. Disse ændringer blev vurderet som ændringer i antibiotikaresistens samt ændringer i udtrykket af enkelte virulensfaktorer i bakterierne ved væksthæmmende koncentrationer af biocider (MIC). Et andet formål var at identificere parametre og indhente data der kunne ind i en model over risikoen for resistensudvikling blandt bakterier (Stafylokokker) på et hospital, der bruger BZK til desinfektion.

## Adaptering af bakterier til biocider:

Bakterierne udviste tydelig adaptering til de anvendte biocider, og denne tilvænning var arts-specifik. Især *S. aureus* var i stand til at vokse i højere koncentrationer af H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> efter eksponering til ikke-dødelige doser af H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> og endda ved koncentrationer som langt oversteg dem, der var anvendt under adaptationen. Efter eksponering kunne de tilvænnede kulturer overleve i den almindelig brugskoncentration af H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3%). Denne resistens tilskrives bakteriernes opregulering af et naturligt respons på H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress, som resulterer i forhøjet katalase-aktivitet. For *L. monocytogenes* sås der ikke stigninger i MIC overfor H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, og der blev heller ikke observeret bedre overlevelse i høje koncentrationer af dette biocid efter længere tids eksponering til H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

For den kvarternære ammonium forbindelse BZK udviste både *S. aureus* og *L. monocytogenes* potentiale for adaptation, idet MIC værdien ændrede sig, men det var ikke muligt at påvise bedre overlevelse af de eksponerede kulturer ved tilstedeværelse af BZK i sammenligning med ikke-eksponerede celler.

Bakterierne, der var udsat for længere tids påvirkning af biocider udviste ikke øget antibiotikaresistens. Virulensen blev vurderet og resultaterne viste at når *S. aureus* udsættes for biocider, reduceredes virulensen generelt.

## Forekomst af *Staphylococcus* spp. på hospitalsudstyr:

Der blev gennemført undersøgelser af sidegærder, fodgærder og kontrolpaneler på børne-, junior- og voksensenge samt på et mindre antal hjælpemidler både før og efter manual vask og desinfektion.

Der blev fundet få (2) *S. aureus* på hhv. en børneseng og på en rengjort kørestol ud af 150 swab-prøver. Dette angiver en kun lille risiko for at patienter, personale og pårørende kommer i kontakt med *S. aureus* via senge og hjælpemidler. Herudover blev der fundet andre arter af *Staphylococcus*, især *S. hominis* og *S. epidermidis*, som tilhører de koagulasenegative stafylokokker (CoNS), som også kan være sygdomsfremkaldende og er vigtige i forbindelse med hospitalserhvervede infektioner. Effektiviteten af rengøringen blev estimeret til at være ca. 80%. På de rengjorte senge var risikoen for kontakt med stafylokokker størst på kontrolpanelerne, mens det var sidegærderne, der udgjorde den største risiko på de "brugte" senge inden vask.

Hospitals-isolaterne blev undersøgt for biocid-resistensgener; *qac*-gener, som bl.a. kan øge BZK-tolerancen. En mindre del af *Staphylococcus* isolaterne indeholdt *qac* gener, især *S.*

*hominis*, der tilhører CoNS. I disse stammer korrelerede tilstedeværelse af *qac* gener med en gennemsnitlig højere MIC overfor BZK. Det skal dog bemærkes at stammer, som var adapteret til BZK i laboratoriet, kunne opnå samme MIC som isolaterne med *qac*-gener, der var indsamlet. Dette viser, at *qac* generne ikke er de eneste risikofaktorer for at stafylokokker overlever desinfektion.

Undersøgelserne gav ikke mulighed for at vurdere horisontal spredning af resistens mellem populationer. Modellen for spredning blev baseret på spredning af stafylokokker. Der kunne ikke observeres en forøget andel af *qac*-bærende stafylokokker i forbindelse med vaskeprocessen. Spredningen af *qac*-bærende stafylokokker synes derfor at følge spredningen af stafylokokker proportionalt.

Samlet kan det konkluderes at bakterier ændrer sig under påvirkning af biocider og at disse ændringer kan føre til reduceret biocid følsomhed såsom det er tilfældet med stafylokokker hvor forøget katalase produktion beskytter mod hydrogen peroxid. I nogle tilfælde viser tilvænningen sig i form af forøget MIC, mens koncentrationen af biocid, som skal til for at dræbe bakterierne, forbliver uændret som det er tilfældet med de kvartenære ammonium forbindelser. I hospitalsmiljøet kan der isoleres stafylokokker som primært ikke er *S. aureus*, men som til gengæld indeholder *qac*-gener der kan bidrage til øget biocidtolerance. Disse kan være selekteret af tilstedeværelse i hospitalsmiljøet.



## 4. Summary

This report addresses bacterial adaptability and survival in contact with antimicrobial biocides that are widely used in e.g. hospitals and food productions. Two prevalent and pathogenic bacteria were used as model organisms; *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. The biocides used were hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), benzalkonium chloride (BZK) and silver nanoparticles (Ag-NP). Additionally, studies of equipment disinfection on a Danish hospital were performed, as the prevalence of *Staphylococcus* spp. was measured before and after washing and disinfection of hospital equipment such as beds, cots and wheelchairs.

The objectives of the project were in part to evaluate changes in bacteria after prolonged exposure to non-lethal concentrations of biocides. These changes were evaluated as growth inhibitory concentrations of biocides (MIC), changes in antibiotic resistance as well as changes in the expression of key virulence factors in the bacteria. Another objective was to describe and make models of the risk of resistance development and –spread among bacteria (*Staphylococcus*) in a hospital that uses BZK for disinfection.

### **Adaptation of bacteria to biocides:**

The bacteria clearly adapted to the biocides used, although the level of adaptation was species specific. In particular *S. aureus* adapted to grow in high concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> after exposure to non-lethal concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, even at concentrations much higher than those used during the adaptation. After exposure, the adapted cultures survived in disinfection concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3%). This decreased sensitivity was attributed to bacterial up-regulation of the natural response to this type of stress, measured as increased catalase activity. For *L. monocytogenes* an increase in MIC against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was not observed, and there was no apparent improve in survival in high concentration of this biocide.

For the quaternary ammonium compound BZK, both *S. aureus* and *L. monocytogenes* showed potential for adaptation by increased MIC values, but it was not possible to demonstrate improved survival of the BZK-exposed cultures in contact with BZK in comparison with unexposed cells.

The bacteria exposed to prolonged contact with biocides did not show increased antibiotic resistance. The virulence was assessed and the results showed that when *S. aureus* was exposed to biocides, virulence was generally reduced.

### **Presence of *Staphylococcus* spp. on hospital equipment:**

Swab testing for *Staphylococcus* spp. was performed on selected parts (side walls, footboards and control panels) of children's, junior and adult beds and on a smaller number of devices both before and after manual washing and disinfection.

Only few (2) *S. aureus* was found, on a children's bed and in a wheelchair respectively, out of 150 swab samples. This indicates a low risk for patients, staff and relatives of contact with *S. aureus* via beds and equipment. In addition, other species of *Staphylococcus* were detected, in particular *S. hominis* and *S. epidermidis*, which belongs to the coagulase-negative staphylococci (CoNS) which may also be infectious and are important regarding hospital acquired infections. The efficiency of disinfection was estimated to be about 80%. On the cleaned beds, the risk of contact with staphylococci was greatest on control panels, while it was side walls that constituted the greatest risk in the "used" beds before cleaning.

Hospital isolates were tested for biocide resistance genes; *qac* genes that, among other biocides, can increase BZK tolerance. A small part of *Staphylococcus* isolates contained *qac*-genes, in particular *S. hominis* that belong to the CoNS group. In these strains, the presence of *qac* genes correlated with an average higher MIC against BZK. It should be noted that strains, which were adapted to BZK in the laboratory, were able to achieve the same MIC as the iso-

lates with *qac* genes, isolated from hospital equipment. This shows that the *qac* genes were not the only risk factor of staphylococci surviving disinfection.

The studies did not allow for assessing horizontal spread of resistance between populations. The model for the spread was based on dissemination of staphylococci. We did not observe an increased proportion of *qac*-positive staphylococci related to the disinfection process. The spread of *qac*-positive staphylococci therefore seems to follow the spread of staphylococci proportionally.

All together it can be concluded that the bacteria change when exposed to biocides and that these changes can lead to reduced biocide susceptibility. This is especially the case for staphylococci where the increased catalase production protects against hydrogen peroxide. In some cases, the adaptation was seen as an elevated MIC whereas the concentration required to kill the bacteria remained unchanged, which was the case for the quaternary ammonium compounds. It is possible to isolate staphylococci from the hospital environment, mainly other species than *S. aureus*, but thus carrying *qac*-genes that can contribute to increase the biocide tolerance. These can be selected by the conditions in the hospital environment.

# 5. Introduktion

## 5.1 Baggrund

Antimikrobielle biocider er kemiske stoffer, som er en kernebestanddel i de desinfektionsmidler, der anvendes i industrien, på hospitalerne, i institutionerne og i husholdningerne. Når anvendt korrekt dræber desinfektionsmidler en stor andel af bakterier. Alligevel vil der altid være et vist antal bakterier, der overlever f.eks. på grund af forkert brug eller fordi organisk materiale reducerer effekten af desinfektionsmidlet. Fra forskning indenfor antibiotika vides det, at netop det store forbrug har været medvirkende til, at vi i dag kæmper med alvorlige antibiotikaresistente bakterier. Et væsentligt spørgsmål er, om de bakterier, som har været udsat for antimikrobielle biocider i form af desinfektionsmidler, har opnået særlige u hensigtsmæssige egenskaber, og om de udgør en potentiel risiko for human sundhed. Det er tidligere vist, at nogle bakterier kan udvikle resistens overfor biocider, mens andre synes upåvirkede. Meget bemærkelsesværdigt har studier endvidere vist, at tilsyneladende biocid-upåvirkede bakterier er blevet resistente overfor antibiotika (Hegstad et al, 2010). En grund til at sådanne effekter kan opstå, kan være, at antimikrobielle biocider påvirker mange forskellige cellulære processer, hvilket gør det vanskeligt at forudsige, hvordan bakterierne reagerer.

Indenfor gruppen af biocider udgør de antimikrobielle biocider langt den største del (MEEDDM, 2009, BAuA, 2012). Udover at være kernebestanddelen i desinfektions- og konserveringsmidler, kan de også forekomme i medicinsk udstyr, behandlede artikler samt i rengørings- og kosmetikprodukter.

I Frankrig er der over 15.000 desinfektionsmidler på markedet, hvilket udgør mere end halvdelen af det samlede antal (ca. 28.000) biocidholdige produkter (MEEDDM, 2009). I Tyskland markedsføres over 17.000 desinfektionsmidler ud af et samlet antal biocidholdige produkter på 36.500 (BAuA, 2012). Der findes ingen direkte opgørelse af antallet af desinfektionsmidler i Danmark. Miljøstyrelsen skønner, at der er omkring 2.000 biocidholdige produkter på markedet i Danmark. Hvis andelen er som i Frankrig og Tyskland, er der omkring 1.000 desinfektionsmidler på markedet i Danmark. Den seneste opgørelse viser, at der årligt omsættes 2.600 tons biocidaktivstoffer indenfor kategorien desinfektionsmidler i Danmark, svarende til knap 70 % af den samlede omsætning af biocidaktivstoffer i Danmark (MST, 2001).

I modsætning til antibiotika opstår der sjældnere resistens i bakterier overfor antimikrobielle biocider (Russell, 2001). Til gengæld har studier vist, at bakterier udsat for visse biocider, kan udvikle nedsat følsomhed overfor det pågældende biocid; dvs. at sådanne bakterier kan vokse ved højere biocidkoncentrationer end upåvirkede bakterier. Denne type nedsat følsomhed kan f.eks. opstå ved, at bakterierne opsamler gener, som koder for pumper, der efter at biocidet er kommet ind i cellen, kan transportere det ud igen (Wessels & Ingmer, 2013). Et eksempel herpå er de såkaldte *qac*-gener, der koder for pumper, som kan forbindes med nedsat følsomhed overfor kvaternære ammoniumforbindelser, og også over for klorhexidin eller ethidiumbromid. Den omfattende brug af kvaternære ammoniumforbindelser synes at have selekteret for celler med nedsat følsomhed over for disse stoffer og i nogle tilfælde også har givet anledning til øget resistens over for visse typer af antibiotika (Ortega et al., 2013, Hegstad et al., 2013).

Det vides nu, at stafylokokker som har været opbevaret siden 1960'erne, hvor der var et sparsomt forbrug af desinfektionsmidler, ikke bærer på egentlige biocidresistens-gener, mens omtrent halvdelen af de stafylokokker, der isoleres i dag, gør (Skovgaard et al. 2013b). På baggrund af dette står det klart, at det er vanskeligt at forudsige konsekvenserne af biocidpåvirkninger, og hvordan et øget brug af desinfektionsmidler vil påvirke det mikrobiologiske miljø eksempelvis på hospitaler og i fødevareindustrien.

Denne rapport omhandler to vigtige, sygdomsfremkaldende bakterier; nemlig *Listeria monocytogenes* og *Staphylococcus aureus*, der hyppigt forbindes med områder, som ofte eller dagligt desinficeres; hospitaler og

fødevarereproduktioner. Disse bakterier er bestemt uønskede i de omtalte miljøer, men det kan være en stor udfordring at eliminere dem da de konstant cirkulerer i mennesker og miljøer omkring os. Projektet har derfor undersøgt, hvorledes længerevarende, antimikrobiel biocideksponering påvirker bakteriernes evne til at modstå biocider og antibiotika samt til at forårsage sygdom.

Der er i de senere år udviklet en række modeller til at forklare den stadigt stigende antibiotikaresistens hos patogene mikroorganismer. Sådanne modeller kan bruges til at forklare både den evolutionære baggrund for udviklingen af antibiotikaresistens, såvel som spredning heraf på populationsniveau (Spicknall et al., 2013). Mange modeller bruges ligeledes til at forklare, hvordan resistensgener spredes indenfor og mellem populationer. Imidlertid foreligger der meget lidt viden om, hvorledes biocid-påvirkede bakterier spredes i lokalmiljøet, og hvilken betydning denne spredning kan have for udvikling af resistens, enten direkte over for de pågældende biocider eller over for antibiotika.

Generelt inddeles antimikrobielle biocider ud fra deres kemiske sammensætning og virkningsmekanisme. Flertallet af antimikrobielle biocider menes at have uspecifikke virkningsmekanismer og inaktiverer celler via destabilisering af membraner og beskadigelse af protein og DNA, som de mest kendte virkningsmåder (**Russell, 2001**)

Biocider bruges oftest i meget høje koncentrationer med aktive stofkoncentrationer på mere end 10 gange over den "minimale inhibitoriske koncentration" (MIC- værdien). Dette forhold bevirker, at egentlig resistensudvikling sjældent ses. Generelt taler man om resistens, når bakterier kan tåle anvendte koncentrationer af antimikrobielle stoffer, mens bakterier som har nedsat følsomhed i forhold andre isolater af samme art betegnes som værende tolerante. For nogle bakterier som f.eks. *S. aureus*, kendt for at give hospitalsinfektioner, selekterer triclosan for bakterier med øget modstandsdygtighed over for netop triclosan (Cottell et al., 2009). Det er tidligere vist, at flere mekanismer kan give triclosan-resistens i *S. aureus* f.eks. i form af ændret ekspresion af *fabI*-genet, der koder for et essentielt enzym i bakteriens fedtsyresyntese eller ved mutationer i dette gen (Nielsen et al., 2013). Et andet mønster kunne ses ved triclosan-eksponering af den fødevarerelevante patogen, *L. monocytogenes*. Her ændredes følsomheden ikke over for triclosan, men til gengæld blev bakterierne mere resistente over for den gruppe af antibiotika, der betegnes aminoglycosider (Nielsen et al., 2013, Christiansen et al., 2011). Udvikling af denne resistens ville ikke blive påvist ved traditionelle undersøgelser, idet man her udelukkende fokuserer på resistens over for det biocid, som bakterien er udsat for og ikke, om der skulle være sket andre u hensigtsmæssige ændringer i cellerne.

I modsætning til triclosan, er der ikke lavet mange undersøgelser om hvordan benzalkoniumklorid-eksponering påvirker bakterier. Herunder hvordan eksponering til sub-letale koncentrationer, hvor bakterierne kan overleve eksponeringen i længere tid, påvirker bakterierne generelt. I et studium af *Staphylococcus epidermidis*, som normalt koloniserer huden men som også kan give infektioner ved hospitalsindlæggelser, blev bakteriestammer isoleret i midten af 1960'erne sammenlignet med fornyligt isolerede bakterier fra patienter, hospitalspersonale og pårørende. Analyserne viste, at mens omtrent halvdelen af alle nutidige bakterier bar på *qac*-gener og kunne tåle triclosan, var dette ikke tilfældet for nogen af de gamle stammer. Dette er et meget markant bevis på, at der er sket en udvikling i gensammensætningen af de bakterier, som vi omgiver os med i dag i forhold til dem, som fandtes i 1960'erne, før biocidforbruget steg (Skovgaard et al., 2013a, 2013b). *Qac*-generne fungerer også som efflux-pumper for benzalkoniumklorid og andre kvaternære ammoniumforbindelser (Paulsen et al 1996).

I betragtning af de store mængder af antimikrobielle biocider og desinfektionsmidler, der bruges i samfundet, og hvor lidt viden man har om deres effekt på bakteriers DNA, er der stor usikkerhed omkring den potentielle risiko for udvikling og spredning af biocidtolerante varianter, som kan være mere tilbøjelige til at blive antibiotikaresistente. Det er derfor tydeligt, at der savnes værktøjer til at foretage mere præcise vurderinger af hvilke risici, der kan være forbundet med brugen af antimikrobielle biocider.

For at kunne foretage en realistisk risikovurdering af resistensudvikling i biocidholdige miljøer,

hvad enten det er over for antimikrobielle biocider eller antibiotika, er det nødvendigt at forstå hvordan og i hvilket omfang resistens-relaterede genom-ændringer spredtes indenfor og mellem bakteriepopulationer. Modeller for selektion af antibiotika-resistente stammer sammenlignet med antibiotika-følsomme stammer er tidligere beskrevet (De Gelder et al, 2004) ligesom andre modeller har beskrevet horisontal overførsel af resistensgener (Andersson og Hughes, 2011). Der er imidlertid ikke megen viden om hvordan biocid-resistente bakterier spredes i lokalmiljøer, hvor der bruges desinfektionsmidler, og heller ikke i hvor høj grad gener, der koder for resistens kan spredes i bakteriepopulationer. Vi har derfor søgt at beskrive modeller herfor, ved at opstille realistiske eksponeringsscenerier baseret på en kortlægning af desinfektionsmiddelforbruget i hospitalssektoren, kombineret med nye laboratoriedata for resistensudvikling erhvervet i dette projekt.

## 5.2 Hypoteser

Antimikrobielle biocider påvirker bakterier langt bredere og mere uforudsigeligt end det er tilfældet med antibiotika. Dette skyldes formentlig de mange cellulære processer, som rammes af biocider. Konsekvenserne er langt mere komplicerede og svære at påvise end for antibiotika og afsløres derfor ikke med simple biocidanalyser. Derfor er der behov for at adressere, hvordan man systematisk kan vurdere konsekvenserne af biocideksponering, og hvordan en sådan viden kan indgå i den samlede risikovurdering af antimikrobielle biocider. Problematikken er meget relevant for hospitalssektoren, hvor man er særligt opmærksom på resistensudvikling, samt i fødevarerindustrien, hvorfra udvikling af resistente bakterier er et potentielt problem for fødevarerikkerheden. På baggrund heraf fokuserede projektet på to biocider nemlig 1) kvaternære ammoniumforbindelser, som bruges i både fødevarerindustrien og i hospitalssektoren til desinfektion af overflader og 2) hydrogenperoxid, som repræsentant for oxidative desinfektionsmidler, der anvendes bredt i fødevarerindustrien og på hospitalerne. Endvidere undersøgte det om metoderne anvendt i projektet også kunne appliceres på studier af nanosølv, der markedsføres som et relativt nyt desinfektionsmiddel hvor virkemåden er effekten af de giftige sølvioner. Nanosølv anvendes i en lang række produkter af relevans for begge miljøer.

Projektets primære hypoteser var:

- 1) at bakterieceller påvirkes genetisk af antimikrobielle biocider uden at følsomheden over for det pågældende biocid nødvendigvis påvirkes, og at disse ændringer i nogle tilfælde kan føre til ændret antibiotikaresistens eller ændret ekspresion af virulensgener. Denne hypotese blev adresseret for begge de to modelbakterier, *Listeria monocytogenes* og *Staphylococcus aureus*, i forventning om at resultaterne vil kunne generaliseres til andre bakterier.
- 2) at nuværende metoder udviklet til vurdering af antibiotika ikke kan bruges til vurdering af antimikrobielle biocider, idet genetiske ændringer forventes, som ikke nødvendigvis reflekteres i oplagte fænotypiske ændringer, og at nye metoder må udvikles til analyse af dette.
- 3) at antimikrobielle biocider kan påvirke forekomsten af biocid tolerante bakterier i hospitalssektoren og at forekomsten af putative resistens gener såsom *qac* gener der giver resistens overfor kvaternære ammoniumioner forekommer.

## 5.3 Formål

Hovedformålet med projektet var, at belyse i hvor høj grad udvikling af u hensigtsmæssige ændringer forekommer i sygdomsfremkaldende bakterier som følge af eksponering for antimikrobielle biocider, samt at vurdere, hvorledes disse ændringer kan spredes i lokalmiljøet i hospitalssektoren. Dette blev søgt belyst gennem følgende delformål:

- 1) At analysere hvilke ændringer der sker i bakterier, som overlever længerevarende eksponering med antimikrobielle biocider, herunder hvordan følsomhed til biocider og antibiotika ændrer sig.
- 2) At frembringe data, der kan bruges i modeller til beskrivelse af resistensudvikling og -spredning hos bakterier i et lokalmiljø i hospitalssektoren som

følge af eksponering for kvaternære ammoniumforbindelser, herunder nye laboratoriedata, samt data for brug af relevante desinfektionsmidler.

- 3) At udvikle modeller til beskrivelse af spredning af resistens og resistensgener (*qac*-gener) hos bakterier i et lokalmiljø på Hvidovre Hospital som følge af eksponering for kvaternære ammoniumforbindelser.

## 5.4 Valg af biocider

Projektet har valgt at fokusere på kvaternære ammoniumforbindelser og hydrogenperoxid samt nanosølv. Baggrunden for valget af disse stoffer er, at de har meget forskellige virkningsmåder i bakterierne, og at der i nogle tilfælde er dokumenteret resistens.

Benzalkoniumklorid er en meget anvendt kvaternær ammoniumforbindelse (QAC), som bruges bredt i fødevarerindustrien og på hospitaler til desinfektion af overflader og udstyr. Typisk angriber disse stoffer cellemembranen. Bakterier, som udviser øget tolerance, bærer hyppigt på *qac*-gener, der koder for pumper som kan eksportere bl.a. kvaternære ammoniumforbindelser og i nogle tilfælde klorhexidin ud af bakterien (Wessels & Ingmer, 2013).

Hydrogenperoxid har været brugt antiseptisk og til desinfektion igennem en lang årrække, og repræsenterer oxiderende biocider. De oxiderende biocider virker ved kemisk oxidation af cellekomponenter inde i cellen, bl.a. bliver proteiner denaturerede og permeabiliteten af cellevæggen øges. Oxiderende biocider er brugt i vid udstrækning i såvel fødevarerindustrien som på hospitalerne.

Det tredje biocid, der er valgt i projektet er nanosølv, som i stigende grad anvendes i en lang række produkter såsom køleskabe, vaskemaskiner, mademballage, drikkedunke, kosmetik, plaster og tandbørster og herfra kan frigives til det omgivende miljø. Nanosølvpartikler frigiver skadelige sølvioner, der gennem penetrering af celler giver oxidativ beskadigelse af lipider, proteiner og DNA (McShan et al., 2014). Metal resistens er i en række organismer placeret på mobile DNA elementer (plasmider), men der er på nuværende tidspunkt kun lidt viden om overførsel af sølvresistens.

I forbindelse med studier af nanosølv findes der en række forskellige former hvorpå sølvioner kan leveres. Sølv-nanopartikler (Ag-NP) kan indeholde AgCl, AgNO<sub>3</sub> eller rent Ag. Der er desuden stor forskel på partikelstørrelser og dette kan have betydning for deres effekt. De fleste studier, som har undersøgt den antimikrobielle aktivitet af sølv-nanopartikler synes at syntetisere deres partikler selv ved metoder, som ligger udenfor dette projekt. Der er ikke mange kommercielt tilgængelige AgCl-NP, men det er muligt at indkøbe Ag-NP. For Ag-NP er der imidlertid det forhold at det er meget reaktivt, og vil reagere med luftens ilt og ioner, som efter al sandsynlighed vil påvirke aktiviteten af stoffet. Vi har fra start indkøbt Ag-NP, 100 nm (Sigma-Aldrich), men det anføres at stoffet skal åbnes under inert gas. Dette forhold giver problemer i forhold til de påtænkte analyser, men det antages at stabiliteten er afhængig af nanopartikelstørrelsen, og at partikler af størrelse omkring 100 nm vil kunne bruges i de påtænkte forsøg under aerobe betingelser.

## 5.5 Valg af bakterier

I dette projekt har vi fokuseret på to Grampositive, sygdomsfremkaldende bakterier (patogener), der er kendt for at overleve under meget varierende miljøforhold, som forekommer i hospitalsmiljøer og fødevarerindustrien. *Listeria monocytogenes* er et problem i fødevarerindustrien, idet den meget effektivt koloniserer produktionsapparaturer og -miljøer og herfra kan spredes til produkter, hvor især ikke-varmebehandlede fødevarer og ready-to-eat produkter udgør særlige risiko-fødevarer. Den har i de sidste år givet anledning til et stigende antal sygdomstilfælde især blandt ældre og infektioner er forbundet med høj dødelighed (Allerberger et al., 2010). *Staphylococcus aureus* er et problem på hospitalerne, hvor den er kendt for at give hospital-bårne infektioner. Samtidig er den kendt for nemt at udvikle resistens over for antibiotika og senest for at spredes i samfundet med alvorlige infektioner hos yngre mennesker som konsekvens (Watkins et al., 2012). Særligt problematiske er stammer som er resistente overfor methicillin. Til denne gruppe hører stammen USA300, der er netop giver aggressive infektioner hos i

øvrigt raske personer.

# 6. Metoder

## 6.1 Karakterisering af bakterier

Der blev udvalgt fire model-bakterier (to stammer af hver af *S. aureus* og *L. monocytogenes*; se tabel 6-1). For *S. aureus* vedkommende er de valgte dels den velkendte laboriestamme NCTC 8325-4, som bærer reporterfusionen *hla:lacZ*, og dels USA300, som allerede er resistent overfor nogle typer antibiotika. For *L. monocytogenes* vedkommende er der valgt laboriestammen EGDe, som indeholder en *lacZ* fusion til virulens-genet *hly* (Larsen et al., 2006) samt La111, der er kendt som persisterende i fødevarerindustrien (Wulff et al., 2006, Jensen et al., 2008). Rapporter stammer anvendtes da de tillader at en lang række forhold kan undersøges for mulig indflydelse på virulensen.

**Tabel 6-1. Oversigt over bakteriestammer brugt som udgangsstadier til eksponeringsforsøg**

Bakteriestamme	Reference
<i>S. aureus</i> USA300	(Tenover & Goering, 2009)
<i>S. aureus</i> NCTC 8325-4 ( <i>hla:lacZ</i> )	(Loh et al, 2012)
<i>L. monocytogenes</i> EGDe ( <i>hly:lacZ</i> )	(Larsen et al, 2006)
<i>L. monocytogenes</i> LA1111	(Wulff et al, 2006, Vogel et al, 2001)

### 6.1.1 Medier

Til vækst af *S. aureus* stammer brugte vi som standard det flydende medium tryptone soya bouillon (TSB; OXOID) og som fast medium tryptone soya agar (TSA; OXOID). Til vækst af *L. monocytogenes* stammer brugte vi som standard Brain-Heart-Infusion bouillon (BHI; OXOID) og BHI agar (OXOID). Til MIC bestemmelser anvendtes desuden Mueller-Hinton bouillon (MH; OXOID). Som opformeringsmedium til *Staphylococcus* spp. blev der brugt TSB suppleret med 6,5 % NaCl og til selektion for *Staphylococcus* spp. brugte vi **SaSelect™** agar (BIO-RAD). Alle agarplader og flydende kulturer blev som standard inkuberet natten over (18-20 timer) ved 37 °C; de flydende kulturer med omrystning (180-200 rpm).

### 6.1.2 MIC bestemmelser

Biocidfølsomhed blev målt som MIC (Minimal Inhibitory Concentration) ved en modificering af den MIC-bestemmelsesprotokol, der er standardmetode for antibiotikafølsomhedsbestemmelser (CLSI, 2012), til at vurdere den laveste inhibitoriske koncentration af biociderne (Skovgaard et al., 2013a). Generelt anvendtes i projektet de definitioner af følsomhed/ tolerans og krydsresistens, som er beskrevet i EU's guidance dokument i forbindelse med biocidholdige produktvurderinger (EC, 2009). Ved MIC-bestemmelserne blev standardiserede fortyndinger af en bakteriekultur udsat for to-fold, serielle fortyndinger af et biocid. Forsøgene blev opsat i 96-brønds microtiter-plader med 100-300 µl kultur pr. brønd, hvor der blev testet 10 koncentrationer af biocid og der inkluderedes positiv og negativ kontrol for vækst. MIC bestemtes ved inkubation i 20-24 timer (overnatsinkubering) ved 37 °C for alle bakteriestammer.

Vækstkurver udført ved udvalgte biocidkoncentrationer, udvalgt efter MIC-bestemmelser, blev udført for at præcisere de biocidkoncentrationer der vurderes som bedst egnede til eksponeringsforsøg. Det tilstræbtes, at bruge koncentrationer, som tillader vækst med mindst 50 % væksthastighed. Vækstkurverne udførtes som MIC-bestemmelser, og i tilfælde hvor biocidkoncentrationerne lå indenfor et mindre interval og lå tættere end to-fold fortyndinger. Ved vækstkurver



måltes bakterievækst som optisk densitet ved 600 nm (OD<sub>600</sub>) i et automatiseret setup (BioScreen pladelæser) med inkubation ved 37 °C, ryst af plade før måling samt måling hver 5-10 min.

## 6.2 Eksponeringsforsøg

Eksponeringen af bakterierne til biocider er udført ved at bakterierne voksede i tilstedeværelse af biocid og fortyndedes (1000 gange) hver dag med frisk medium (TSB for *S. aureus* og BHI for *L. monocytogenes*) og biocid i 40 dage. Denne forsøgsopsætning blev gentaget med 5-6 replikater af hver af de fire stammer for hvert af de tre biocider. De anvendte biocider er hydrogenperoxid (30 %; Sigma-Aldrich), benzalkoniumklorid (4 mg/mL) og sølv-nanopartikler (Sigma-Aldrich; 5 mg/mL 25 nm fra Econix Silver Nanospheres, Nano Compositix, Prag, Tjekkiet).

**Table 6-2 Oversigt over biocidkoncentrationer anvendt til eksponeringsforsøg**

Stamme	Benzalkoniumklorid (BZK)	Hydrogenperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Nano-sølv (Ag-NP; Nano Compositix)
<i>S. aureus</i> USA300	1,0 µg/mL	90 µg/mL (90 ppm)	180 µg/mL
<i>S. aureus</i> 8325-4	1,0 µg/mL	60 µg/mL (60 ppm)	180 µg/mL
<i>L. monocytogenes</i> EGDe	0,7 µg/mL	260 µg/mL(260 ppm)	180 µg/mL
<i>L. monomytogenes</i> LA111	3,0 µg/mL	260 µg/mL(260 ppm)	180 µg/mL

Efter udførelsen af eksponeringsforsøgene, blev biocidfølsomheden af de biocideksponerede stammer igen målt med MIC (Se. 6.1.1), til sammenligning af biocidfølsomhed før og efter eksponering, idet udgangsstammerne blev medtaget som kontrol.

### 6.2.1 Biocid-eksponerings indvirkning på antibiotikaresistens

For de biocideksponerede stammer samt udgangsstammerne blev antibiotikafølsomhed vurderet for en række antibiotika ved brug af en standard-følsomhedstest; agar disk diffusion. Ved denne metode anbringes papirdisks (6 mm i diameter) med antibiotika på en agaroverflade, inokuleret med bakterier. Efter overnats inkubation måltes diameteren på væksthæmningszone omkring diskene (CLSI, 2012). De anvendte antibiotikadisks er; cefotaxime (CTX 30 µg), ciprofloxacin (CIP 5 µg), gentamicin (CN 10 µg), tetracyklin (TE 30 µg), oxacillin (OX 1 µg) og vancomycin (VA 30 µg) (OXOID).

### 6.2.2 Biocid-eksponerings indvirkning på virulensgen-ekspression

Det blev undersøgt om de biocideksponerede bakterier havde ændret virulens ved at undersøge om ekspressionen af vigtige virulensgener var ændret i de eksponerede stammer i forhold til udgangsstammerne. For *S. aureus* blev der anvendt en reporterstamme af *S. aureus* 8325-4 med *lacZ* (som koder for β-galactosidase) fusioneret til *hla*-genet, som koder for toksinet alpha-hemolysin. Denne stamme blev indstøbt i agarplader, der desuden indeholdt X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl--D-galactopyranoside). X-gal i agarpladen er i sig selv farveløst, men ved nedbrydning (pga. β-galactosidase) bliver produkterne blå. Således blev graden af blåfarvning for biocid-eksponerede *S. aureus* 8325-4 *hla* stammer en indikation på ekspression af toksinet alpha-hemolysin og denne blåfarvning blev sammenlignet med udgangsstammen på agarplader med X-gal (Nielsen et al 2010). 50-200 CFU *S. aureus* 8325-4 *hla* blev indstøbt i TSA med X-gal og efter inkubation ved 37°C blev graden samt variationen af blåfarvning blandt kolonierne vurderet visuelt.

### 6.3 Genomanalyser

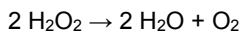
De genomiske ændringer i de biocideksponerede stammer blev undersøgt ved fuld-genomsekventering ved SSI's sekvenseringsfacilitet (Illumina MiSeq). Dette udførtes for at kortlægge hvilke mutationer i bakterierne biocideksponeringen selekterer for, og om disse ændringer, evt. på bestemte gener eller regioner af bakteriens DNA, kan have negative konsekvenser. For udvalgte biocideksponerede stammer fra hver gruppe (biocid & kontrol uden biocid) samt udgangsstammer blev der udført en SNP-analyse (single nucleotide polymorphism) via NASP pipeline (Sahl et al. 2016) for at sammenligne genomerne.

### 6.4 Analyse af *qacA/B*-gener

Der blev undersøgt 94 isolater fra prøverne på Hvidovre Hospital for tilstedeværelse af generne *qacA* og *qacB* ved PCR. Undersøgelserne blev gennemført som beskrevet i Skovgaard et al. (2013a) med *S. aureus* JCM 16555 som positiv kontrol for *qacA*.

### 6.5 Katalase-aktivitet

Aktiviteten af katalase blev undersøgt i *S. aureus*-stammer ved brug af et enkelt og visuelt assay (Iwase et al 2013). Enzymet katalase findes i de fleste levende organismer og nedbryder hydrogenperoxid til vand og ilt:



I katalase assayet vokses *S. aureus* udgangsstammerne og de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-eksponerede stammer i TSB i 24 timer, herefter fortyndes de til OD<sub>600</sub> 1,0 +/- 0,05 for at standardisere celleantallet. Assayet udføres i helt nye, tørsteriliserede glasrør, hvor 200 µL bakteriekultur tilsættes 200 µL 1 % Triton X-100 (Sigma-Aldrich) og 100 µL 30 % hydrogenperoxid (Sigma-Aldrich). Prøverne mixes grundigt på vortexer flere gange og efter 15 min måles højden af skum i alle rør. Der medtages en blindprøve tilsat 200 µL sterilt vand (dvs. uden bakteriekultur), og skumhøjden normaliseres til væskehøjden af denne.

### 6.6 Overlevelse i høje koncentrationer af biocider

Der blev udført drabskurver, også kaldet Time-kill, for at vurdere hvor hurtigt de biocidadaptede stammer blev dræbt i høje koncentrationer af biocid, og for at sammenligne drabseffekten på udgangsstammer og biocideksponerede derivater. Stammerne blev vokset i flydende medium i 18-20 timer, og herefter fortyndet til OD<sub>600</sub> på 0,5 i 10 mL vækstmedium. Start-kimtal (T=0) blev målt ved at udføre serielle, 10-fold fortyndinger efterfulgt af udpladning af 5 dråber af 10 µL på agar til bestemmelse af CFU/mL. Kulturerne blev herefter tilsat biocid i de ønskede koncentrationer, og der blev udtaget prøver af 100 µl efter 15, 30, 60, 120 og 240 minutter til fortynding og bestemmelse af CFU/mL.

### 6.7 Kortlægning af desinfektionsmiddelforbruget på Hvidovre Hospital

Forbruget af desinfektionsmidler på Hvidovre Hospital (HH) blev kortlagt med henblik på at opnå viden om hvilke kvaternære forbindelser, der anvendes og i hvilket omfang. Kortlægningen blev udført ud fra samtaler med sygeplejersker med ansvar for hygiejnen på hospitalets afdelinger, herunder indkøb af rengørings- og desinfektionsmidler. Kortlægningen fokuserede på hospitalets alm. sengeafsnit og afdelinger, ambulatorieafsnit, operationsafdelinger, isolationsstuer, sengevask-afdeling, sterilcentral og kantine-område, med henblik på at identificere biocidaktiverende stofferne i de anvendte desinfektionsmidler.

## 6.8 Observation af rengøring og desinfektion af senge og hjælpemidler

Procedurer og arbejdsgange for rengøring og desinfektion af senge og hjælpemidler blev observeret og dokumenteret over i alt 4 besøg på HH. Procedurer og arbejdsgange for de enkelte typer af senge og hjælpemidler blev beskrevet ud fra projekt-teamets egne observationer, samt fra interviews med de ansatte i rengøringsafdelingen.

Projekt-teamets egne observationer inkluderede tidtagninger for de enkelte typer senge og hjælpemidler, herunder hvor længe desinfektionssæben (Mikro-Quat Extra) var i kontakt med disse, samt hvor længe den samlede arbejdsgang varede. Endvidere observeredes procedurer for aftørring, samt den udførende medarbejders beklædning, herunder beskyttelsesudstyr.

## 6.9 Udvikling af konceptuel model for spredning af stafylokokker

En konceptuel model blev udviklet for at visualisere den sandsynlige transmission og spredning af stafylokokker på HH, der har været i kontakt med QAC-holdige desinfektionsmidler. Modellen tager udgangspunkt i rengøringen og desinfektionen af senge og hjælpemidler. Procedurer og arbejdsgange herfor var derfor centrale, og modellen er derfor baseret på informationer fra hospitalets personale, herunder hygiejnesygeplejersker og rengøringspersonale, samt på egne observationer af procedurer og arbejdsgange (se 6.8).

## 6.10 Analyse af den anvendte sæbe

Den desinfektionssæbe, der anvendes på hospitalet, er Mikro-Quat Extra fra Ecolab. Blandingsforholdet mellem sæbe og vand blev bestemt ved at veje sæbedunken før og efter spray. En prøve af den ublandede sæbe blev sendt til analyse for kvaternære ammoniumforbindelser på Eurofins Product Testing, Galten, Danmark, efter en intern metode ved LC-MS. Ifølge SDS er koncentrationen benzalkoniumklorid i dette produkt 5-10%.

## 6.11 Kvantitativ bestemmelse af *Staphylococcus* spp.

### 6.11.1 MPN metoden

Antallet af stafylokokker på hospitalssengene er blevet bestemt med MPN-metoden. MPN metoden er en statistisk beregning af det mest sandsynlige antal. Metoden har været anvendt som kvantificeringsprincip i mikrobiologiske analyser i mange år (Halvorson and Ziegler 1933). Metoden er baseret på analyse af et antal delprøver. Kvantificeringen sker på baggrund af om analytten er til stede eller fraværende i de enkelte delprøver. I dette projekt har vi anset dele af hospitalssengene som vores prøve. Ved at analysere et kendt delareal af sengen, og under antagelse af en ligelig fordeling af stafylokokker på sengen, kan man bestemme koncentrationen af stafylokokker på overfladen.

Da MPN metoden er baseret på en statistisk beregning, kan der også beregnes konfidensintervaller, der beskriver den usikkerhed, der indgår i MPN metodens kvantificeringsprincip. Usikkerheden afhænger af antallet og størrelsen af (del)prøver.

Beregningen er udført ved hjælp af en MPN beregneren Curiale, Build 23.

Vi har antaget, at der er størst sandsynlighed for at finde stafylokokker på sengegærdet, dvs. det øverste rør på sidegelænderet, hvor det må antages, at både patient, personale og pårørende ofte rører, på fodgærdet, hvor portører, personale og pårørende ofte rører, og på kontrolpanelet til styring af sengens indstilling, hvor patient, personale og pårørende ofte rører. Disse dele af sengene er samtidig også de steder, hvor risikoen for overførsel til patienter, personale og pårørende er højest.

Ud over senge er der også udtaget prøver af vugger, krykker, rollatorer og kørestole.

Arealerne af sengegærder, fodgærder og kontrolpaneler blev beregnet ved opmåling i forbindelse med prøvetagningen og fremgår af Bilag 2

Ved at multiplicere koncentration af bakterier på den målte overflade med det samlede overfladeareal kan man estimere det mest sandsynlige antal stafylokokker per seng.

Der er ikke lavet beregninger af arealer og samlet antal stafylokokker på vugger og hjælpemidler.

### 6.11.2 Mikrobiologisk prøvetagning

I alt blev der foretaget 3 separate prøvetagninger, samt en pilot-prøvetagning på HH for at undersøge de forskellige typer senge og hjælpemidler for stafylokokker.

Ved hver prøvegang blev der taget i alt 50 prøver. De 36 prøver blev taget fra senge, fordelt på 3 prøver per seng (se Tabel 6-3). Sengegærderne er de dele af sengene der oftest berøres (Huslage et al. 2010), og vi har derfor valgt, at tage prøver fra fodgærde og sidegærde. Vi har desuden taget prøver af kontrolpanelet, der anvendes til styring af sengenes indstilling. Endvidere blev der ved hver prøvegang taget 14 prøver fra forskellige hjælpemidler, f.eks. kørestole, krykker og rollatorer. Der blev taget prøver fra såvel snavsede som rengjorte senge og hjælpemidler.

**Tabel 6-3 Fordeling af prøver taget fra senge (6 rene og 6 snavsede senge pr. prøvetagningsrunde) i sengevasken på Hvidovre Hospital**

	Voksensenge			Juniorsenge			Børnesenge			
	Fodgærde	Sidegærde	Kontrolpanel	Fodgærde	Sidegærde	Kontrolpanel	Fodgærde	Sidegærde	Kontrolpanel	I alt
Snavsede	2	2	2	2	2	2	2	2	2	18
Rengjorte	2	2	2	2	2	2	2	2	2	18
<b>I alt</b>										<b>36</b>

Alle prøver blev taget ved at svabre med Copan Innovation's "SRK Environmental Swab Systems". Hver svaber-enhed bestod af en svaberpind i et rør med 10 ml "Rinse Solution" (herefter kaldet *neutraliseringsbuffer*), som er en isotonisk saltopløsning med substanser til neutralisering og inaktivering af desinfektionsmidler. Hver enkelt prøve blev taget ved at anlægge en template på 4x5 cm (Copan Innovation Sampling templates) på det ønskede prøvetagningssted, og herefter at svabre inden for området. Efterfølgende blev den enkelte svaber lagt tilbage i røret med neutraliseringsbuffer.

Hver prøvegang tog maksimalt 1,5 timer og herefter blev alle prøver transporteret fra HH til KU. Fra den første prøve blev taget til alle prøver var på køl på KU gik der maksimalt 2 timer. Herefter blev alle prøver processeret indenfor 2 timer.

### 6.11.3 Bestemmelse af kimalt

Til bestemmelse af kimalt blev der på prøvedagen fra hvert rør med neutraliseringsbuffer udtaget 1 mL, som blev opkoncentreret ved centrifugering (7500 x g i 5 min), herefter opslæmmet i 100 µl steril TSB og endelig udpladet, ligeledes på **SaSelect™** (37 °C, 24 timer). Denne udpladning giver en indikation af antallet af *Staphylococcus* spp. tilstede i prøverne.

#### 6.11.4 Selektiv opformering af *Staphylococcus* spp.

Fra hvert rør med neutraliseringsbuffer blev 5 mL udtaget til selektiv opformering i 45 mL TSB + 6,5 % NaCl og opformeringskulturer blev inkuberet 24 timer ved 37 °C. Efterfølgende blev 50 µL fra hver opformering udpladet på *Staphylococcus*-selektive agarplader, **SaSelect™** (BioRad), og pladerne blev inkuberet i 20-24 timer ved 37 °C for at selektere og detektere tilstedeværende *Staphylococcus* arter.

#### 6.11.5 Artsidentifikation ved MALDI-TOF

Alle kolonier opvokset på **SaSelect™**, som formodes at være *Staphylococcus* spp. blev renstrøget og blev artsbestemt ved matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) masse spektrometri (Vitek MS RUO; bioMérieux, Frankrig) med Saramis™ 3.5 (bioMérieux) databasen til fortolkning af spektra.

#### 6.11.6 Model for spredning af *Staphylococcus* spp. og *qac*-gener

Det oprindelige projektoplæg beskrev, at vi ville modellere spredning af resistensgener i form af *qac* gener i bakteriepopulationer, samt at vi ville modellere spredning af resistens overfor såvel QAC som antibiotika.

Imidlertid har projektets resultater betydet, at der ikke har været tilstrækkeligt datamateriale til at beskrive spredning af resistensgener imellem populationer.

Vi har med udgangspunkt i sengevasken på HH beskrevet hvorledes stafylokokker kan spredes herfra, ud til de enkelte afdelinger og tilbage via senge og hjælpemidler. Dette er gjort ved at undersøge for stafylokokker på senge og hjælpemidler i sengevasken både før og efter rengøring og desinfektion Herefter har vi på baggrund af bestemmelse af forekomsten af *qac*-gener i de undersøgte stafylokokker estimeret spredningen af disse på HH.

Vi har således beskrevet en model, der bygger på den konceptuelle model over spredning af stafylokokker på HH samt på konkrete data fra prøvetagninger i sengevasken, herunder en estimering af koncentrationen af stafylokokker på senge og hjælpemidler vha. MPN metoden og kintal.

# 7. Resultater

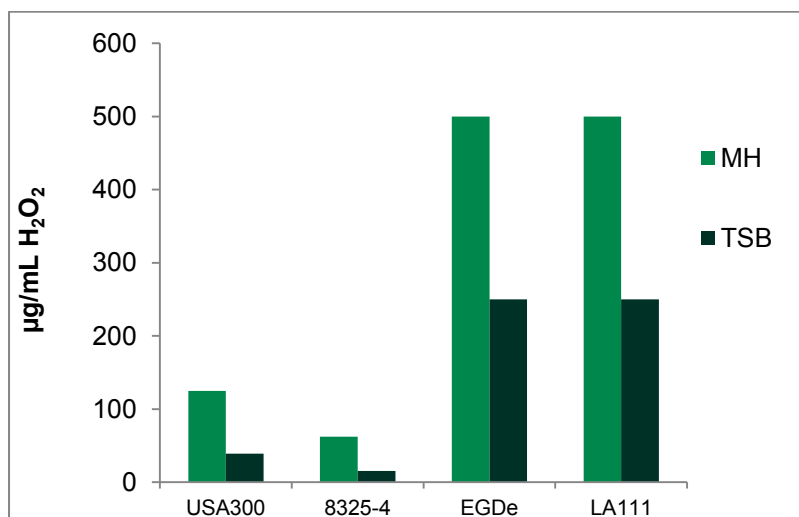
## 7.1 Karakterisering af bakterier

Der blev foretaget en indledende karakterisering af bakteriernes vækst og overlevelse i kontakt med de tre biocider, hydrogenperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), benzalkoniumklorid (BZK) og sølv-nanopartikler (Ag-NP), med henblik på at bestemme relevante, sub-letale koncentrationer til eksponeringsforsøg.

### 7.1.1 MIC bestemmelser

Der kan være stor forskel på hvordan forskellige bakterier bliver påvirket af det enkelte biocid, helt ned på stammeniveau for samme bakterieart. Det blev derfor undersøgt, hvordan de fire udvalgte bakteriestammer responderede på biociderne i et set-up i flydende medium, hvor bakterierne blev udsat for to-fold fortyndinger af biocidet og den laveste, væksthæmmende koncentration blev bestemt (minimal inhibitory concentration; MIC).

#### 7.1.1.1 Hydrogenperoxid



**Figur 7-1 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> MIC bestemmelser for *S. aureus* stammerne USA300 og 8325-4 samt *L. monocytogenes* stammerne EGDe og LA111. MIC vises som gennemsnit af tre biologiske bestemmelser målt i vækstmedierne MH (lysegrøn) og TSB (mørkegrøn).**

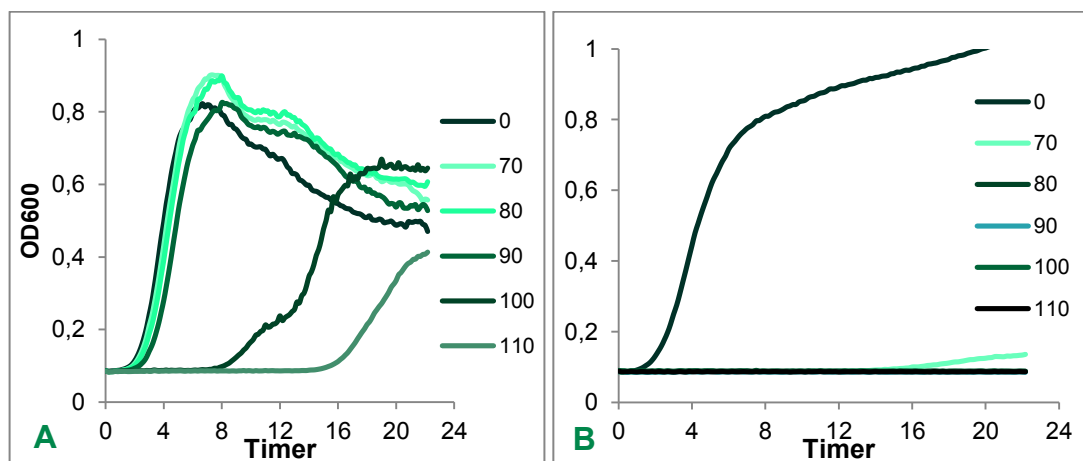
Der blev fundet variation i MIC målingerne for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dels mellem tekniske replikater og dels fra dag til dag. Det er normalt, at MIC varierer ét niveau (dvs. til halv eller dobbelt koncentration), men de større udsving kan skyldes at H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> er relativt lys- og temperaturfølsomt. Det ses af Figur 7-1 og Tabel 7-1, at der til sammenligning krævedes højere koncentration af H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for at hæmme *L. monocytogenes*-stammerne end for at hæmme *S. aureus*. For de to *S. aureus* blev der målt MIC imellem 15 – 125 µg/mL (0,0015 – 0,0125 %), mens der for de to *L. monocytogenes* blev målt MIC fra 250 – 500 µg/mL (0,025-0,05 %). Den hæmmende koncentration varierede dog også mellem de forskellige vækstmedier (Figur 7-1), og det fastslås, at yderligere målinger foretages i MH-mediet, da MH er det medium der som standard benyttes til susceptibilitetsmålinger (CLSI, 2012).

**Tabel 7-1 Hydrogenperoxid MIC intervaller, målt i fire biologiske replikater i MH-medium, angivet i  $\mu\text{g/mL H}_2\text{O}_2$**

Bakteriestamme	MIC
<i>S. aureus</i> USA300	31-125
<i>S. aureus</i> 8325-4	15-62
<i>L. monocytogenes</i> EGDe	250-500
<i>L. monocytogenes</i> LA1111	250-500

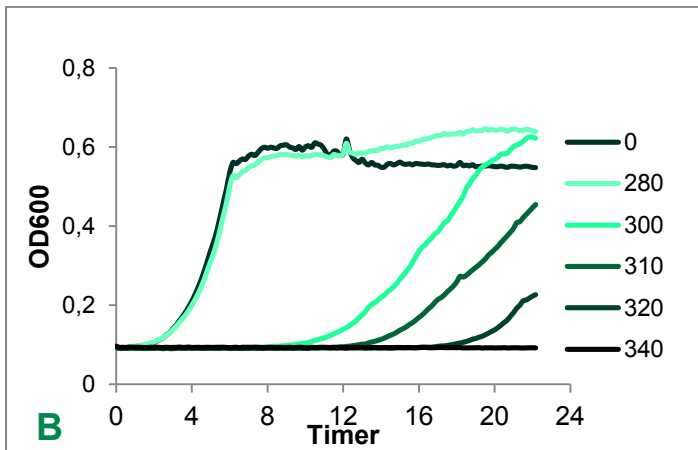
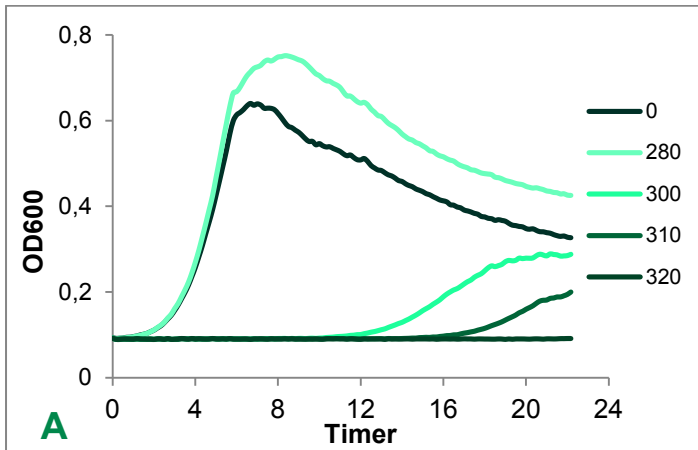
Grundet de store udsving i MIC bestemmelserne (Tabel 7-1) udførtes vækstkurver med forskellige koncentrationer af  $\text{H}_2\text{O}_2$ , for at fastlægge en mere præcis væksthæmmende koncentration (Figur 7-2).

Vækstkurverne er udført i et Bioscreen spektrofotometer, hvor væksten måles blev målt som optisk densitet i et fastsat interval (5-10 min mellem målinger). Alle vækstkurver er et gennemsnit af fire tekniske replikater. Hydrogenperoxid koncentrationer er angivet i  $\mu\text{g/mL}$ . Det blev efterstræbt, at bestemme biocidkoncentrationer, som gav tydelige vækstpåvirkninger uden at være letale, for at være sikker på, at bakterierne under eksponeringsforsøget blev udsat for markant biocid stress.



**Figur 7-2 Vækstkurver for A) *S. aureus* USA300 og B) *S. aureus* 8325-4 med forskellige koncentrationer af  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0-110  $\mu\text{g/mL}$ ) (middelværdi, baseret på n= 4 pr. eksponering)**

Der var stor forskel på hvor godt de to *S. aureus* stammer tolererede  $\text{H}_2\text{O}_2$ . På baggrund af *S. aureus* vækstkurverne (Figur 7-2), udvalgte hhv. 90  $\mu\text{g/mL}$  og 60  $\mu\text{g/mL}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  til at være de optimale sub-letale koncentrationer til hhv. USA300 og 8325-4.



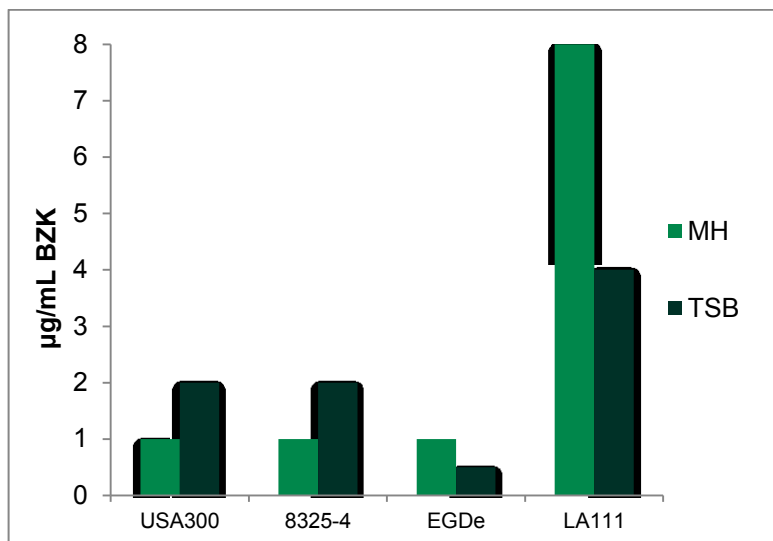
**Figur 7-3 Vækstkurver for *L. monocytogenes* stammerne A) EGDe og B) LA111 med forskellige koncentrationer af H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0-340 µg/mL)**

På baggrund af *L. monocytogenes* vækstkurver (Figur 7-3), og MIC bestemmelser (Tabel 7-1) udvalgte 260 µg/mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> til at være den optimale sub-letale koncentration til både EGDe og LA111.



### 7.1.1.2 Benzalkoniumklorid

For benzalkoniumklorid bestemmes ligeledes MIC i flydende vækstmedier.



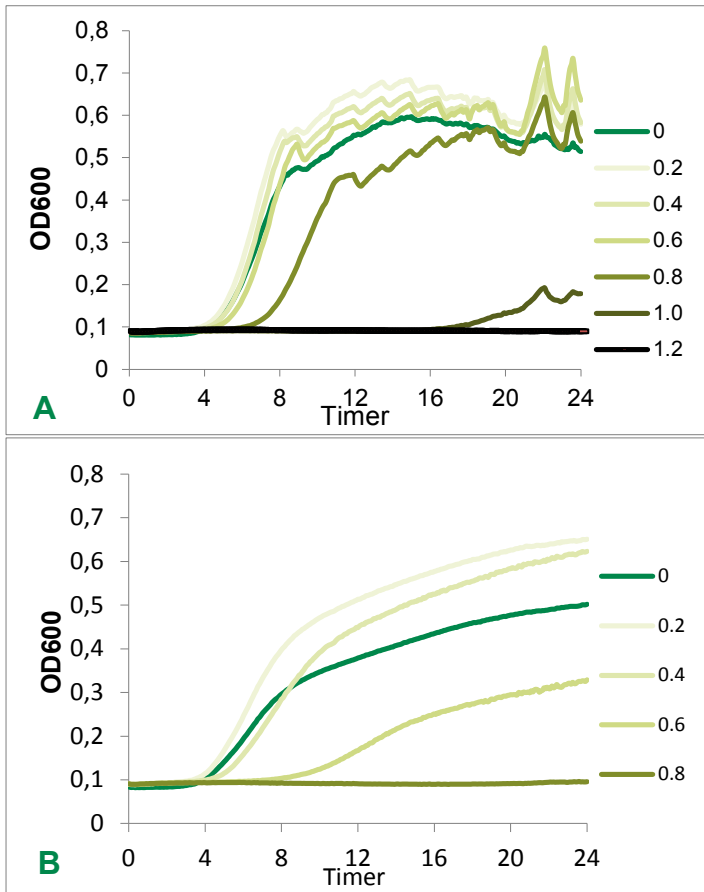
**Figur 7-4 Benzalkoniumklorid MIC bestemmelser for *S. aureus* stammerne USA300 og 8325-4 samt *L. monocytogenes* stammerne EGDe og LA111. MIC vises som gennemsnit af tre biologiske bestemmelser målt i vækstmedierne MH (lysegrøn) og TSB (mørkegrøn).**

For BZK blev MIC bestemt til 0,5-2 µg/mL for begge *S. aureus* stammer og EGDe, mens *L. monocytogenes* stammen LA111, der oprindeligt er isoleret fra en fødevareproduktion, udviste en højere tolerance med MIC værdier på 4-8 µg/mL (Figur 7-4). Der sås igen en effekt af vækstmediet på MIC værdierne, om end der for BZK ikke kunne måles en entydigt højere MIC i MH.

**Tabel 7-2 Benzalkoniumklorid MIC intervaller målt i fire biologiske replikater i MH-medium, angivet i µg/mL**

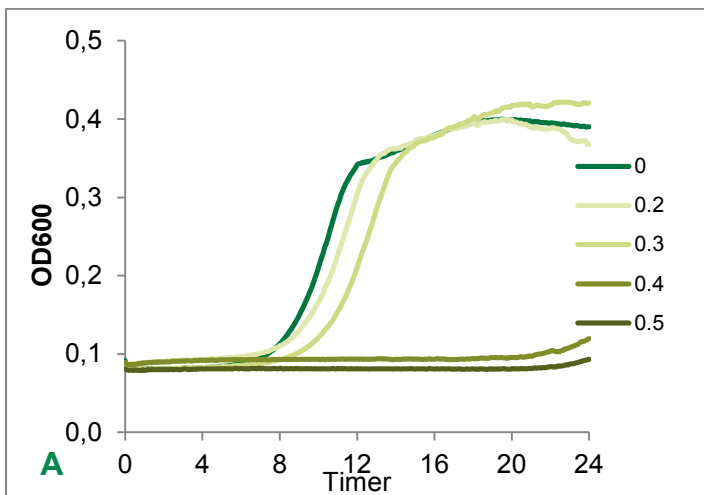
Bakteriestamme	MIC
<i>S. aureus</i> USA300	1-2
<i>S. aureus</i> 8325-4	1-2
<i>L. monocytogenes</i> EGDe	0,5 - 1
<i>L. monocytogenes</i> LA1111	4-8

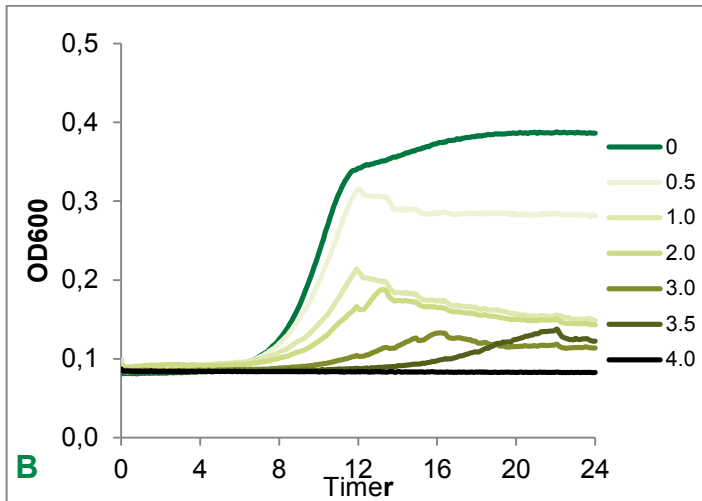
Der udførtes vækstkurver med forskellige koncentrationer af BZK for at fastlægge en mere præcis væksthæmmende koncentration. Vækstkurverne blev udført i et Bioscreen spektrofotometer, hvor væksten blev målt som optisk densitet i et fastsat interval (5-10 min mellem målinger). Alle vækstkurver er et gennemsnit af fire tekniske replikater. Benzalkoniumkloridkoncentrationer er angivet i µg/mL. Det blev efterstræbt, at bestemme biocidkoncentrationer, som giver tydelige vækstpåvirkninger uden at være letale, for at være sikker på, at bakterierne under eksponeringsforsøget ville blive udsat for markant biocid stress.



Figur 7-5 A: Vækstkurver for A) *S. aureus* USA300 og B) *S. aureus* 8325-4 med forskellige koncentrationer af BZK (0 - 1,2 µg/mL)

På baggrund af *S. aureus* vækstkurverne (Figur 7-5) og MIC bestemmelser (Tabel 7-2), udvalgte 1,0 µg/mL BZK til at være den optimale sub-letale koncentration for USA300 og 8325-4 stammerne.



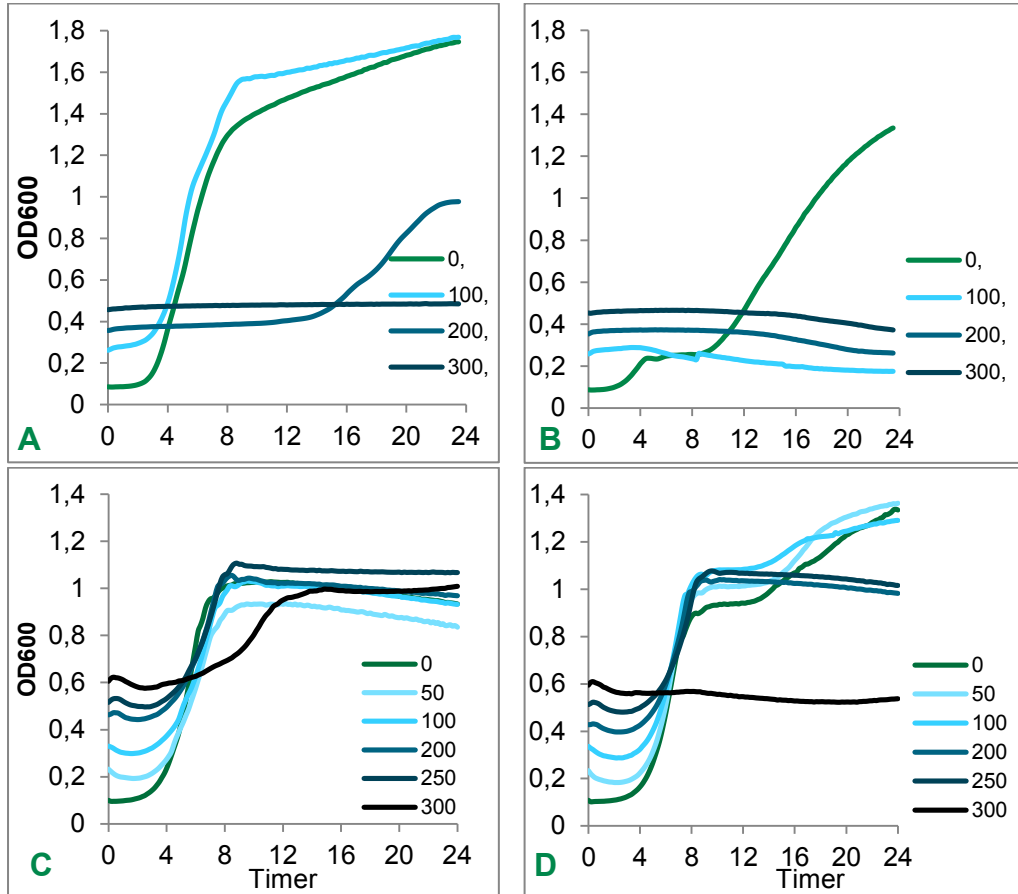


**Figur 7-6 Vækstkurver for *L. monocytogenes* stammerne A) EGDe og B) LA111 med forskellige koncentrationer af BZK (0 - 4 µg/mL)**

På baggrund af *L. monocytogenes* vækstkurver (Figur 7-6), og MIC bestemmelser (Tabel 7-2) udvalgte hhv. 0,7 µg/mL samt 3,0 µg/mL BZK til at være de optimale sub-letale koncentrationer for hhv. EGDe og LA111.

### 7.1.1.3 Nanosølv

Der er fra projektets start udført forsøg med 100 nm sølv-nanopartikler (Ag-NP, Sigma-Aldrich). Det har været en bekymring om nanosølv dispersionen ville være stabilt, dvs. bibeholde den anti-mikrobielle aktivitet under opbevaring. Heldigvis har det vist sig, at produktet udviser samme anti-mikrobielle aktivitet to måneder efter åbning.



**Figur 7-7 Vækstkurver udført med Ag-NP (Nano Composix) i forskellige koncentrationer (0 – 300 µg/mL). A: *S. aureus* USA300 B: *S. aureus* 8325-4, C: *L. monocytogenes* EGDe, D: *L. monocytogenes* LA111**

*L. monocytogenes* stammerne voksede ikke til samme høje densitet som *S. aureus*, og da også denne Ag-NP (Nano Composix) absorberer meget lys i sig selv, er det vanskeligt at vurdere vækstpåvirkningen af bakterier med et Bioscreen spektrofotometer (Figur 7-7). Desuden klumpede *S. aureus* 8325-4 *hla:lacZ* stammen (Figur 7-7B) meget i nærvær af de reaktive sølv-nanopartikler, hvilket yderligere vanskeliggjorde vurderingen af vækst. Der blev udarbejdet en protokol til et modificeret MIC forsøg til undersøgelse af bakteriers vækst ved tilstedeværelse af Ag-NP. Stigende koncentrationer af Ag-NP (µg/mL) blev resuspenderet i vækstmedie (1 mL) som inokuleredes med 1/1000 volumen bakteriel overnatkultur og inkuberedes natten over ved 37 °C. Den følgende dag blev kulturerne inspiceret visuelt for vækst, samt fortyndet 10-fold serielt med fysiologisk saltvand til  $10^{-7}$  og herefter udpladet på uselektivt medie (TSB/BHI). Yderligere blev en subkultivering (1:1000) af kulturerne til nye Ag-NP opløsninger foretaget, som blev inkuberet og analyseret analogt. Herved kunne opnås en vurdering af hvilke koncentrationer af nanosølv, som understøtter hhv. robust vækst, overlevelse og fornyet vækst ved subkultivering.

Vi fandt en vis variation mellem uafhængige forsøg, og der var ikke en direkte sammenligning mellem visuel vurdering af vækst i form af turbiditet og reel vækst, idet tilsyneladende klare kulturer med sølv-udfældning kunne indeholde høje koncentrationer af bakterier. Det er ikke

givet, at en kultur vokset op i tilstedeværelse af nanosølv kan udvise fornyet vækst ved subkultivering i samme koncentration af nanosølv. Endelig udviste *L. monocytogenes* stammerne umiddelbart højere tolerance overfor Ag-NP end *S. aureus* stammerne, da *L. monocytogenes* EGDe og LA111 kunne vokse i koncentrationer op til 400 µg/mL, mens *S. aureus* USA300 og 8325-4 kunne vokse til omkring 250 µg/mL. Resultaterne opnået med *L. monocytogenes* stammerne er imidlertid mindre robuste end resultaterne opnået med *S. aureus*. På baggrund af disse meget grundige analyser udvalgte 180 µg/mL Ag-NP for alle stammerne til det længerevarende eksponeringsforsøg.

## 7.2 Længerevarende biocid-eksponeringsforsøg

På baggrund af de indledende biocidfølsomhedsmålinger udvalgte følgende biocidkoncentrationer til eksponeringsforsøg.

**Tabel 7-3 Udvalgte biocid koncentrationer til eksponeringsforsøg**

Stamme	Benzalkonium-klorid (BZK)	Hydrogenperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Nano-sølv (Ag-NP; Nano Composit)
<i>S. aureus</i> USA300	1,0 µg/mL	90 µg/mL = 0,009%	180 µg/mL
<i>S. aureus</i> 8325-4	1,0 µg/mL	60 µg/mL = 0,006%	180 µg/mL
<i>L. monocytogenes</i> EGDe	0,7 µg/mL	260 µg/mL = 0,026%	180 µg/mL
<i>L. monocytogenes</i> LA111	3,0 µg/mL	260 µg/mL = 0,026%	180 µg/mL

## 7.2.1 Nomenklatur oversigt for biocideksponerede *S. aureus* og *L. monocytogenes* stammer.

De fire udgangsstammer blev eksponeret længerevarende til hvert af de tre biocider ved daglige passager over 40 dage. Eksponeringsforsøg A blev udført med 5 uafhængige replikater for hver kombination af bakteriestamme og biocid samt negativ kontrol (Tabel 7-4). Forsøget blev opstartet med både *S. aureus* og *L. monocytogenes*, men pga forurening måtte Listeria-stammerne udgå undervejs. Disse eksponeringer blev efterfølgende gennemført i Eksponeringsforsøg B med 6 replikater (igen udgik enkelte *L. monocytogenes* stammer pga forurening). Desuden blev eksponering til Ag-NP udført for alle fire stammer i forsøg B (Tabel 7-5).

**Tabel 7-4 Oversigt over *S. aureus* stammer udviklet ved Eksponeringsforsøg A og B**

Udgangsstamme: <i>S. aureus</i> USA300						
Eksponeringsforsøg A						
Replikant nr.:	1	2	3	4	5	6
Uden biocid	I_A1	I_A2	I_A3	I_A4	I_A5	
1 µg/mL BZK	I_B1	I_B2	I_B3	I_B4	I_B5	
90 µg/mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	I_C1	I_C2	I_C3	I_C4	I_C5	
Eksponeringsforsøg B						
Uden biocid	BI_A1	BI_A2	BI_A3	BI_A4	BI_A5	BI_A6
180 µg/mL Ag-NP	BI_C1		BI_C3	BI_C4	BI_C5	BI_C6

Udgangsstamme <i>S. aureus</i> 8325-4						
Eksponeringsforsøg A						
Replikant nr.:	1	2	3	4	5	6
Uden biocid	I_A1	I_A2	I_A3	I_A4	I_A5	
1 µg/mL BZK	I_B1	I_B2	I_B3	I_B4	I_B5	
60 µg/mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	I_C1	I_C2	I_C3	I_C4	I_C5	
Eksponeringsforsøg B						
Uden biocid	BII_A1	BII_A2	BII_A3	BII_A4	BII_A5	BII_A6
180 µg/mL Ag-NP	BII_C1	BII_C2	BII_C3	BII_C4	BII_C5	BII_C6

**Tabel 7-5 Oversigt over *L. monocytogenes* stammer udviklet ved Eksponeringsforsøg B**

Udgangsstamme: <i>L. monocytogenes</i> EGDe						
Eksponeringsforsøg B						
Replikant nr.:	1	2	3	4	5	6
Uden biocid	BIII_A1	BIII_A2	BIII_A3	BIII_A4	BIII_A5	BIII_A6
0,7 µg/mL BZK		BIII_B2	BIII_B3	BIII_B4	BIII_B5	BIII_B6
260 µg/mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	BIII_C1	BIII_C2	BIII_C3	BIII_C4		BIII_C6
180 µg/mL Ag-NP	BIII_D1	BIII_D2		BIII_D4	BIII_D5	BIII_D6

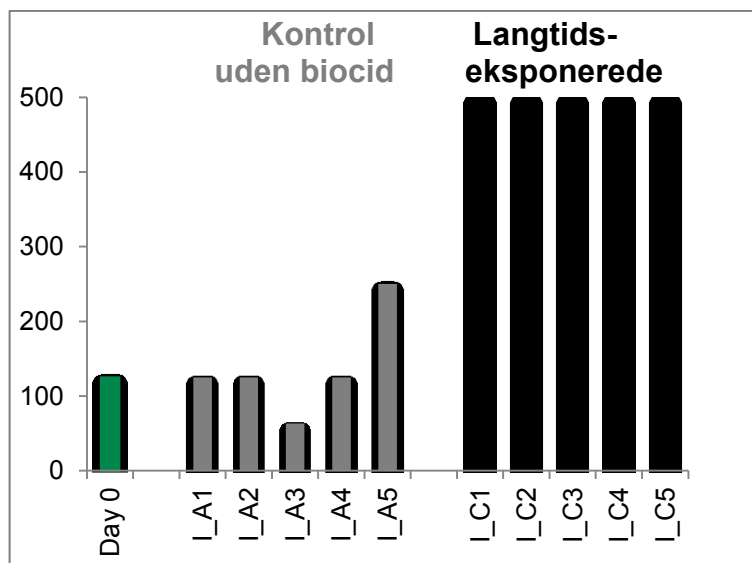
  

Udgangsstamme: <i>L. monocytogenes</i> LA111						
Eksponeringsforsøg B						
Replikant nr.:	1	2	3	4	5	6
Uden biocid	BIV_A1	BIV_A2	BIV_A3	BIV_A4	BIV_A5	BIV_A6
3 µg/mL BZK	BIV_B1	BIV_B2	BIV_B3	BIV_B4	BIV_B5	BIV_B6
260 µg/mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		BIV_C2	BIV_C3	BIV_C4	BIV_C5	BIV_C6
180 µg/mL Ag-NP	BIV_D1	BIV_D2	BIV_D3	BIV_D4	BIV_D5	

### 7.3 Biocid tolerance hos biocid eksponerede stammer

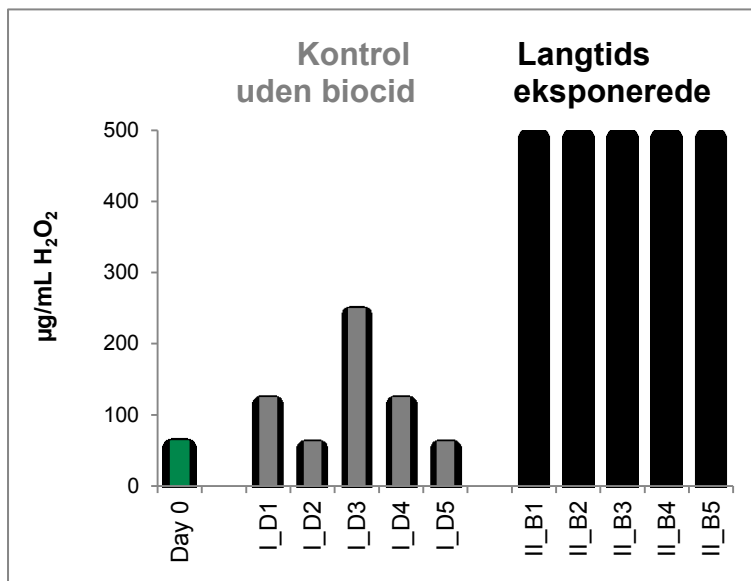
Det blev undersøgt, hvorvidt biocidtolerancen var ændret for de biocideksponerede stammer, sammenlignet med udgangsstammerne, ved brug af MIC bestemmelser. Indledningsvis blev alle uafhængige biocideksponerede replikater undersøgt i forhold til udgangsstammen og til de stammer, som parallelt var blevet passeret i medie uden biocid (Eksponeringsforsøg A). Yderligere blev det undersøgt om biocid-eksponerede stammer udviste øget tolerance overfor 'det andet' biocid, dvs. udviste BZK eksponerede stammer øget tolerance overfor H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> og vice versa.

#### 7.3.1 Hydrogenperoxid



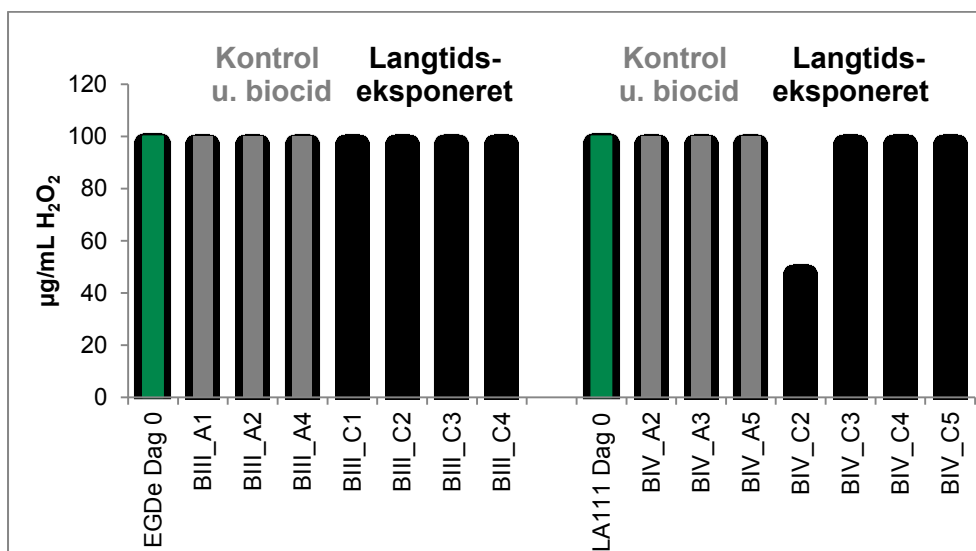
**Figur 7-8 Hydrogenperoxid MIC (µg/ml) af *S. aureus* USA300 derivatstammer fra biocid-eksponeringsforsøg A. Day 0, udgangsstammen. I\_A1-5, uafhængige replikater passeret i medie uden biocid. I\_C1-5, uafhængige replikater passeret med 90 µg/mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

Det ses af MIC bestemmelserne for USA300 derivaterne, at alle H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-eksponerede stammer har en forøget MIC på 4 gange MIC af udgangsstammen (Figur 7-8). For stammerne passeret i medium uden biocid (eller med BZK; data ikke vist) sås ingen eller en let stigning i MIC (0,5-2 gange MIC), men ikke en ligeså tydelig stigning som for de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-eksponerede stammer.



**Figur 7-9 Hydrogenperoxid MIC af *S. aureus* 8325-4 derivat stammer fra biocid eksponeringsforsøg A. Day 0, udgangsstammen. I\_D1-5, uafhængige replikater passeret i medie uden biocid. II\_B1-5 uafhængige replikater passeret med 60 µg/ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

For den anden *S. aureus* stamme, 8325-4, sås samme tendens som med USA300 stammen; der sås en tydelig adaptering for derivater eksponeret til H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, idet de kunne vokse i 8 gange MIC af udgangsstammen. Der sås desuden nogen variation imellem stammerne passeret uden biocid, idet flere af disse udviste moderat højere MIC (0-4 gange MIC; Figur 7-9). Ved en gentagelse af forsøget, hvori også BZK passerende stammer blev inkluderet, sås ikke samme tydelige adaptering til H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, idet de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-passerede stammer her udviste 2-3 gange øget MIC. Dette illustrerer igen de udsving, der sås mellem gentagelser ved forsøg med det relativt ustabile H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



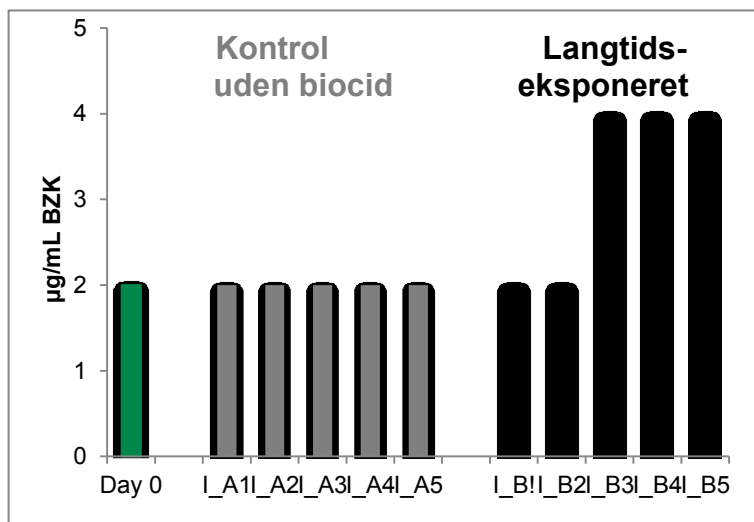
**Figur 7-10 Hydrogenperoxid MIC af *L. monocytogenes* stammerne EGDe og LA111 derivatstammer fra biocid-eksponeringsforsøg B. Dag 0, udgangsstamme. BIII\_A1-5 og BIV\_A1-5 er uafhængige replikater passeret i medie uden biocid. BIII\_C1-5 og BIV\_C1-5 er uafhængige replikater passeret med 260 µg/ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

I kontrast til hvad vi observerede for *S. aureus*-stammerne passeret i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sås imidlertid ikke nogen relativ ændring af MIC-værdierne for de to *L. monocytogenes*-stammer passeret i dette biocid i forhold til udgangsstammen (Figur 7-10). Der sås desuden en lavere MIC for alle stammer, end der blev målt i de indledende forsøg (Tabel 7-1).

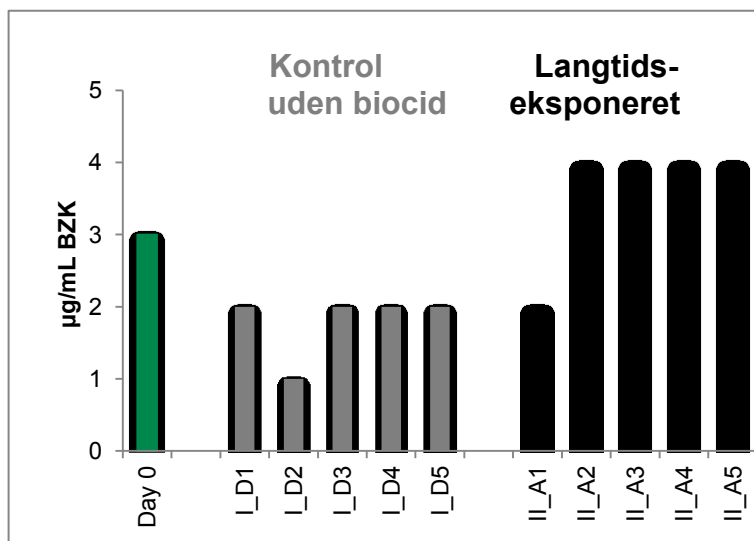


### 7.3.2 Benzalkoniumklorid

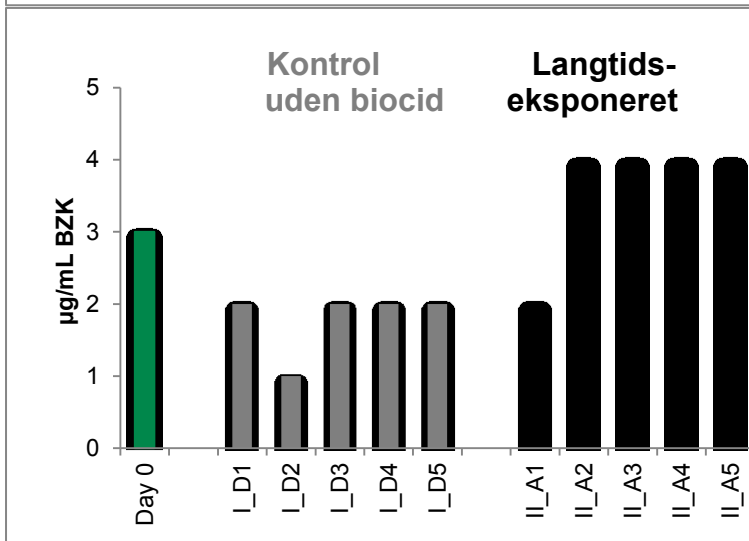
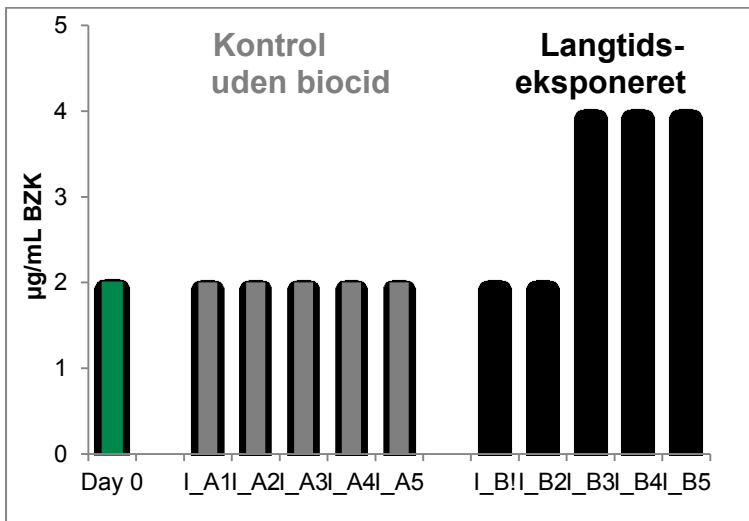
Der blev ligeledes målt MIC-værdier for BZK for både *S. aureus* og *L. monocytogenes* udgangsstammer og langtidseksponerede (passerede) stammer.



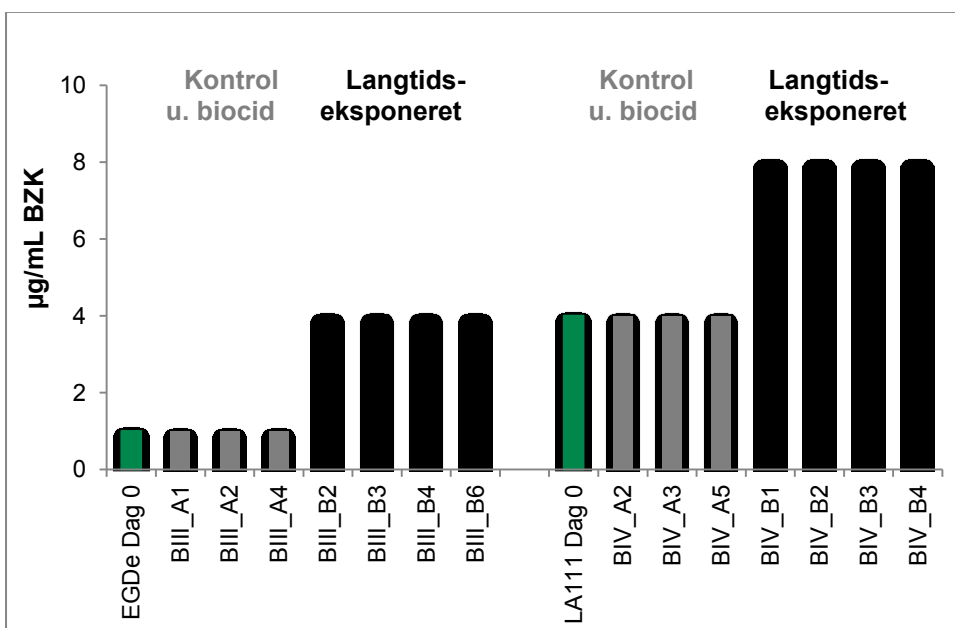
Figur 7-11 Benzalkoniumklorid MIC af *S. aureus* USA300 derivat stammer fra biocid eksponeringsforsøg A. Day 0, udgangsstammen. I\_A1-5, uafhængige replikater passeret i medie uden biocid. I\_B1-5, uafhængige replikater passeret med 1,0 µg/mL BZK.



Figur 7-12 Benzalkoniumklorid MIC af *S. aureus* 8325-4 derivat stammer fra biocid eksponeringsforsøg A. Day 0, udgangsstammen. I\_D1-5, uafhængige replikater passeret i medie uden biocid. II\_A1-5, uafhængige replikater passeret med 1,0 µg/ml BZK.



Figur 7-12, var der en forøgelse af BZK MIC for flere af de BZK-eksponerede *S. aureus*-stammer i forhold til udgangsstammen (dag 0) og kontrolstammerne passeret i medie uden biocid. Det var dog ikke muligt at se adaptering i alle replikater ved MIC-bestemmelser. For stammen 8325-4 sås desuden en tendens til, at også derivater passeret med H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> har en øget BZK MIC (data ikke vist).

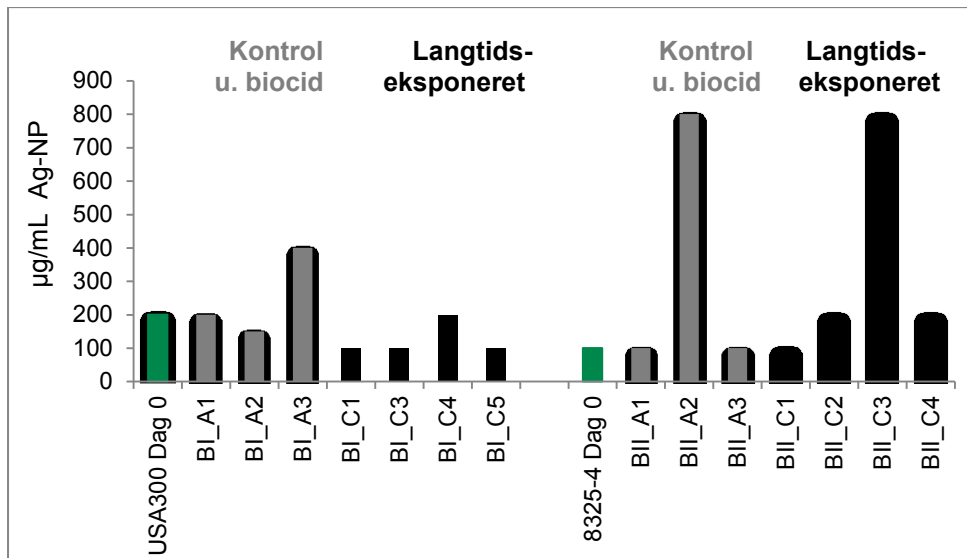


**Figur 7-13 Benzalkoniumklorid MIC af *L. monocytogenes* EGDe og LA111 derivatstammer fra biocid-eksponeringsforsøg B. Dag 0, udgangsstamme. BIII\_A1-5 og BIV\_A1-5 er uafhængige replikater passeret i medie uden biocid. BIII\_B1-6 og BIV\_B1-6 er uafhængige replikater passeret med hhv. 0,7 og 3,0 µg/mL BZK.**

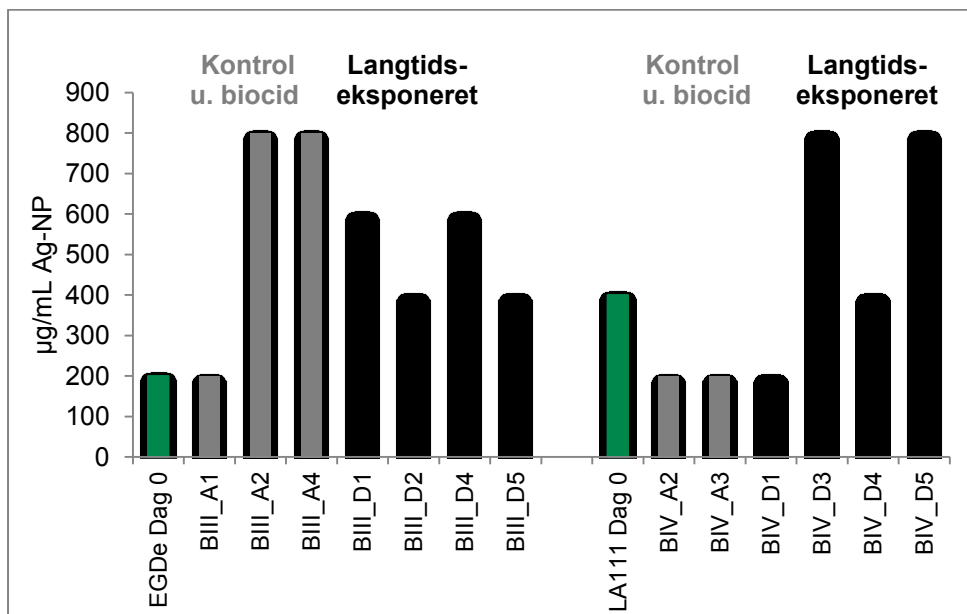
For *L. monocytogenes*-stammerne sås tydelig adaptering til BZK ved længerevarende eksponering for dette biocid, idet de BZK-passerede derivater udviste 2-4 gange højere BZK MIC-værdier end udgangsstammerne og derivaterne passeret uden biocid (Figur 7-13).

### 7.3.3 Nanosølv

De to *S. aureus* stammer samt de to *L. monocytogenes* stammer blev langtidseksponeret i 40 dage til sølv-nanopartikler (Ag-NP) i Eksponeringsforsøg B og der blev udført kontroller med udgangsstammer, der blev passeret dagligt uden biocid. Efterfølgende blev der udført MIC bestemmelser for at måle eventuelle ændringer i biocidtolerancen efter eksponering.



Figur 7-14 Sølvnitrat (Ag-NP) MIC af *S. aureus* USA300 og 8325-4 udgangsstammer (Dag 0), derivater passeret uden biocid (Kontroller; BI\_A1-5 og BII\_A1-5) samt derivater passeret med 180 µg/mL Ag-NP (BI\_C1-5 og BII\_C1-5).

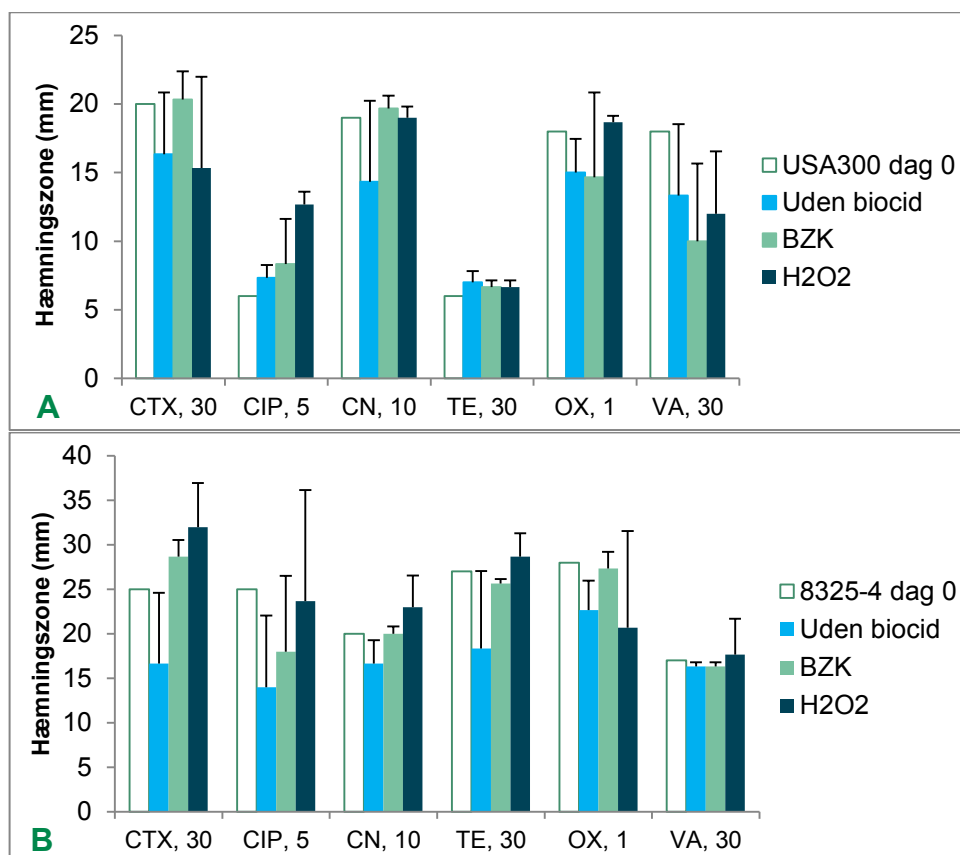


Figur 7-15 Sølvnitrat (Ag-NP) MIC af *L. monocytogenes* EGDe og LA111 udgangsstammer (Dag 0), derivater passeret uden biocid (Kontroller; BIII\_A1-5 og BIV\_A1-5) samt derivater passeret med 180 µg/mL Ag-NP (BIII\_D1-5 og BIV\_D1-5).

På grund af den mørke farve af Ag-NP var det ikke muligt, at vurdere MIC værdierne ved traditionel visuel bedømmelse af vækst. Derfor blev MIC værdierne estimeret på baggrund af fravær af tydelig vækst efter udpladning af MIC prøverne på uselektive agarplader. For EGDe sås, at både derivater passeret med Ag-NP og to ud af tre derivater passeret uden biocid havde øget MIC (2-4 gange MIC), mens der for LA111 sås både højere og lavere MIC (2 gange) for derivater passeret i Ag-NP i forhold til udgangsstammen. Det vurderedes, at resultaterne var for usikre til at drage nogen konklusioner, og at Ag-NP følsomhed ikke kan vurderes ved normale, standardisere laboratoriemetoder.

### 7.3.4 Antibiotika krydsresistens

Det blev undersøgt hvorvidt de biocid-eksponerede stammer havde ændret antibiotikafølsomhed i forhold til deres udgangsstamme. Dette blev udført med agar disk-diffusion, hvor papirdisks (6 mm i diameter) med antibiotika anbringes på agar inokuleret med bakterier. Efter overnatsinkubation blev diameteren på væksthæmningszonen omkring diskene målt.

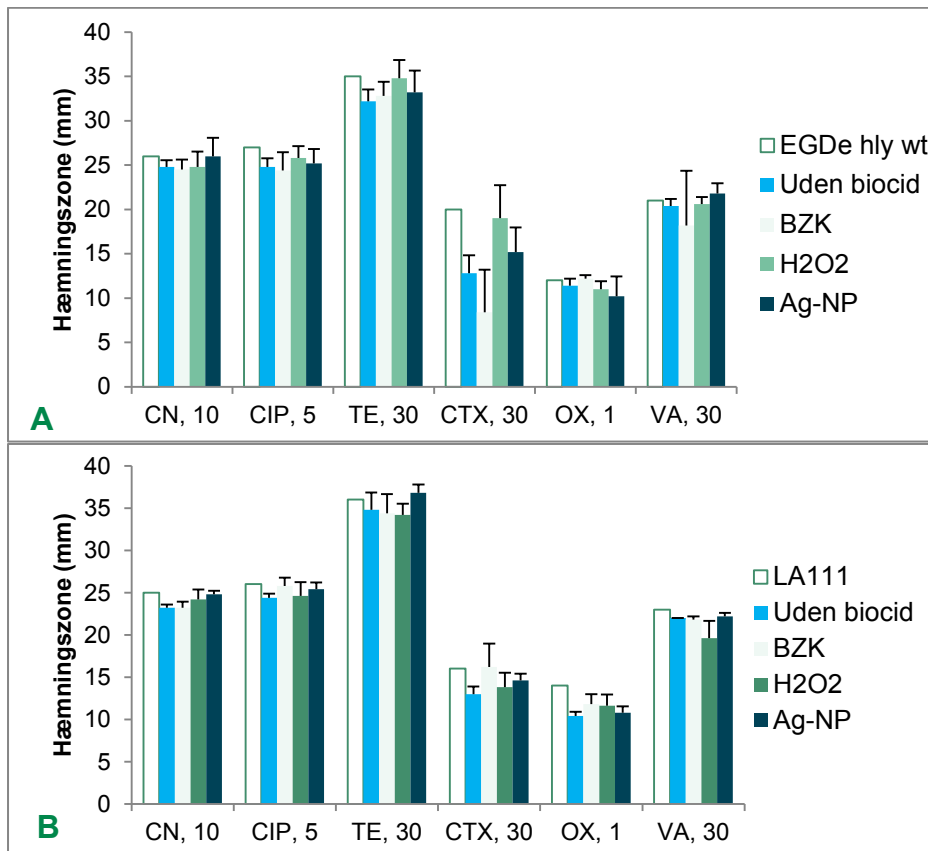


**Figur 7-16 Væksthæmningszoner (mm) omkring disks med antibiotika af A) *S. aureus* USA300 derivater fra biocideksponeringsforsøg:** Uden biocid; gennemsnit af I\_A1-5 passeret uden biocid, BZK; gennemsnit af I\_B1-5 passeret med 1,0 µg/mL BZK, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; gennemsnit af I\_C1-5 passeret med 90 µg/mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> samt B) *S. aureus* 8325-4 derivater fra biocideksponeringsforsøg: Uden biocid; gennemsnit af I\_D1-5 passeret uden biocid, BZK; gennemsnit af II\_A1-5 passeret med 1,0 µg/mL BZK, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; gennemsnit af II\_B1-5 passeret med 60 µg/mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. CTX, cefotaxime; CIP, ciprofloxacin; CN, gentamycin; TE, tetracyclin; OX, oxacillin; VA, vancomycin

Analysen viste, at der i nogle tilfælde var store forskelle imellem *S. aureus* derivater, der havde undergået den samme eksponering eller passage uden biocid. Det kan aflæses som umiddelbart tilfældige ændringer i antibiotikafølsomheden, og der sås ikke nogen markant og reproducerbar ændring i antibiotikafølsomheden for alle derivater af samme eksponering, der korrelerer med biocid-eksponeringen. På grund af de tilfældige udsving viser figur 7-17 A & B gen-

nemsnittet for de fem uafhængige replikater fra hver eksponering og for hvert antibiotika.

For *L. monocytogenes* er der udover BZK og H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> desuden resultater for derivaterne eksponeret til Ag-NP.



**Figur 7-17 Væksthæmningszoner (mm) omkring disks med antibiotika af A) *L. monocytogenes* EGDe derivater fra biocideksponeringsforsøg: Uden biocid; gennemsnit af BIII\_A1-6 passeret uden biocid, BZK; gennemsnit af BIII\_B2-6 passeret med 0,7 µg/mL BZK, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; gennemsnit af BIII\_C1-6 passeret med 260 µg/mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Ag-NP; gennemsnit af BIII\_D1-6 passeret med 180 µg/mL Ag-NP samt B) *L. monocytogenes* LA111 derivater fra biocideksponeringsforsøg: Uden biocid; gennemsnit af BIV\_A1-6 passeret uden biocid, BZK; gennemsnit af BIV\_B1-6 passeret med 3,0 µg/mL BZK, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; gennemsnit af BIV\_C2-5 passeret med 260 µg/mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Ag-NP; gennemsnit af BIV\_D1-5 passeret med 180 µg/mL Ag-NP. CTX, cefotaxime; CIP, ciprofloxacin; CN, gentamycin; TE, tetracyclin; OX, oxacillin; VA, vancomycin.**

Ligesom for *S. aureus* stammerne, sås udsving i *L. monocytogenes* stammerne passeret med og uden biocid om end i mindre grad, og der sås fortsat ingen gennemgående og markant ændring, der umiddelbart kunne tilskrives eksponeringen til biocid (Figur 7-17).

## 7.4 Biocid-eksponerings påvirkning af virulensgen-ekspression

For at få et indtryk af om ekspressionen af vigtige virulensgener var ændret i de eksponerede stammer, blev det undersøgt hvorledes *hla* genet, som koder for alpha-hemolysin, var udtrykt i *S. aureus* 8325-4 stammen. Den biocideksponerede stamme 8325-4 *hla:lacZ* bærer reporterfusionen *hla:lacZ*, som tillader bestemmelse af toksinproduktionen via måling af galactosidase aktiviteten. Således blev graden af blåfarvning for biocid-eksponerede *S. aureus* 8325-4 *hla* stammer sammenlignet med udgangsstammen på agarplader med X-gal.

**Tabel 7-6 Undersøgelse af *hla:lacZ* ekspression hos *S. aureus* 8325-4 *hla:lacZ* stammer fra biocid eksponeringsforsøg A. Ca 50-200 CFU udpladet på TSA med X-gal og efter inkubering blev graden samt variationen af blåfarvning blandt kolonierne vurderet visuelt.**

Stamme	Biocid eksponering	Beskrivelse af kolonimorfologi
Dag 0	Udgangsstamme	Kun mørkeblå kolonier
I_D1	0	Lyseblå
I_D2	0	Lyseblå, få hvide
I_D3	0	Mix; lyseblå og hvide
I_D4	0	Kun hvide
I_D5	0	Mix; lyseblå og hvide
II_A1	1 µg/mL BZK	Lyseblå
II_A2	1 µg/mL BZK	Hvide, < 5% mørkeblå
II_A3	1 µg/mL BZK	Hvide, < 5% mørkeblå
II_A4	1 µg/mL BZK	Mix; lyseblå og hvide
II_A5	1 µg/mL BZK	Lyseblå
II_B1	60 µg/mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Lyseblå, < 5% mørkeblå
II_B2	60 µg/mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Ingen vækst
II_B3	60 µg/mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Ingen vækst
II_B4	60 µg/mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hvide, < 5% mørkeblå
II_B5	60 µg/mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Ingen vækst

Dette viste, at *hla* ekspressionen var nedsat efter den længerevarende serielle passering, idet både kontrol stammer og biocid eksponerede stammer udviste mindre blåfarvning i forhold til udgangsstammen (dag 0) (Tabel 7-6). Yderligere sås det, at de biocid-eksponerede stammer havde en generel lavere grad af blåfarvning og dels en mere heterogen *hla*-ekspression. Det kunne dermed ikke påvises, at biocideksponeringen øgede virulensgen-ekspressionen i *S. aureus* 8325-4 stammen.

## 7.5 Genomanalyser af biocid-eksponerede stammer

På baggrund af de udførte analyser (biocidfølsomhed, antibiotikafølsomhed og virulensgen-ekspression) blev et repræsentativt replikat fra hver behandling udvalgt til fuld genomsekventering og efterfølgende SNP analyse (Single Nucleotide Polymorphism). Disse stammer, listet nedenfor i Tabel 7-7, blev fuld-genomsekventeret i samarbejde med Statens Serum Institut.

**Tabel 7-7 Oversigt over sekventerede stammer inkluderet i SNP analyse**

Stamme	Udgangstamme	Biocideksponering
WT – Dag 0	<i>S. aureus</i> USA300	Ingen eksponering
I_A2	<i>S. aureus</i> USA300	Uden biocid
I_B3	<i>S. aureus</i> USA300	1 µg/mL BZK
I_C5	<i>S. aureus</i> USA300	90 µg/mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
WT – Dag 0	<i>S. aureus</i> 8325-4	Ingen eksponering
I_D2	<i>S. aureus</i> 8325-4	Uden biocid
II_A1	<i>S. aureus</i> 8325-4	1 µg/mL BZK
II_B1	<i>S. aureus</i> 8325-4	60 µg/mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

Genomsekvenserne af de biocid-eksponerede stammer blev analyseret ved SNP analyse, dvs. identifikation af enkelte baseændringer, der adskiller DNA sekvensen af de passerede stammer fra udgangsstammen (WT). Disse SNPs er angivet i Tabel 7-8 og Tabel 7-9 og baseændringer unikke for de biocid-eksponerede stammer er fremhævet med fed skrift. Hvis kendt, er det påvirkede protein fremhævet med rødt og den formodede påvirkede funktion angivet i sidste kolonne. Det ses, at det primært var eksponering til H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, som medførte ændringer af DNA sekvensen. Påvirkede funktioner var primært cellulære transportfunktioner, elektron transport/respiration, cellevægsyntese og *Agr* quorum-sensing systemet.



**TABEL 7-8. Ændringer i DNA sekvensen (SNP analyse) af udgangsstamme (wt) og passerede derivater (40 dages daglig passage) af *S. aureus* USA300. I\_A2: USA300 passeret uden biocid, I\_B3: USA300 passeret i BZK, I\_C5: USA300 passeret i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Biocidkoncentrationer er oplyst i Tabel 7-7.**

wt	I_A2	I_B3	I_C5	Ændring	Funktion af det berørte protein
C	C	C	G	P>R change in possible transcriptional regulator	
A	A	A	G	D>G change in LysA (diaminopimelate decarboxylase)	Beta-lactam antibiotic resistance
T	G	T	T	intergenic region between 0494 and rplY	
G	G	G	C	intergenic region between 0494 and rplY	
G	G	G	T	S>I change in AAA family ATP-binding protein	
G	G	G	T	M>I change in iron ABC superfamily binding cassette transporter membrane protein	Iron transport
G	G	G	T	V>L change in TagA	Synthesis of cell wall teichoic acid
C	C	C	T	R>C change in acyltransferase (0818)	
G	G	G	A	intergenic region between fold and purE (promoter of purE?)	Purine biosynthesis
G	G	G	C	A>P change in CytA (cytochrome d ubiquinol oxidase subunit 1)	Electron transport chain
C	C	C	G	A>G change in PbpA (penicillin binding protein 1)	Cell division
C	C	C	T	A>V change in USA300HOU_1161 unknown protein	
C	C	C	G	K>N change in MsrA1 (peptide-methionine (S)-S-oxide reductase)	Oxidative stress
G	G	G	T	G>C change in FemB (methicillin resistance factor FemB)	Methicillin resistance
A	A	A	T	M>K (start codon) in Fur family transcription regulator (1856)	Iron uptake
T	T	T	A	STOP codon in bacteriophage tail length tape measure protein(1959)	Phage protein
A	A	T	A	agrB promoter	Agr quorum sensing
C	C	C	A	secretory antigen STOP codon intro	
C	C	C	A	G>V change APC family amino acid-polyamine-organocation transporter	
C	C	C	A	silent possible transcriptional regulator	

**Tabel 7-9 Ændringer i DNA sekvensen (SNP analyse) af udgangsstamme og passerede derivater (40 dages daglig passage) af *S. aureus* 8325-4.** I\_D2: 8325-4 passeret uden biocid. II\_A1: 8325-4 passeret i BZK. II\_B1: 8325-4 passeret i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Biocidkoncentrationer er oplyst i Tabel 7-7.

wt	I_D2	II_A1	II_B1	Ændring	Funktion af det berørte protein
C	C	G	C	intergenic possible promoter of <i>norA</i>	Efflux pumpe
C	C	C	G	stop codon in SA0uHSC_00764 (hypothetical protein)	
G	G	G	A	silent mutation in SAOUHSC_00877	
T	T	T	A	silent mutation in SAOUHSC_00945	
C	T	T	C	intergenic possible promoter of gene for <i>enoyl-(acyl carrier protein) reductase</i>	FabI involved in Triclosan tolerance
C	C	C	T	silent mutation in SAOUHSC_00952	
G	T	G	G	silent mutation in SAOUHSC_01013	
G	G	G	A	G>E change in <i>carbamate kinase</i>	
G	G	A	G	intergenic between SAOUHSC_01452 and 01453	
C	A	C	C	intergenic between SAOUHSC_01630 and 01632	
A	A	A	T	V>E change in <i>ferric uptake</i> regulator-like protein	Iron uptake
G	G	G	A	A>V change in <i>ABC transporter ATP-binding/permease</i>	Transporter
C	C	C	T	silent mutation in SAOUHSC_02006	
G	G	G	A	G>D change in <i>Agr C</i>	Agr quorum sensing
G	G	G	A	T>I change in respiratory <i>nitrate reductase</i> subunit gamma	Respiration

Det er bemærkelsesværdigt, at begge hydrogenperoxid-eksponerede derivater har mutationer i gener relateret til jern-optag (*ferric uptake regulator/fur*; Tabel 7-8 og 7-9), idet jernoptaget spiller en vigtig rolle i cellens respons til oxidativt stress. Der sås dog mange SNP's efter det oxidative stress med H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, så det er svært at pege entydigt på mutationer, der kan spille en rolle. Anderledes så det ud for derivater passeret med BZK, idet der i USA300 kun blev registreret en mutation i en *AgrB* promotor, mens der i 8325-4 stammen sås en mutation i promoterregionen for efflux pumpen *NorA*.

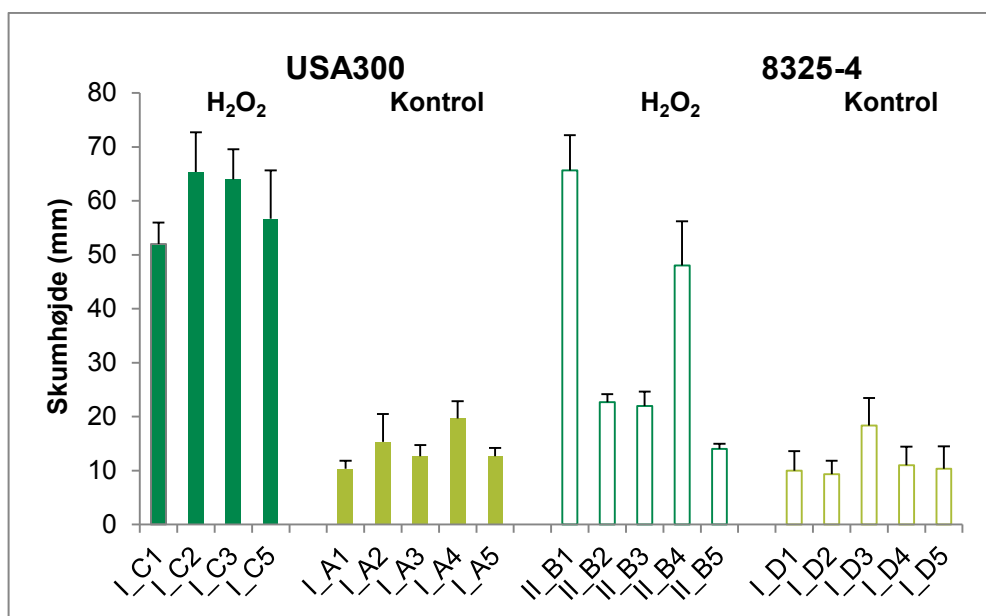
## 7.6 *qac*-gen analyser

Der blev fundet *qac*-gener i 11 ud af 94 analyserede stafylokokker, fordelt på 8 ud af 25 *S. hominis*, 1 ud af 44 *S. epidermidis*, 1 ud af 3 *S. saprophyticus*, og 1 ud af 6 *S. warneri*. Der blev ikke fundet *qac* gener i 3 *S. aureus*, 5 *S. haemolyticus* eller i 8 *S. capitis*.

De *qac*-bærende stafylokokker havde en gennemsnitlig MIC-værdi for BZK på 3,91 µg/ml (st.avg 1,70), mens de ikke *qac*-bærende havde en gennemsnitlig MIC-værdi på 1,37 µg/ml (st.avg 1,17).

### 7.6.1 Katalase-aktivitet

Som følge af at derivaterne eksponeret til hydrogenperoxid begge havde mutationer i *fur/fur*-lignende gener (Afsnit 7.5), blev det vurderet relevant at undersøge katalase-aktiviteten i disse stammer. Et hurtigt og visuelt assay blev valgt til at bestemme stammernes respons (katalase-aktivitet) til oxidativt stress, forårsaget af H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Enzymet katalase nedbryder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> til vand og ilt, og i dette assay fanges ilten som luftbobler i Triton X-100. Katalase-aktiviteten kan derefter måles som højden af det dannede skum.



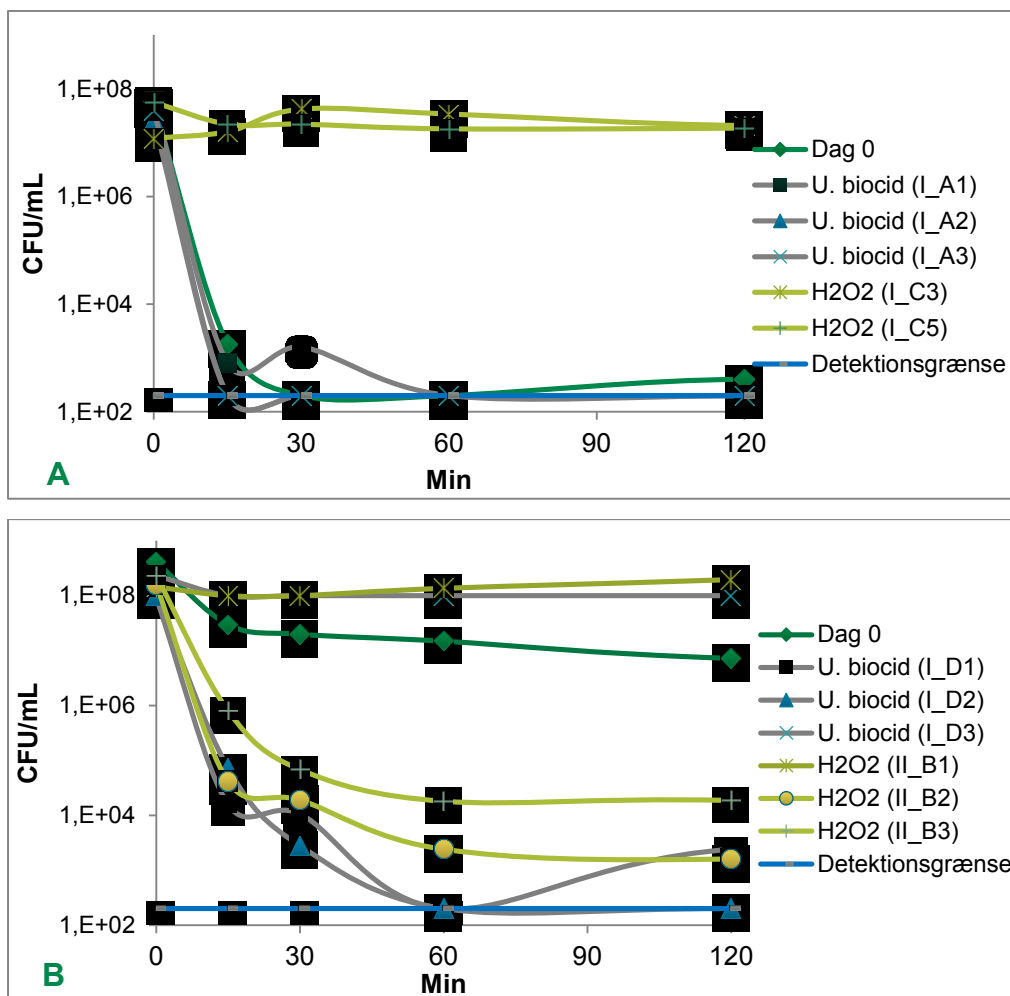
**Figur 7-18 Katalase-aktivitet målt som skumhøjde (mm) for *S. aureus* USA300 (I\_C1-5 & I\_A1-5) og for *S. aureus* 8325-4 (II\_B1-5 & I\_D1-5) eksponeret til hydrogenperoxid i 40 dage (mørkegrønne søjler) og udgangsstammer (Kontrol; lysegrønne søjler). Resultaterne er opgjort som gennemsnit for tre replikater**

Det ses af Figur 7-18 at de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-eksponerede stammer (I\_C1-5 & II\_B1-5) i alle tilfælde havde højere katalase-aktivitet end deres udgangsstamme. Det er tydeligt, at især de fire USA300 derivater havde markant forhøjet katalase-aktivitet, mens to ud af fem 8325-4 derivater ligeledes havde høj katalase-aktivitet.

## 7.6.2 Overlevelse i høje koncentrationer af biocider

Idet den længerevarende biocideksponering havde påvirket bakterierne MIC, så de var blevet adapteret til langt over den koncentration, de blev eksponeret til, undersøgte det, hvordan de eksponerede stammers biocidmodstandsdygtighed var blevet ændret i forhold til høje koncentrationer af biocider. Dette blev analyseret ved time-kill forsøg (drabskurver), hvor bakterierne blev udsat for høje biocidkoncentrationer, og drabshastigheden/overlevelsen herefter målt over tid. Herved kunne opnås en vurdering af, hvor modstandsdygtige de eksponerede stammer var blevet under betingelser, som i højere grad efterligner biocidpåvirkningen i miljøet, hvor der anvendes høje koncentrationer i kort tid.

Indledningsvis blev der afprøvet serier af høje koncentrationer af H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for at vurdere ved hvilket niveau, de mest hårdføre derivater kunne overleve (resultater ikke vist), og derefter blev der udført en sammenligning mellem udgangsstamme samt passerede derivater.

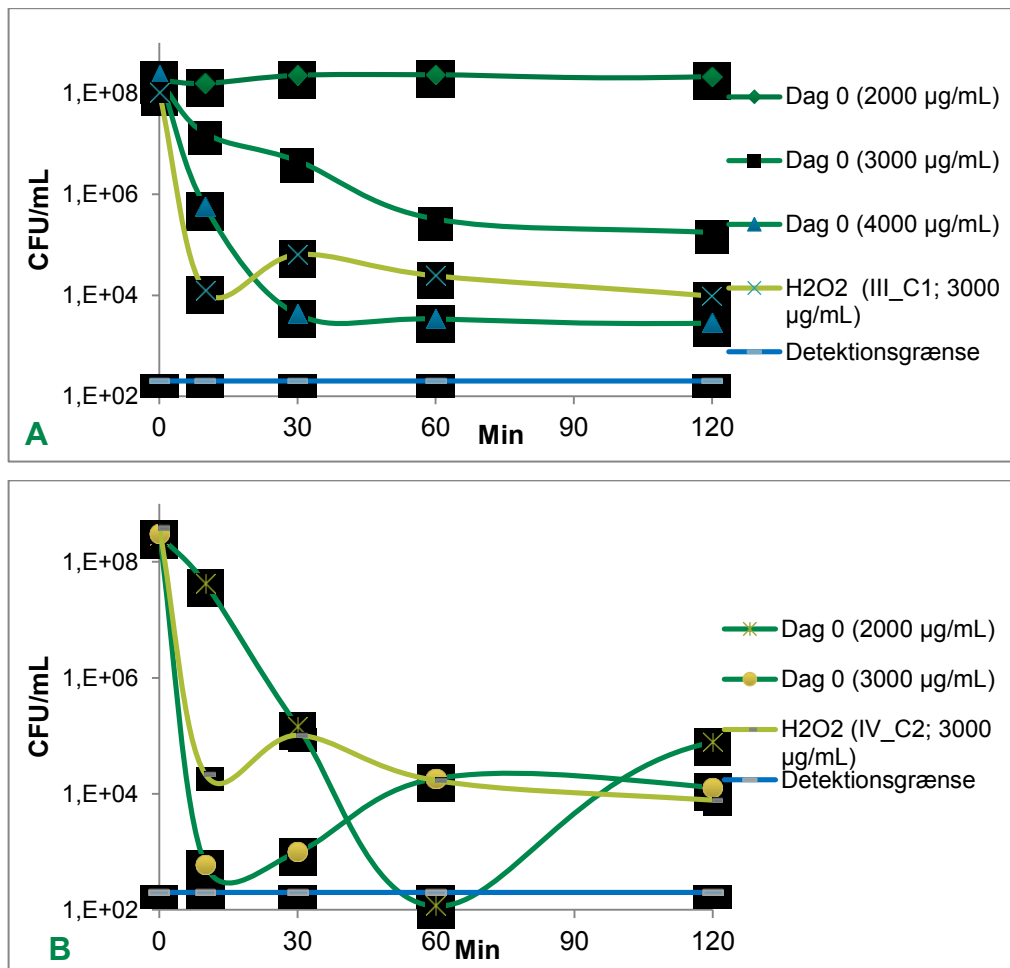


Figur 7-19 Drabskurver (time-kill) for *S. aureus* stammer: A) USA300 derivater (passeret uden biocid (I\_A1-3) og med 90 µg/mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (I\_C3-5)) udsat for 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> og B) 8325-4 derivater (passeret uden biocid (I\_D1-3) og med 60 µg/mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (II\_B1-3)) udsat for 1,5 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

For *S. aureus* USA300 derivaterne var der tydelig forskel på drabseffekten af 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30.000 µg/mL). Det ses af Figur 7-19A, at de to derivater passeret med H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> var uberørte af den høje biocidkoncentration, mens derivater passeret uden biocid, såvel som udgangs stammen blev markant reduceret indenfor 15-30 min. For *S. aureus* 8325-4 (Figur 7-19B) sås ikke den samme tydelige effekt af eksponering til 1,5 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, idet både udgangs stammen, ét derivat eksponeret

til H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> samt ét derivat passeret uden biocid overlevede den høje biocidkoncentration med kun en mindre reduktion i antal (0-2 LOG reduktion). For de øvrige derivater sås langsommere drab af derivater passeret i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sammenlignet med derivater passeret uden biocid.

For *L. monocytogenes* stammerne blev der ligeledes udført drabskurver med H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, men der sås ikke en udtalt forskel på drabseffekten af biocidet imellem stammerne.



**Figur 7-20 Drabskurver (time-kill) for *L. monocytogenes* stammer: A) EGDe derivater (Dag 0= Udgangsstammen og III\_C1 passeret med 260 µg/mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) udsat for 2000-4000 µg/mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> og B) LA111 derivater (Dag 0= Udgangsstammen og IV\_C2 passeret med 260 µg/mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) udsat for 2000 og 3000 µg/mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

For *L. monocytogenes* EGDe (Figur 7-20A) sås det, at udgangsstammen var upåvirket ved 2000 µg/mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, men til gengæld blev tiltagende hurtigere reduceret ved hhv. 3000 og 4000 µg/mL. Til sammenligning blev EGDe-derivatet passeret i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduceret hurtigere end derivatet passeret uden biocid, og der kunne dermed ikke spores en bedre overlevelse efter eksponering. Resultatet for LA111 stemte overens med resultatet for EGDe (Figur 7-20B).

## 7.7 Kortlægning af desinfektionsmidler på Hvidovre Hospital

### Hånddesinfektion

Til desinfektion af hænder hos sygeplejersker og andet plejepersonale anvendes udelukkende forskellige ethanolbaserede produkter, hvoraf enkelte produkter er tilsat glycerol. Produkterne, der blev identificeret i kortlægningen (se Tabel 7-10), er produceret eller leveret af virksomhederne Sterisol, PLUM og Abena. Ved kirurgisk hånddesinfektion bruges udover ethanol også klorhexidin som ekstra biocidaktivstof.

### Instrumentdesinfektion

Ved dekontaminering af fleksible endoskoper og tilbehør anvendes til dels kemisk desinfektion. Her tilsættes små mængder pereddikesyre til skyllevandet i endoskopvaskemaskiner. Desuden anvendes også en blanding af pereddikesyre/hydrogenperoxid til endoskopdesinfektion. Udover disse biocidaktivstoffer anvendes ethanol baserede produkter (wet wipes) til at rengøre de steder på endoskoperne, som er svære at rengøre med anden form for desinfektion. Der blev ikke fundet produkter indeholdende kvaternære ammoniumforbindelser i forbindelse med desinfektion af endoskoper og andet invasivt udstyr på sterilcentralen.

### Desinfektion af overflader

Til desinfektion af overflader som vandhaner, toiletknapper, tastaturer, dørhåndtag, stikkontakter, fjernbetjening, hospitalstelefoner mm på almindelige sengeafsnit, ambulatorieafsnit, operationsafdeling, isolationsstuer, sengevask og kantineområde viste kortlægningen, at der var anvendt desinfektionsprodukter indeholdende forskellige kvaternære ammoniumforbindelser som ADBAC, DDAC og benzalkoniumklorid. De kvaternære ammoniumforbindelser er enten anvendt i form af wet wipes eller af flydende formuleringer. Især i forbindelse med vask og desinfektion ved den manuelle sengevask blev der identificeret et stort forbrug af desinfektionsmiddel med kvaternære ammoniumforbindelser.

**Tabel 7-10 Oversigt over desinfektionsmidler, der bruges på Hvidovre Hospital (kvaternære ammoniumforbindelser er fremhævet med fed skrift under "Biocidaktivstof")**

Afdeling	Desinfektionsmiddel (Producent)	Anvendelsesområde	Biocidaktivstof	Bruger
<b>Alm. sengeafsnit og afdelinger, ambulatorieafsnit</b>	Håndsprit (Sterisol)	Hænder	Ethanol	Sygeplejerske
	Gul klud (WetWipe)	Overflader; f.eks. vandhaner, toiletknapper, tastaturer, dørhåndtag, stikkontakter, fjernbetjening, hospitalstelefoner mm.	PHMB <1% (polyhexamethylen-biguamid) <b>ADBAC &lt;1% (alkyldimethylbenzyl-ammoniumchlorid)</b>	Sygeplejerske Eksternt rengøringsteam (Forenede Service)
<b>Operationsafdeling (dagkirurgisk og centraloperation)</b>	Håndsprit (Sterisol)	Hænder	Ethanol	Sygeplejerske
	Gul klud (WetWipe)	Overflader; f.eks. vandhaner, toiletknapper, tastaturer, dørhåndtag, stikkontakter, fjernbetjening, hospitalstelefoner mm.	PHMB <1% (polyhexamethylen-biguamid) <b>ADBAC &lt;1% (alkyldimethylbenzyl-ammoniumchlorid)</b>	Sygeplejerske Eksternt rengøringsteam (Forenede Service)
	Kirurgisk hånddesinfektion (Abena)	Hænder og underarme før operation Huddesinfektion af patient, udvortes	Ethanol 85% Klorhexidin 0,5%	Læge Sygeplejerske
	Slimhindedesinfektion	Slimhinder, såsom vagina, glans, endetarm	Klorhexidin 0,2% <b>Cetrimid 0,1%</b>	Læge Sygeplejerske
<b>Isolationsstuer</b> Hyppighed: 30 isolationer om dagen på HH; 700 rengøringer af isolationsstuer om måneden; forbruger 9000 klorklude om måneden	Håndsprit (Sterisol)	Hænder	Ethanol	Sygeplejerske
	Gul klud (WetWipe)	Overflader; f.eks. vandhaner, toiletknapper, tastaturer, dørhåndtag, stikkontakter, fjernbetjening, hospitalstelefoner mm.	PHMB <1% (polyhexamethylen-biguamid) <b>ADBAC &lt;1% (alkyldimethylbenzyl-ammoniumchlorid)</b>	Sygeplejerske Eksternt rengøringsteam (Forenede Service)
	Klor klud (WetWipe)	Udstyr, inventar og kontaktpunkter ved patienter i isolation	Aktivt klor, 1000-1200 ppm	Sygeplejerske Eksternt rengøringsteam (Forenede Service)
<b>Sengevask</b> Hyppighed: 200-250 senge om dagen rengøres og desinficeres ved sengevask	Sekumatic FDR (Ecolab)	Automatisk rengøring, doseres i sengevasker	Propan-2-ol 10% <b>Benzalkonium klorid 1%</b>	Internt rengøringspersonale
	Mikro-Quat Extra (Ecolab)	Manuel rengøring, udføres når maskinen ikke kan bruges	<b>Benzalkonium klorid 5-10%</b> <b>DDAC 1% (didecyldimethyl-ammoniumklorid)</b>	Internt rengøringspersonale
<b>Sterilcentral</b>	Peredikkesyre	Dekontaminering af fleksible endoskoper og tilbehør. Små	Peredikkesyre Peredikkesyre/hydrogen peroxid blanding	Sygeplejerske

		mængder pereddikesyre tilsættes skyllevandet i nogle endoskopvaskemaskiner		
	Wet Wipe Triamin Disinfection (WetWipe)	Desinfektion af borde og andre overflader	Laurylamine Dipropylenediamine	Sygeplejerske
	Hospitalssprit 70 % (PLUM)	Lettere desinfektion af instrumenter	Ethanol denatureret med isopropylalkohol	Sygeplejerske
	Sterisol disinfectant Ethanol (Sterisol)	Desinfektion af hænder	Ethanol	Sygeplejerske
	Hånddesinfektion 85% m. glycerol (PLUM)	Desinfektion af hænder	Ethanol	Sygeplejerske
<b>Kantine</b>	Suma Bac D10 (Diversey)	Desinfektion af overflader, pålægmaskine mm.	<b>ADBAC 3-10% (alkyldimethylbenzylammoniumchlorid)</b>	Kantinepersonale
	Desinfect Maxi (Novadan)	Desinfektion af overflader, pålægmaskine mm.	<b>DDAC 5-15% (didecyldimethylammoniumchlorid)</b>	Kantinepersonale
	Ethanol Disinfection 70% wipe (Wet Wipe)	Desinfektion af andre overflader samt som supplement	2-Propanol Ethanol	Kantinepersonale



## 7.8 Procedurer for rengøring og desinfektion af senge og hjælpemidler

Rengøring og desinfektion af senge og hjælpemidler foregår på HH på to etager: I kælderetagen, hvor der rengøres og desinficeres manuelt, samt i stueetagen, hvor en automatisk sengevaske forefindes.

Rengøringsrummet i kælderetagen fungerer som opsamlingspunkt for alle snavsede senge og hjælpemidler. Voksensenge bringes løbende via en elevator op til stueetagen hvor de rengøres og desinficeres i den automatiske sengevaske. Mindre hjælpemidler, såsom krykker, anbringes i "bure" med samme mål som voksensenge og vaskes ligeledes i den automatiske sengevaske.

Rengøringsrummet i kælderetagen er delt op i et område for de snavsede senge og hjælpemidler og et område for rengjorte senge og hjælpemidler. Selve den manuelle rengøring og desinfektion foregår i et vaskeområde imellem det snavsede og det rene område. Rengøringen foregår ved at en blanding af desinfektionssæbe og lunkent vand (målt til ca. 20 °C) sprayes på sengen.

Typisk vaskes 8-9 børne- eller juniorsenge ad gangen. Sæben sidder på i ca. 2-3 min, hvorefter sengene skylles i rent varmt vand i ca. 4 min. Efterfølgende tørres sengene manuelt med viskestykker. Der anvendes et nyt rent viskestykke til hver seng eller objekt, der rengøres.

Voksensenge og hjælpemidler, der er vasket i den automatiske sengevaske, bringes via en anden elevator ned i kælderen til det rene område, hvor de sammen med alle andre senge redes og klargøres til nye patienter. Sengene overdækkes efterfølgende med klar plastic, som først fjernes, når sengene igen tages i brug på afdelingerne.

## 7.9 Konceptuel model over transmission af stafylokokker

En konceptuel model blev udviklet for at visualisere den sandsynlige transmission og spredning af stafylokokker på HH, der har været i kontakt med QAC-holdige desinfektionsmidler. Modellen fokuserer på rengøringen og desinfektionen af senge og udstyr og tager derfor udgangspunkt i procedurer og arbejdsgange herfor.

Figur 7-21 præsenterer en visuel oversigt over den mulige transmission og spredning af stafylokokker i forbindelse med håndteringen af senge og hjælpemidler under rengøring- og desinfektionsprocedurer. Den mulige transmission af stafylokokker er angivet i form af pile imellem de enkelte processer og arbejdsgange.

Som beskrevet tidligere og vist i Figur 7-21 bliver alle snavsede senge og hjælpemidler transporteret til rengøringsrummet i kælderen, hvor de opsamles i den ene ende (snavsede). Disse senge og hjælpemidler kan allerede være kontamineret med stafylokokker, og der er derfor en risiko for at disse overføres til personalet ved håndteringen. Ligeledes er der en risiko for, at personalet kan kontaminere senge og hjælpemidler.

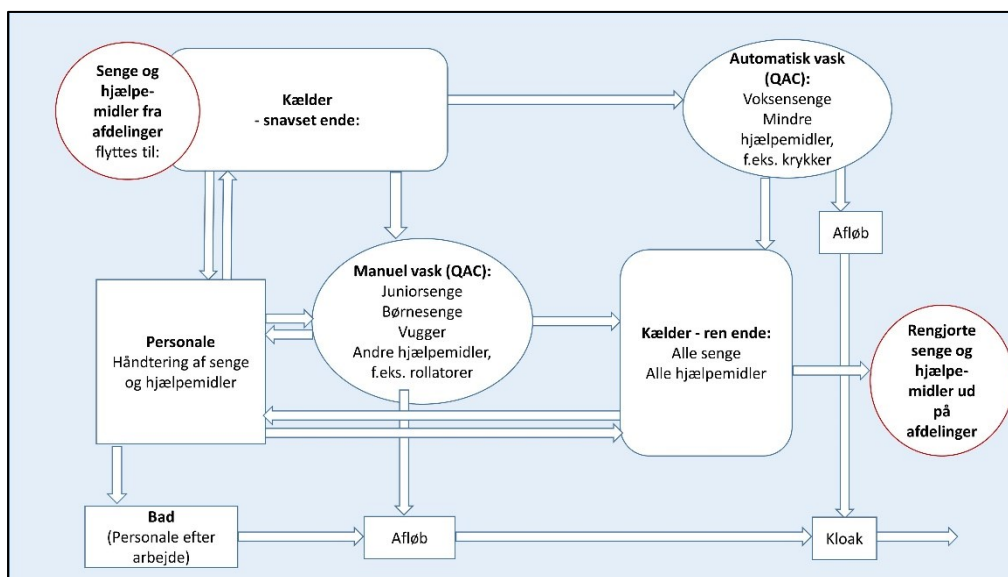
Da junior- og børnesenge, samt større hjælpemidler vaskes manuelt, vil stafylokokker herfra blive ført med ind i vaskeområdet, hvor der er en risiko for, at stafylokokker overføres til børster, svabere og andet rengøringsudstyr. Hvis personalet ikke bærer personlige værnemidler, er der ligeledes en risiko for, at stafylokokker kan overføres mellem personale og senge/hjælpemidler under rengøringen.

Hvis rengøring og desinfektion ikke er tilstrækkelig effektiv, vil kontaminerede senge og hjælpemidler blive overført til den rene ende af kælderen, hvorfra de vil blive ført ud på de enkelte afdelinger.

På samme måde vil voksensenge og hjælpemidler, der stadig måtte være kontamineret med stafylokokker efter den automatiske sengevask, blive transporteret til den rene ende af kælder og på tilsvarende vis sidenhen blive ført ud på de enkelte afdelinger.

Overlevende stafylokokker, der skylles af senge og hjælpemidler under rengøringen, vil via afløb blive spredt til miljøet. Tilsvarende kan stafylokokker også tænkes at spredes til miljøet fra personalet efter bad.

Vi har i dette projekt ikke vurderet hvordan stafylokokker videre kan spredes i miljøet udenfor hospitalet.



Figur 7-21 En konceptuel model over transmissionen af stafylokokker på Hvidovre Hospital fra sengevask til afdelinger

## 7.10 Analyse af den anvendte sæbe

Til fremstilling af den anbefalede brugsopløsning af Mikro-Quat Extra bruges 10-20 ml per liter vand. Det giver en koncentration på 1-2%. Koncentrationen af BAC i koncentreret Mikro-Quat Extra er ifølge SDS 5-10%.

Det blev estimeret ved vejning af sæbebeholder og måling af vandvolumen, at der ved sengevask bruges cirka 50 g Mikro-Quat Extra/liter blandet sæbevand (5% opløsning).

Koncentrationen af benzalkoniumklorid (BAC) og didecyldimethylammoniumchlorid (DDAC-C10) i Mikro-Quat Extra ifølge en analyse foretaget i projektet er vist i tabel 7-11, sammen med den estimerede koncentration i brugsopløsningen. Analysen viser en total BAC koncentration på 7.6% hvilket er i overensstemmelse med data fra produktets SDS. BAC koncentrationen i brugsopløsningen er estimeret til 3,7 g/l og koncentrationen af DDAC-C10 til 0,54 g/l.

Tabel 7-11 Koncentration\* af benzalkoniumklorider\*\* i Mikro-Quat Extra og estimeret

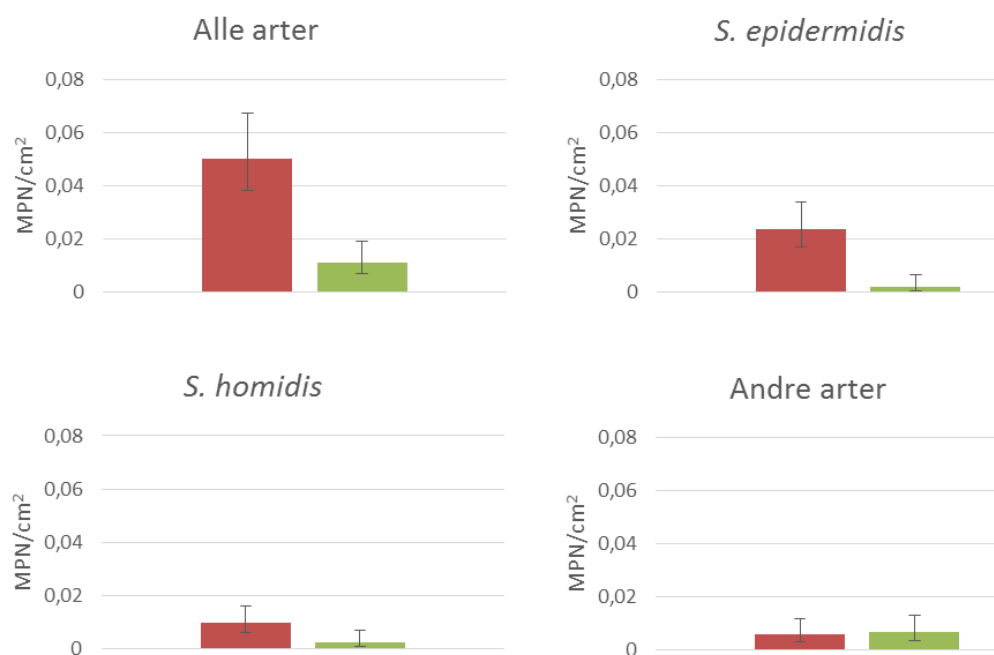
koncentration i brugsopløsningen

Komponent**	Konc. i produkt (g/kg)	LoQ*** (g/kg)	Konc. i brugsopløsning (g/l)
Didecyldimethylammoniumchlorid (DDAC-C10)****	11	0,1	0,54
Benzyltrimethylammoniumchlorid (BAC-C12)	53	0,1	2,6
Miristalkoniumchlorid (BAC-C14)	22	0,1	1,1
Cetalkoniumchlorid (BAC-C16)	0,6	0,1	0,03
Benzalkoniumchlorid, Total (BAC)	76	0,1	3,7

\*Analysen er ikke akkrediteret. \*\*Analysen omfatter ikke BAC-8, BAC-10, og BAC-18. \*\*\*Limit of Quantification. \*\*\*\*Er Ikke en Benzalkoniumchlorid, men en kvarternær ammoniumklorid.

### 7.11 Kvantitativ bestemmelse af *Staphylococcus* spp.

Resultaterne af den kvantitative bestemmelse af stafylokokker med MPN metoden på overflader af senge og hjælpemidler er vist grafisk i Figur 7-22 til Figur 7-28 og i tabelform i Bilag 3.



Figur 7-22: Sammenligning af den gennemsnitlige koncentration med 95% konfidensintervaller af *Staphylococcus* (MPN/cm<sup>2</sup>) på alle senge, vugger og hjælpemidler fordelt på arter. Rød farve viser koncentrationen før rengøring og grøn farve viser koncentrationen efter rengøring. Antallet af positive og totalt antal prøver fremgår af Bilag 3.

I de 150 prøver, der blev udtaget, blev der gjort 68 fund af *Staphylococcus* spp. I 4 af prøverne blev der fundet 2 arter. Dvs. at 64 prøver var positive. Heraf 50 positive prøver ud af 79 prøver udtaget før rengøring, og 14 positive prøver udtaget efter rengøring. Af de 150 prøver blev 1 prøve udtaget i et hul i væggen i vaskeområdet. (Bilag 3)

Figur 7-22 viser den mest sandsynlige koncentration af alle fundne *Staphylococcus* spp. før og efter vask.

Når alle arter blev taget i betragtning, blev koncentrationen bestemt til at være 0,05 MPN/cm<sup>2</sup> før rengøring og 0,011 MPN/cm<sup>2</sup> efter rengøring. *S. epidermidis* og *S. hominis* var de hyppigst forekommende arter, men efter rengøring var koncentrationen af "øvrige arter" højest med en koncentration på 0,007 MPN/cm<sup>2</sup>.

Samlet set (se Tabel 7-12) observeredes en reduktion fra før rengøring til efter rengøring på 91% og 78% for hhv. *S. epidermidis* og *S. hominis*. For "andre arter" kunne der imidlertid ikke detekteres en reduktion. Det skyldtes især mange fund af *S. capitis* på kontrolpaneler.

Der blev fundet 2 *S. aureus*, 1 på en snavset børneseng og 1 på højre skubbehåndtag på en rengjort kørestol.

Der gøres opmærksom på, at summen af koncentrationen af de enkelte arter ikke gav samme resultat som koncentrationen af alle arter. Det skyldes, at der er tilfælde, hvor der blev fundet mere end en art i samme prøver, og at MPN metoden ikke nødvendigvis er additiv.

**Tabel 7-12: Beregnet reduktion (%) af koncentrationen af *Staphylococcus spp.* på senge og hjælpemidler (N=150) før rengøring og efter rengøring.**

Arter	Reduktion	Udstyr	Reduktion
Alle arter	78%	Vugger	84%
<i>S. epidermidis</i>	91%	Alle hjælpemidler <sup>3</sup>	*59%
<i>S. hominis</i>	78%	Alle sidegærder	96%
Andre arter <sup>1</sup>	*-15%	Alle kontrolpaneler <sup>4</sup>	*57%
		Alle fodgærder	87%
		Alle senge	82%
<b>Tidspunkt</b>	<b>Reduktion</b>		
11-4-2016	93%	Alle børnesenge	74%
25-04-2016 <sup>2</sup>	67%	Alle juniorsenge	86%
09-05-2016	84%	Alle voksensenge	86%

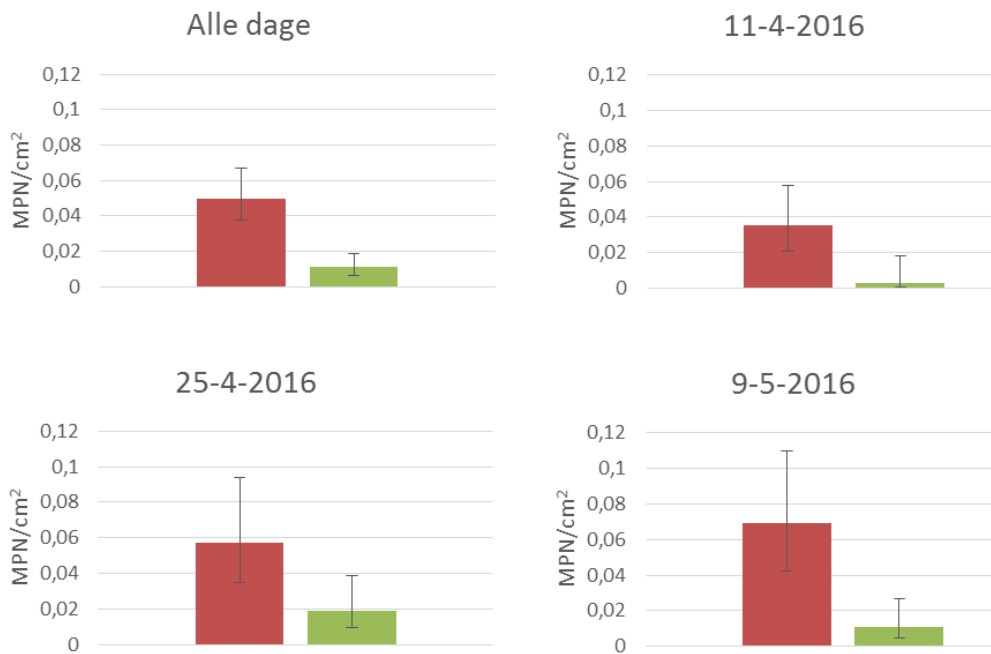
<sup>1</sup> Skyldes 4 fund af *S. capitis*, 2 *S. haemolyticus*, 2 *S. warneri* og 1 *S. aureus* på rengjorte objekter, især på kontrolpaneler og kørestole.

<sup>2</sup> Skyldes 4 fund af *S. capitis*, 1 *S. epidermidis*, 1 *S. hominis*, 2 *S. warneri* og 1 *S. aureus* på rengjorte objekter, især kontrolpaneler.

<sup>3</sup> Skyldes fund på 4 kørestole og 1 rollator på rengjorte hjælpemidler.

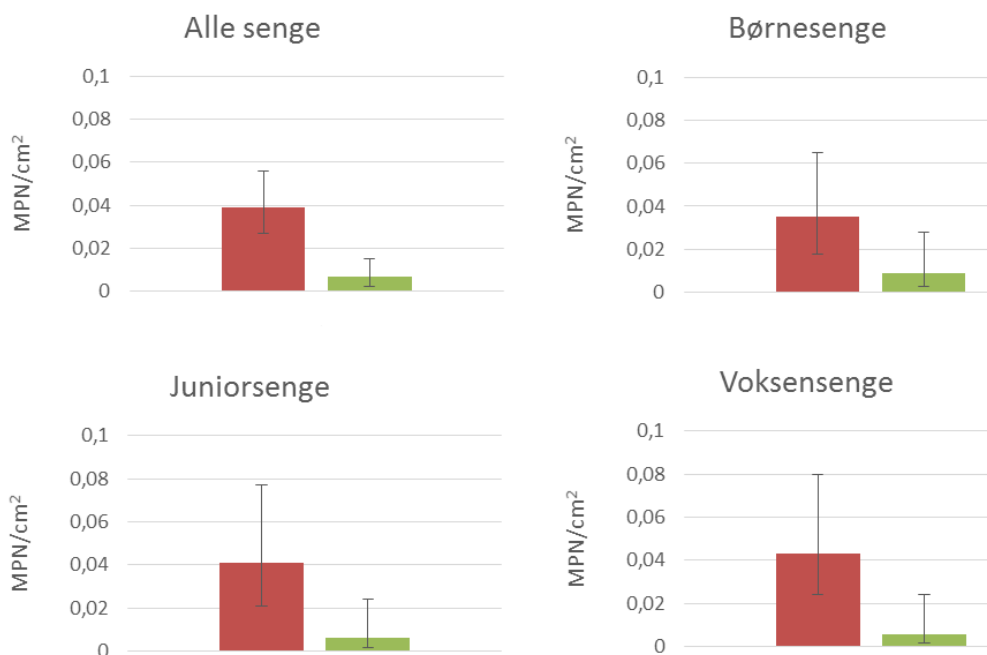
<sup>4</sup> Skyldes 4 fund den 29/4 og 1 fund den 11/4.

\*Ikke en signifikant reduktion vurderet på baggrund af at nedre 95 % konfidensinterval før rengøring overlapper MPN efter rengøring eller omvendt.



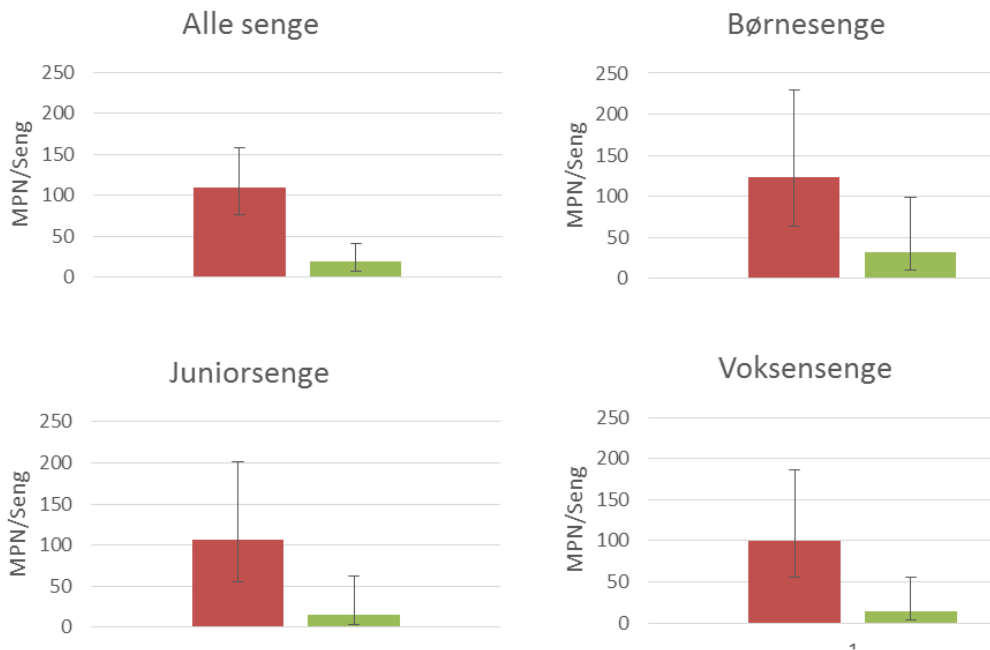
**Figur 7-23 Sammenligning af den gennemsnitlige koncentration med 95% konfidensintervaller af *Staphylococcus* spp. (MPN/cm<sup>2</sup>) på alle senge, vugger og hjælpemidler fordelt på prøvetagningsdage. Rød farve viser koncentrationen før rengøring og grøn farve viser koncentrationen efter rengøring. Antallet af positive og negative prøver fremgår af Bilag 3.**

Forskellene mellem prøvetagningsdagene kan ses på Figur 7-23. Koncentrationen efter rengøring var højest den 25/4. Det skyldtes især fund af *S. capitis* på kontrolpaneler. Endvidere var der fund på 2 rullestole, 1 vugge og en børneseng.



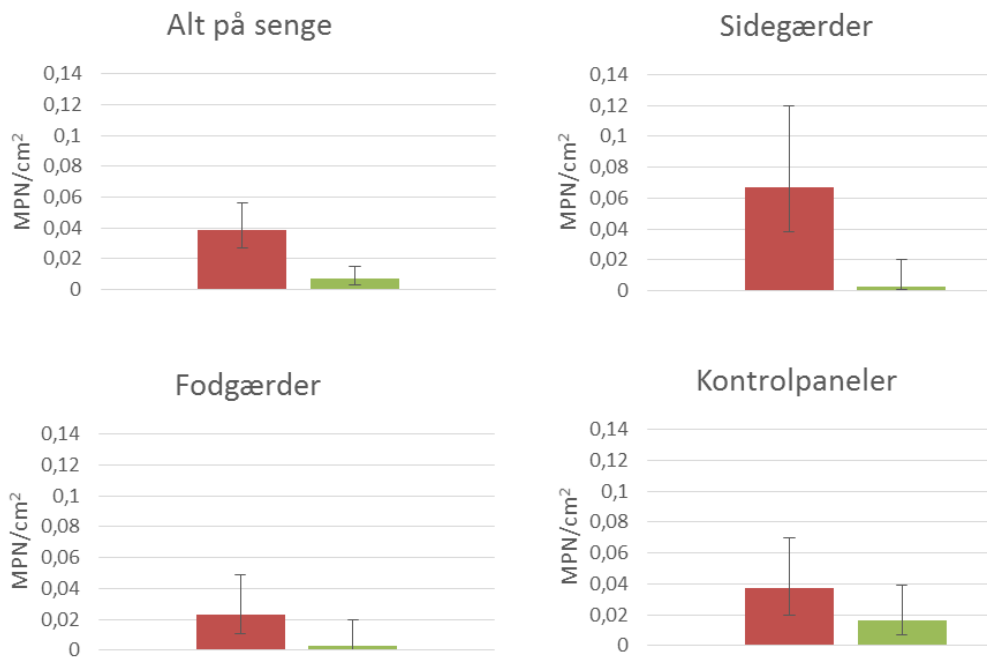
**Figur 7-24 Sammenligning af den gennemsnitlige koncentration med 95% konfidensintervaller af *Staphylococcus* spp. (MPN/cm<sup>2</sup>) på alle senge, voksen-, junior-, og børnesenge. Rød farve viser koncentrationen før rengøring og grøn farve viser koncentrationen efter rengøring. Antallet af positive og negative prøver fremgår af Bilag 3.**

En sammenligning mellem sengetyperne ses i Figur 7-24. Der var ikke umiddelbare forskelle. Fundene på de rengjorte senge fordelte sig nogenlunde ligeligt mellem de tre sengetyper og stammede hovedsageligt fra fund på kontrolpaneler den 25/4.



**Figur 7-25 Sammenligning af det gennemsnitlige antal med 95% konfidensintervaller *Staphylococcus* spp. (MPN/seng) på alle senge og fordelt på voksen-, junior-, og børnesenge. Rød farve viser antallet før rengøring og grøn farve viser antallet efter rengøring. Antallet af positive og negative prøver fremgår af Bilag 3.**

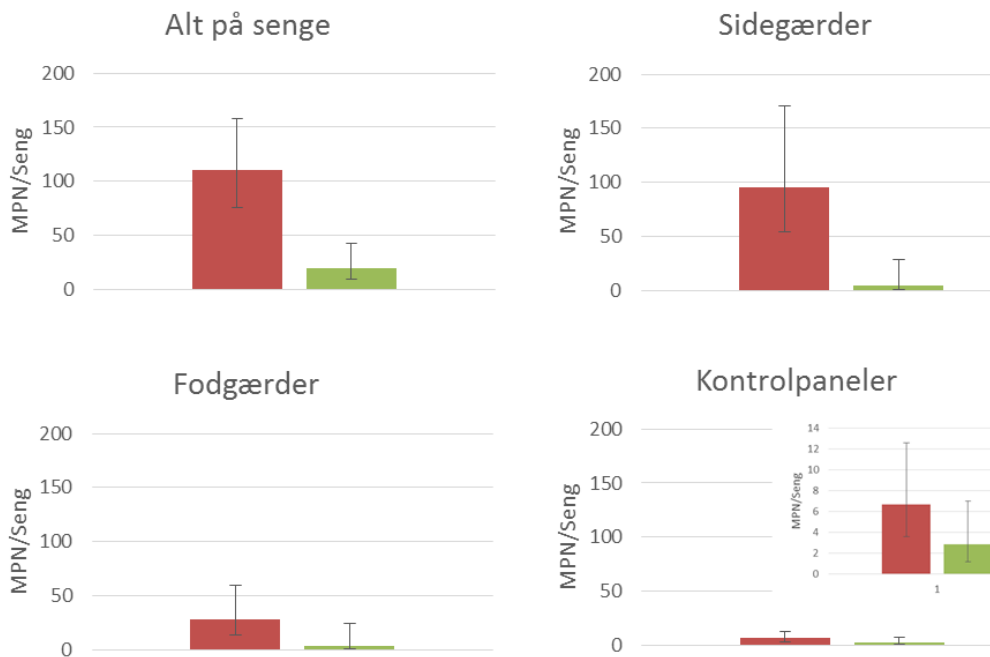
På baggrund af de målte arealer af sengegærder, fodgærder og kontrolpaneler (Bilag 2) blev det samlede mest sandsynlige antal *Staphylococcus* spp. på de forskellige sengetyper estimeret. Dette ses på Figur 7-25. Det ses, at der efter rengøring blev fundet flest på børnesenge, men at det formentlig ikke var signifikant forskelligt fra de øvrige sengetyper.



**Figur 7-26** Sammenligning af den gennemsnitlige koncentration med 95% konfidensintervaller af *Staphylococcus* spp (MPN/cm<sup>2</sup>) på alle senge og fordelt på sidegærde, fodgærde og kontrolpanel. Rød farve viser koncentrationen før rengøring og grøn farve viser koncentrationen efter rengøring. Antallet af positive og negative prøver fremgår af Bilag 3.

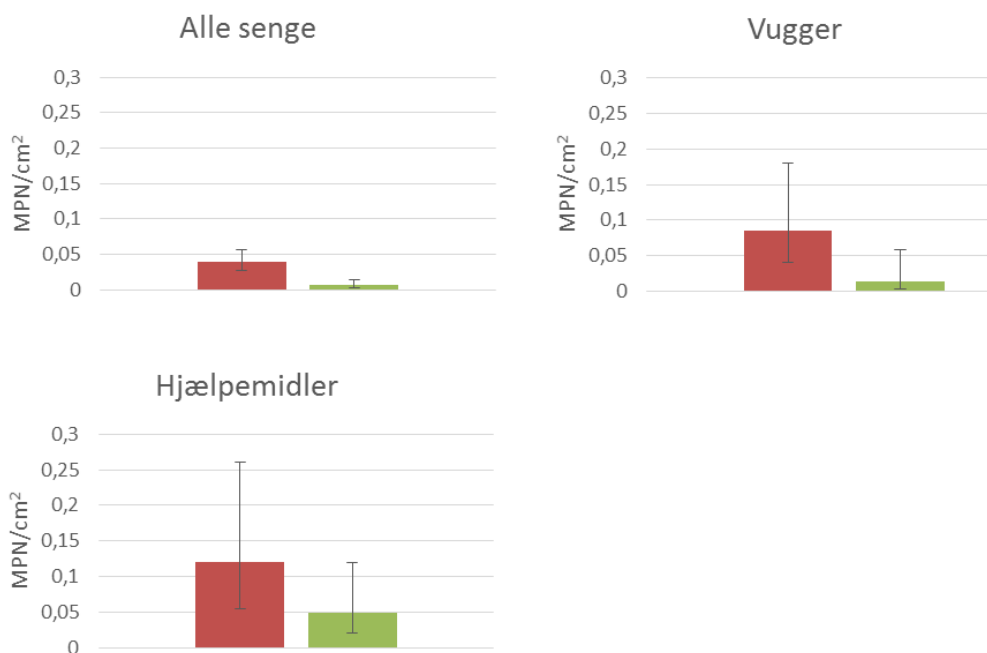
Koncentrationerne af *Staphylococcus* spp. (MPN/cm<sup>2</sup>) på de tre steder, hvor vi udtog prøver, fremgår af Figur 7-26. Inden rengøring var koncentrationen højest på sidegærder og efter rengøring var den højest på kontrolpaneler.





**Figur 7-27 Sammenligning af det gennemsnitlige antal med 95% konfidensintervaller *Staphylococcus* spp. (MPN/seng) på alle senge og fordelt på sidegærder, fodgærder og kontrolpaneler. Rød farve viser antallet før rengøring og grøn farve viser antallet efter rengøring. Antallet af positive og negative prøver fremgår af Bilag 3.**

Antallet af *Staphylococcus* spp. (MPN/seng) er vist på Figur 7-27. Antallet før rengøring blev opgjort til at være 110 (95% KI: 76 – 158) MPN/seng), mens det efter rengøring blev opgjort til 19 (95% KI: 9 – 42) MPN/seng. Antallet var højest på sidegærder med 95 (95% KI: 54 MPN – 171) MPN/seng. Efter rengøring var der ikke forskelle mellem de 3 steder 3 – 5 (95% KI: 0 – 24) MPN/seng.



**Figur 7-28 Sammenligning af den gennemsnitlige koncentration med 95% konfidensintervaller af *Staphylococcus* spp. (MPN/cm<sup>2</sup>) på alle senge, vugger og hjælpemidler. Rød farve viser koncentrationen før rengøring og grøn farve viser koncentrationen efter rengøring. Antallet af positive og negative prøver fremgår af Bilag 3.**

Figur 7-28 sammenligner koncentrationen af *Staphylococcus* spp. på senge, vugger og hjælpemidler. Figuren viser, at koncentrationerne sandsynligvis var højere på vugger og hjælpemidler inden rengøring, og at især hjælpemidler havde en forhøjet koncentration efter rengøring, hvilket skyldtes fund på 4 rullestole og 1 rollator.

En kvantitativ vurdering af koncentrationen af *Staphylococcus* spp. blev ligeledes gennemført ved kimtalsbestemmelse på det medium, som svaberne blev overført til (Se 0). Der blev analyseret 1 ml af 10 ml medium. Da det svabrede areal var 20 cm<sup>2</sup>, bliver detektionsgrænsen 2 CFU/cm<sup>2</sup>.

Der blev fundet *Staphylococcus* spp. i 23 af de 149 prøver, hvori kimtallet blev vurderet, heraf var 2 af 70 prøver (3%) udtaget på rengjorte objekter positive, mens 21 af 79 prøver (27%) udtaget på ikke rengjorte objekter var positive.

Under antagelse af at resultater under detektionsgrænsen var lig 50% af detektionsgrænsen kunne et aritmetisk gennemsnit for alle data beregnes til 4,3 CFU/cm<sup>2</sup>. Datasættet blev analyseret i @Risk (Palisade Corporation, 2012). Data var ikke normalfordelte, og vi kunne derfor ikke umiddelbart bestemme gennemsnittet. Data kunne bedst fittes med en negativ binomialfordeling. Denne fordeling gav samme middelværdi, som en aritmetisk middelværdi.

Data for prøver taget på ikke rengjorte overflader var negativt binomial fordelte med et gennemsnit på 6,4 CFU/cm<sup>2</sup> (s.d. 6,9 CFU/cm<sup>2</sup>). Det samme gjorde sig gældende for data fra de rengjorte prøver med en middelværdi på 1,9 CFU/cm<sup>2</sup> (s.d. 2,4 CFU/cm<sup>2</sup>) svarende til en reduktion på 70%.

Når de negative prøver blev tillagt værdien 0 CFU/cm<sup>2</sup> sås en reduktion på 83%. De højeste kimtal blev fundet på ikke-rengjorte børne- og juniorsenge, rollatorer, kørestol og vugge.

## 7.12 Model for spredning af *Staphylococcus* spp. og *qac*-gener.

På baggrund af den konceptuelle model og de kvantitative analyser kunne der opstilles et regnskab for cirkulation af stafylokokker via senge fra afdelingerne til sengevasken og tilbage til afdelingerne.

Baseret på den konceptuelle model over spredning af stafylokokker på HH (se afsnit 7.9), samt på konkrete data fra prøvetagninger i sengevasken, herunder en estimering af koncentrationen af stafylokokker på senge vha. MPN metoden (se afsnit 6.11.1) opsatte vi følgende model, der beskriver cirkulation af stafylokokker til og fra afdelinger via senge, der har været igennem sengevasken:

$$R = P \times A \times N$$

Hvor R = Returnering af stafylokokker til afdelinger/vaskekælder; P = Koncentrationen på overfladen (MPN/cm<sup>2</sup>); A = Areal (cm<sup>2</sup>); N = Antal senge.

Antallet af stafylokokker (MPN/år), der transporteres fra afdelinger til vaskekælder og fra vaskekælder til afdelingerne, er vist i Tabel 7-13. Tallene er baseret på data præsenteret i Figur 7-25, Figur 7-27 og Bilag 3.

Baseret på vores fund af stafylokokker, beregnede vi ved hjælp af ovennævnte model, at antallet af stafylokokker, der transporteres via senge fra vaskekælder til afdelingerne, ligger omkring **10<sup>6</sup> MPN/år**. Antallet er nogenlunde ligeligt fordelt mellem sidegærder, kontrolpaneler og fodgærder.

**Tabel 7-13. Antallet af stafylokokker (MPN/år) (med 95% konfidensintervaller) der transporteres fra afdelinger til vaskekælder og fra vaskekælder til afdelingerne under antagelse af et flow på 50 børnesenge, 50 juniorsenge og 150 voksensenge pr. dag. Desuden er fordelingen mellem sidegærder, kontrolpaneler og fodgærder angivet.**

<b>Stafylokokker (MPN/år) fra vaskekælder til afdelinger</b>			
	Middel	Nederste 95% KI	Øverste 95% KI
Alle senge	9,79 · 10 <sup>6</sup>	6,78 · 10 <sup>6</sup>	1,41 · 10 <sup>7</sup>
Børnesenge	9,90 · 10 <sup>5</sup>	5,09 · 10 <sup>5</sup>	1,84 · 10 <sup>6</sup>
Juniorsenge	8,59 · 10 <sup>5</sup>	4,40 · 10 <sup>5</sup>	1,61 · 10 <sup>6</sup>
Voksensenge	7,30 · 10 <sup>6</sup>	4,08 · 10 <sup>6</sup>	1,36 · 10 <sup>7</sup>
<b>Stafylokokker (MPN/år) fra afdelinger til vaskekælder</b>			
	Middel	Nederste 95% KI	Øverste 95% KI
Alle senge	1,73 · 10 <sup>6</sup>	8,29 · 10 <sup>5</sup>	3,77E · 10 <sup>6</sup>
Børnesenge	2,58 · 10 <sup>5</sup>	8,21 · 10 <sup>4</sup>	7,92 · 10 <sup>5</sup>
Juniorsenge	1,24 · 10 <sup>5</sup>	3,14 · 10 <sup>4</sup>	5,03 · 10 <sup>5</sup>
Voksensenge	1,00 · 10 <sup>6</sup>	2,55 · 10 <sup>5</sup>	4,08E · 10 <sup>6</sup>
<b>Fordeling (%) af Stafylokokker på senge</b>			
	Fra afd. til vaskekælder	Fra vaskekælder til afd.	
Sidegærde	73%	39%	
Kontrolpanel	5%	27%	
Fodgærde	22%	34%	

Ligeledes beregnede vi, at antallet af stafylokokker, der transporteres via senge fra afdelingerne til vaskekælder, ligger omkring **10<sup>7</sup> MPN/år**. Hovedparten findes på sengegærder og fodgærder.

Vi har ikke kunnet modellere spredning af resistens imellem bakteriepopulationer på HH i form af overførsel af *qac*-gener, da vi har manglet data for hvilken rate og ved hvilken QAC koncentration man kan forvente en sådan overførsel.

Udover at *qac*-generne kan overføres horisontalt mellem populationer spredes de på HH også i form af *qac* positive stafylokokker, der cirkulerer imellem afdelinger og sengevask. Vi har i projektet analyseret, hvor stor en andel af de indsamlede stafylokok-isolater, der indeholder *qac* gener. Resultaterne viste, at vi ikke kunne dokumentere forskel på andelen af *qac* positive isolater før og efter rengøring.

Vi anvender derfor følgende simple model for spredningen af *qac* gener via senge på hospitalet:

$$R_{qac} = Rf$$

Hvor  $R_{qac}$  = Returnering af *qac*-bærende stafylokokker til afdelingerne/vaskekælderen; R = stafylokokker der returneres til afdelingerne/vaskekælderen; f = Frekvens af *qac* gener i populationen.

På basis af bestemmelse af forekomsten af *qac*-gener i hospitalsisolaterne og ovennævnte model, estimeredes det, at der transporteres cirka **10<sup>6</sup> *qac*-bærende stafylokokker** (MPN) fra afdelingerne til vaskekælderen. Ligeledes beregnede vi, at der transporteres **2 x 10<sup>5</sup> *qac*-bærende stafylokokker** (MPN) fra vaskekælderen til afdelingerne (se Tabel 7-14). Hoveddelen af de *qac*-bærende stafylokokker er *S. hominis*.

**Tabel 7-14: Antallet af *qac*-bærende stafylokokker (MPN/år) (med 95% konfidensintervaller) der transporteres fra afdelinger til vaskekælder og fra vaskekælder til afdelinger under antagelse af et flow på 50 børnesenge, 50 juniorsenge og 150 voksensenge pr. dag**

<i>qac</i> -bærende Stafylokokker (MPN/år) fra afdelinger til vaskekælder			
	Middel	Nederste 95% KI	Øverste 95% KI
Alle arter	1,17 · 10 <sup>6</sup>	8,13 · 10 <sup>5</sup>	1,69 · 10 <sup>6</sup>
<i>S. hominis</i>	8,07 · 10 <sup>5</sup>	4,78 · 10 <sup>5</sup>	1,32 · 10 <sup>6</sup>
<i>qac</i> -bærende Stafylokokker (MPN/år) fra vaskekælder til afdelinger			
	Middel	Nederste 95% KI	Øverste 95% KI
Alle arter	2,08 · 10 <sup>5</sup>	9,94 · 10 <sup>4</sup>	4,52 · 10 <sup>5</sup>
<i>S. hominis</i>	1,81 · 10 <sup>5</sup>	5,85 · 10 <sup>4</sup>	5,60 · 10 <sup>5</sup>

Ligeledes var det planen, at modellere spredning af resistens overfor såvel QAC som antibiotika. Selv om vi i laboratorieforsøgene kunne påvise en nedsat følsomhed overfor biocidaktivstofferne bl.a. i form af højere MIC værdier, kunne vi ikke påvise en egentlig resistens overfor disse og ej heller overfor antibiotika.

## 8. Diskussion

### 8.1 Længerevarende biocideksponerings indvirkning på bakterier

Der er generelt en god forståelse for hvordan bakterier påvirkes af biocider i forhold til reduktion og decimeringstider- og koncentrationer, der er praktisk anvendelige til desinfektion af bl.a. hospitaler og fødevarereproduktioner. Der er imidlertid ikke megen viden om hvordan sub-letale koncentrationer af biocider, som ikke slår bakterierne ihjel, over længere tid kan påvirke bakterier. Der har været indikationer på, at bakterier, der er resistente overfor biocider (især overfor triclosan), også har højere tolerance overfor antibiotika, men det er uvist, om denne sideeffekt af biocid-tolerance er udbredt for forskellige typer biocider.

#### 8.1.1 Hydrogenperoxid

Der er stor forskel på, hvor meget H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de to grampositive patogener kan overleve og vokse i, afhængig af den anvendte analysemetode. Sammenlignes udgangsstammernes MIC, kan *L. monocytogenes* overleve op mod 10 gange højere koncentration end *S. aureus* (hhv. 250 -500 µg/mL vs. 15-125 µg/mL) ved eksponering i et døgn. Men billedet er modsat, hvis man bruger time-kill metoden, hvor drabskurver illustrerer bakteriernes overlevelse indenfor kort tids eksponering (15-240 min). Her ses *S. aureus* 8325-4 (dag 0) at modstå 15.000 µg/mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i to timer, mens begge *L. monocytogenes* stammer (dag 0) bliver væsentligt reduceret ved 3000 µg/mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Time-kill metoden må anses for at være den metode, der bedst beskriver de faktiske forhold ved overfladedesinfektion. Dermed vurderes *S. aureus* at være mest modstandsdygtig overfor dette biocid. Der har desuden været nogle udsving i resultaterne ved MIC bestemmelser, dels mellem de to stammer af hver art, og dels mellem gentagelser. Derudover er metoden følsom for, hvilket medium bakterierne vokser i, så dette bør standardiseres f.eks. i forhold til CLSI guidelines (CLSI, 2012). Til sammenligning har andre studier bestemt H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> MIC for *S. aureus* med så forskellige resultater som 938 µg/mL (0,0938 %; Penna et al. 2001) og 37.500 µg/mL (3,75 %; Rushdy & Othman, 2011), og dermed virker denne metode ikke robust til vurdering af H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Især *S. aureus* kan efter eksponering til lav koncentration af H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (60-90 µg/mL) overleve markant højere koncentrationer af det samme biocid. For begge stammer har de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-eksponerede derivater en MIC på 4-8 gange værdien for udgangsstammerne, og for USA300 (som er en MRSA-stamme) overlever de adapterede stammer 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30.000 µg/mL), som er almindelig brugskoncentration til antiseptisk brug som ved desinfektion af sår. Det er påfaldende, at USA300 selv ved sub-letal koncentration kan adapteres til at overleve 333 gange den koncentration, de blev eksponeret til.

USA300 bærer, som andre MRSA-stammer, genet *mecA*, som dels er markør for methicillin-resistens (antibiotika-resistens), men dels også forstærker peptidoglycan krydsbindinger i cellevæggen (Fishovitz et al. 2014), hvilket kunne have betydning for modstandsdygtigheden overfor biocidet. Nylige undersøgelser af rumdesinfektion med H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> har vist, at MRSA ikke bliver reduceret ved 5 og 10 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indenfor 120 min, men bliver reduceret (dog ikke elimineret) ved 35 % i 30 min (Murdoch et al 2016).

Kontakttiden har dermed også stor betydning for reduktionen af bakterierne, og det ses af drabskurverne for både *S. aureus* og *L. monocytogenes*, at den primære reduktion indtræffer indenfor 15-30 min. Det er tidligere vist at 1 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> har en begrænset effekt på 12 *L. monocy-*

*togenes* stammer indenfor 10 min, men reducerer kraftigt (6-9 LOG<sub>10</sub> reduktion) på 20 min (Yun et al, 2012).

Længerevarende eksponering til H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> har i dette projekt vist at selektere for mutationer i bakteriens naturlige forsvar, katalase, mod oxidativt stress (herunder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), som forstærker effekten af dette. To H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eksponerede *S. aureus* derivater (én USA300; én 8325-4) viste mutationer i *fur* eller *fur*-lignende gener (ferric uptake regulator), som er en transkriptionel regulator, der spiller en vigtig rolle i bakteriens forsvar mod oxidativt stress. Dette kan være forklaringen på den øgede katalaseaktivitet i de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eksponerede derivater.

Der blev set god sammenhæng imellem nedsat H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-følsomhed og katalase aktivitet for *S. aureus* stammerne, og katalase-assay'et er en hurtig måde at bestemme forskelle i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-følsomhed imellem bakterier. De eksponerede derivater, der udviste højest katalaseaktivitet, havde værdier på mellem 50 og 70 mm, i forhold til udgangsstammerne, der lå mellem 10 og 20 mm. I forbindelse med disse forsøg blev der til sammenligning målt katalase-aktivitet af 33 kliniske isolater af *S. aureus*, isoleret fra forskellige typer infektioner som bakteræmi, endocarditis og osteomyelitis (fra SSI's stammesamling), og disse havde en gennemsnitlig katalaseaktivitet på 21 ± 7 mm med målte værdier mellem 14 og 40 mm (resultater ikke vist). Disse kliniske isolater har dermed højere katalaseaktivitet end udgangsstammerne anvendt i nærværende projekt, hvilket kunne tyde på, at der sker varierende adaptation i *S. aureus* stammer. For kliniske stammer skal det dog bemærkes, at tilvænningen til H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ikke nødvendigvis sker i hospitalsmiljøet, men meget vel kan ske *in vivo*, når bakterierne under infektion kommer i kontakt med det humane innate immunforsvar, der ved hjælp af oxidativt stress yder den første beskyttelse mod infektioner (Yang et al. 2013). Bemærkelsesværdigt er det dog, at der er massivt potentiale for at *S. aureus* adapteres ved påvirkning til H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, og at sådan påvirkning øger MIC og i særdeleshed reducerer drab.

Ikke alle stammer af *Listeria monocytogenes* har katalase-aktivitet, og selv stammer isoleret fra humane sygdomstilfælde udviser ikke katalaseaktivitet. Dette skyldes bl.a. mutationer i katalase-gener, der medfører at genet bliver inaktivt (Cepeda et al 2006).

For *S. aureus* blev ekspressionen af et centralt virulensgen, hæmolysin (*hla*), undersøgt, og der kunne ikke påvises øget virulens af de eksponerede derivater. Både for *S. aureus* og *L. monocytogenes* blev der registreret variationer i antibiotika-resistens for enkelte af derivaterne, der var eksponeret enten til et af biociderne eller passeret uden biocid, men disse ændringer må anses for et respons til den lange række af passager, da der ikke var nogen sammenhæng med eksponering til et bestemt biocid. Det kunne derfor ikke påvises, at der er øget antibiotika-resistens i de biocid-adaptede derivater.

### 8.1.2 Benzalkoniumklorid

For benzalkoniumklorid (BZK) målttes der på udgangsstammerne MIC-værdier mellem 0,5 og 8 µg/mL. Der var tydelig forskel på de to *L. monocytogenes* stammer, hvoraf EGDe er en meget anvendt laboriestamme, som generelt er følsom overfor stresspåvirkninger, mens LA111 blev isoleret fra røget laks i en fiskeproduktion, hvor der var problemer med persisterende kontaminering med *Listeria* spp. (Vogel et al, 2001). LA111 havde 8-16 gange højere MIC end EGDe, og det kan derfor ikke udelukkes, at denne stamme allerede kan være adapteret til overlevelse i et miljø, der indbefatter stresspåvirkning af BZK.

Efter eksponeringsforsøgene, hvor stammerne blev udsat for tilpassede koncentrationer af BZK mellem 0,7 – 3,0 µg/mL, sås et ret entydigt billede af forholdet mellem udgangsstammer og eksponerede derivater; der var ingen udvikling i MIC for derivater passeret uden biocid, mens der for derivater passeret med BZK sås en øgning til 2 gange den oprindelig MIC (for EGDe dog 4 gange oprindelig MIC). Det er dermed muligt for begge bakterier, at adaptere til BZK, selv ved eksponering til lav koncentration. Der var dog ikke nogen udtalt forskel på overlevelsen ved høje

koncentrationer af BZK, i det det ikke var muligt at finde en koncentration hvor de biocidadapterede stammer overlevede bedre end stammerne der ikke var adapteret til biocid.

Det er påfaldende, at *S. aureus* adapteret til BZK i det længerevarende eksponeringsforsøg, havde MIC-værdier (2-4 µg/mL) der var sammenlignelige med *qac*-gen-bærende *Staphylococcus* spp. isoleret fra hospitalsmiljøer. Der blev kun isoleret få *S. aureus* stammer (tre i 150 swab-prøver) fra hospitalsmiljøet, men der blev isoleret en del andre *Staphylococcus* spp., hvoraf især *S. hominis* bærer *qacA/B* gener. Alle hospitalsisolater af *Staphylococcus* havde MIC-værdier mellem 0,25 – 8 µg/mL BZK og heraf havde de *qacA/B*-bærende isolater MIC-værdier mellem 1-8 µg/mL.

Der blev kun registreret få genomiske ændringer i *S. aureus* derivater eksponeret til BZK, men NorA er tidligere vist at have effekt som multidrug efflux-pumpe i *S. aureus* (Kaatz & Seo, 1995).

For *S. aureus* blev ekspressionen af *hla* undersøgt, ligesom for de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-eksponerede derivater, og der kunne ikke påvises øget virulens af de eksponerede derivater. Der kunne ligeledes ikke påvises øget antibiotika-resistens i de biocid adapterede derivater. Disse resultater viser, at der for *S. aureus* ikke synes at udvikles resistens overfor antibiotika i de stammer, som har været udsat for biocider.

### 8.1.3 Sølv-nanopartikler

Nanoskala-materialer ligger indenfor størrelsen 1-100 nm, kan bestå af forskellige metalioner og kan have forskellige former (f.eks. runde, kubiske og triangulære). Der er mange parametre i opbygningen af partiklerne der har betydning for deres effekt og stabilitet. Det er muligt at finde kommercielt tilgængelige sølv-nanopartikler, men i mange videnskabelige artikler syntetiseres partiklerne i mindre skala, og den store variation i disse partikler gør det svært at sammenligne antimikrobielt potentiale, toksicitet og stabilitet i mellem studier.

Sølv-nanopartikler kan syntetiseres kemisk ved at reducere sølvioner til kolloid sølv f.eks. ved hjælp af reducerende sukre eller citrat, og herefter skal partiklerne stabiliseres. Det er også muligt at syntetisere sølv-nanopartikler biologisk fra sølvnitrat ved hjælp af planteekstrakter (bl.a. Chowdhury et al. 2016; Firdhouse et al. 2016) og paradoksalt nok ved hjælp af en lang række bakterier inklusiv *S. aureus* (Nanda et al. 2009) og *S. epidermidis* (Amin et al. 2016). Biosyntese af nano-partikler foreslås at være et 'grønnere' alternativ, da det undgås at bruge farlige/giftige ekstraheringsmetoder, der desuden også kan påvirke den antimikrobielle effekt (Chowdhury et al. 2016), men det skal bemærkes at også planteekstrakter i sig selv kan have antimikrobiel effekt, der kan gøre det svært at vurdere effekten af Ag-NP alene, såvel som de biosyntetiserede partikler kan have en cytotoxisk effekt på humane celler (Chowdhury et al. 2016, Firdhouse et al. 2016).

Idet *Staphylococcus* spp. kan benyttes til biosyntese af Ag-NP, må det forventes at disse har en vis tolerance overfor sølvioner, og mekanismerne bag dette er delvist belyst. Syntesen foregår ved at bakterierne omdanner sølvnitrat til nitrit med enzymet nitrat reduktase og efterfølgende omdanner den frigivne elektron Ag<sup>+</sup> til Ag<sup>0</sup>, som efterfølgende omdannes til nanopartikler (Deepak et al. 2011). Hermed omdanner bakterien de reaktive sølvioner til mere stabile nanopartikler, som akkumuleres i cellens periplasmiske mellemrum, for at beskytte sig selv mod ionerne. Der er dog grænser for, hvor meget sølvnitrat bakterien kan omsætte og dermed er der en øvre grænse (MIC), hvorefter den omgivende koncentration af sølvnitrat bliver toksisk. Katalase har vist sig også at være en del af bakteriers respons til Ag-NP da de reaktive oxygen radikaler formeres i samspil med hydrogenperoxid i cellen og katalase kan effektivt modvirke dette. Tilstedeværelse af sølv-ioner kan forårsage opregulering af katalase syntesen og *E. coli* med defekter i katalase-gener har vist sig at være mere følsomme overfor sølvioner end *E. coli* med fuldt funktionelle katalase-gener (opsummeret af Deepak et al. 2011).

Forsøgene udført i forbindelse med denne rapport har vist at det ikke er trivielt at arbejde med de kommercielt tilgængelige Ag-NP, der ikke kan anvendes i forbindelse med f.eks. spektrofotometriske målinger af bakterievækst, idet partiklerne i sig selv har en høj absorption, og at MIC-bestemmelser ikke har vist sig at være pålidelige. Det er desuden vanskeligt at sammenligne resultater med de biosyntetiserede nano-partikler, der anvendes i mange studier. Den antimikrobielle effekt af disse bliver ofte målt ved agar diffusion og MIC bestemmelser for at sammenligne forskellige præparationer af Ag-NP internt, men på tværs af flere studier kan det være svært at foretage en reel sammenligning. Forskelle i syntesemetoden af Ag-NP (tid og temperatur) viste sig at give store variationer i målte MIC-værdier imod bl.a. *S. aureus* (0,25 – 32 µg/mL af Ag) (Chowdhury et al., 2016). Det er vist at sølv-ioner mere effektive end kobber-ioner imod *L. monocytogenes*, forårsaget af Ag<sup>+</sup> ioners højere affinitet til peptidoglycanlaget på gram-positive bakterier, men effekten afhænger desuden af hvor hurtigt sølvionerne frigives fra nanopartiklerne, og derfor vistes kobber-NP at være relativt mere effektive mod *L. monocytogenes* end Ag-NP (Tamayo et al. 2014).

## 8.2 Kortlægning af desinfektionsmidler på Hvidovre Hospital og procedurer for rengøring

Forbruget af desinfektionsmidler på HH blev kortlagt med henblik på at opnå viden om hvilke kvaternære forbindelser, der anvendes og i hvilket omfang. Kortlægningen blev udført ud fra samtaler med sygeplejersker med ansvar for hygiejnen på hospitalets afdelinger, herunder indkøb af rengørings- og desinfektionsmidler.

Kortlægningen bekræfter, at man på HH, ligesom på andre danske sygehuse, foretrækker at desinficere hænder med ethanolbaserede produkter (Anon, 2013; Nissen, 2014). Der findes alternative hånddesinfektionsprodukter på markedet, der indeholder QAC som biocidaktive stof, men disse har ikke fundet indpas på Hvidovre Hospital.

Især i forbindelse med desinfektion i den manuelle sengevask blev der identificeret et stort forbrug af desinfektionsmiddel med kvaternære ammoniumforbindelser. Vi valgte derfor, at fokusere på dette område som udgangspunkt for at undersøge hvorledes resistens kan spredes i lokalmiljøet på HH efter kontakt med QAC, samt i hvilket omfang *qac*-gener spredes imellem bakteriepopulationer.

Selv om rengøring og desinfektion af senge og hjælpemidler foregår over to etager på HH fremstår de som én enhed. I kælderetagen rengøres og desinficeres der manuelt, mens der i stueetagen bruges en automatisk sengevask til at vaske standardsenge. Dette skyldes, at stort set alle snavsede senge og hjælpemidler først samles i kælderen, hvor de enten vaskes manuelt eller for standardsengenes og nogle hjælpemidlers vedkommende føres ovenpå til den automatiske sengevask.

Kælderafsnittet i forbindelse med den manuelle sengevask ses således som værende central for spredning, eller omvendt for eliminering, af bakterier, resistente såvel som modtagelige, og danner derfor udgangspunkt for den konceptuelle model beskrevet i afsnit 7.9.

### 8.2.1 Analyse af Mikro-Quat Extra brug i forhold til brugsanvisning

Ifølge anvisningen fra Ecolab er klar-til-brug opløsningen for Mikro-Quat Extra 1-2 % ( 10 – 20 ml ) per liter vand afhængig af besmudsningsgrad, vandets hårdhed og EN Norm. Produktet skal virke i mindst 5 min. Ved analyse af koncentreret Micro-Quat Extra var den totale mængde QAC målt til 7.6% hvilket er i overensstemmelse med data i produktets sikkerhedsdatablad. Til brugsopløsningen anvendt i den manuelle sengevask anvendes 50 g koncentrat per liter vand hvilket giver en koncentration på 5%, som er højere end anbefalet. Vi observerede, at den tid



Mikro-Quat Extra får lov at virke på senge og hjælpemidler gennemsnitligt lå på 2-3 minutter, hvilket er kortere end den anbefalede virketid. Det kan naturligvis ikke påvises ud fra vores data om den kortere virketid kan medvirke til at udvikle resistens eller formindsket modtagelighed overfor BZK, men det kan ikke udelukkes. Ligeledes kan det heller ikke udelukkes, at den højere brugskoncentration opvejer den kortere virketid. Under alle omstændigheder bør det anbefales, at bruge Ecolabs anbefalede brugskoncentration og virketid.

### 8.3 Konceptuel model over transmission af stafylokokker

Den konceptuelle model vist i Figur 7-21 blev udviklet for at visualisere den sandsynlige transmission og spredning af stafylokokker på HH, der har været i kontakt med QAC-holdige desinfektionsmidler. Som beskrevet ovenfor tager modellen udgangspunkt i kælderafsnittet i forbindelse med den manuelle sengevask, da dette område bruges som opsamlingspunkt af hovedparten af hospitalets snavsede senge og hjælpemidler.

Selv om den konceptuelle model ikke kan ligestilles med en egentlig kvantitativ risikovurdering, fremgår det af Figur 7-21, at modellen tydeligt illustrerer muligheden for spredning af stafylokokker, og dermed potentielle resistensgener, hvis rengøring og desinfektionen ikke er helt optimal. Modellen fremhæver således de steder i rengøringsproceduren, hvor en overførsel af bakterier kan finde sted, og kan derfor hjælpe til at udpege steder, hvor der vil være muligheder for at forbedre procedurer med henblik på at nedbringe bakterieoverførsler. For eksempel kan det nævnes, at der ingen procedurer er for hvorledes personalet må bevæge sig rundt. Som modellen illustrerer, kan personalet således bevæge sig imellem den snavsede og den rene ende af kælderen uden restriktioner med den risiko der derved er for at overføre bakterier imellem områderne.

Det skal understreges, at vi i modellen ikke tager højde for hvor stor en potentiel overførsel er, der kan finde sted ved de enkelte procedurer og arbejdsgange. Pilene i Figur 7-22 angiver derfor udelukkende en potentiel mulighed for overførsel af bakterier.

Som det fremgår af Figur 7-22, viser modellen også at stafylokokker sandsynligvis kan spredes til miljøet via afløb og kloakker. Vi har i dette projekt dog ikke vurderet hvordan bakterierne videre kan spredes i miljøet udenfor hospitalet, og ej heller i hvilket omfang.

### 8.4 Kvantitativ bestemmelse af *Staphylococcus* spp.

Der er gennemført undersøgelser af sidegærder, fodgærder og kontrolpaneler på børne-, junior- og voksensenge samt på et mindre antal hjælpemidler.

Der blev fundet 2 *S. aureus*, 1 på en snavsset børneseng og 1 på højre skubbehåndtag på en rengjort kørestol. Det betyder, at sandsynligheden for at patienter, personale og pårørende kommer i kontakt med *S. aureus* via senge og hjælpemidler sandsynligvis er lille.

Herudover er der fundet andre arter af *Staphylococcus*, især *S. hominis* og *S. epidermidis*, som tilhører de koagulasenegative stafylokokker (CoNS).

CoNS er også vigtige i forbindelse med hospitalserhvervede infektioner. I 2012 i Europa blev CoNS på intensivafdelinger (ICU) de hyppigst isolerede patogener (22%) i forbindelse med blodinfektioner, mens de udgjorde 2,5% ved urinvejsinfektioner. På operationsstuer var 12% af de isolerede patogener CoNS. (ECDC, 2014). I USA i 2009 og 2010 udgjorde CoNS 11% af de rapporterede patogener i forbindelse med hospitalserhvervede infektioner (Sievert et al 2013). Den kvantitative del af undersøgelsen omhandler derfor hovedsageligt CoNS.

### 8.4.1 Kontaktrisiko

Koncentrationen af stafylokokker på de rengjorte senge ser ud til at være højest på kontrolpanelerne (0,016 MPN/cm<sup>2</sup>). Den højeste sandsynlighed (pr berøring og pr areal) for at komme i kontakt med stafylokokker via de rene senge på afdelingerne er derfor ved betjening af kontrolpaneler.

Når sengene er i brug, er det sidegærdene, der forurenes mest. Her er koncentrationen af stafylokokker estimeret til 0,067 MPN/cm<sup>2</sup>. Som tiden går, bliver den højeste sandsynlighed (pr. berøring og pr. areal) for at komme i kontakt til stafylokokker derfor via sidegærdene, som også er den overflade, der berøres oftest (Huslage et al. 2010).

I denne undersøgelse har vi også analyseret forurening af sengene ved kimtalsbestemmelse på en stafylokokselektiv agar. Der blev i gennemsnit fundet 6,4 CFU/cm<sup>2</sup> (27 % positive prøver) på ikke rengjorte flader og 1,9 CFU/cm<sup>2</sup> (3 % positive prøver) på rengjorte flader.

Dette er i overensstemmelse med, hvad andre finder. F.eks. fandt Yuen et al. (2015) vha. en swap metode på et hospital i Hong Kong 6 % til 12 % CoNS positive prøver (LoD 1 CFU/cm<sup>2</sup>) med koncentrationer mellem 1 og 16 CFU/cm<sup>2</sup> på senge på afdelingerne. De fandt i øvrigt mange *S. aureus*. På sengegærde blev der fundet 19 % MRSA positive prøver med koncentrationer mellem 1 og 276 CFU/cm<sup>2</sup>.

Dancer (2004) har foreslået en hygiejnisk grænse på < 1 CFU/cm<sup>2</sup> af indikatororganismer. Blandt indikatororganismer nævnes *S. aureus*. For aerobt kimalt er en grænse på 2,5 CFU/cm<sup>2</sup> til 5 CFU/cm<sup>2</sup> foreslået (Dancer, 2004; Lewis et al. 2008). Hvis CoNS anses for at være indikatororganismer, har vasken i denne undersøgelse ikke overholdt den foreslåede grænse. Hvis de opnåede kimalt derimod betragtes på lige fod med aerobt kimalt, så er grænsen overholdt. Da vores aerobe kimalt er bestemt på en selektiv agar, kan man dog ikke umiddelbart sammenligne traditionelle aerobe kimalt, som bestemmes på ikke selektiv agar.

Mikkelsen et al. (2012) undersøgte sengegærder på Hvidovre Hospital, der enten var manuelt rengjort eller rengjort automatisk. De manuelt rengjorte senge havde aerobt kimalt > 2,5 CFU/cm<sup>2</sup> i 6% af prøverne, mens de automatisk rengjorte senge havde et kimalt på 2,5 CFU/cm<sup>2</sup> eller mindre. Disse resultater svarer til vores kimalt resultater.

Reduktionen af stafylokokker målt ved MPN ved rengøringen er estimeret til at ligge omkring 80 %. Resultaterne af kimtalsbestemmelsen giver i gennemsnit en reduktion på 70 % til 80 % igennem sengevasken. Huslage et al. (2013), som fandt reduktion i kimalt bestemt med RODAC (Replicate Organism Detection and Counting) 87% på højberøringsoverflader, som f.eks. sengegærder, 79% på medium- og 90% på lavberøringsoverflader efter rengøring på intensivafdelinger og operationsstuer.

Der er en stor kvantitativ forskel mellem MPN metoden og kimtallet. Det samlede resultat for alle MPN bestemmelser er 0,028 (95% KI: 0,022 – 0,036) MPN/cm<sup>2</sup>, mens kimtallet ligger i området mellem 3,5 og 4,3 CFU/cm<sup>2</sup>. Kimtallet giver altså omkring 100 eller flere gange højere koncentrationer en MPN metoden. Det skyldes formentlig, at stafylokokkerne ikke er jævnt fordelt på overfladerne. Stafylokokker forekommer enkeltvis, i par, tetraeder eller i irregulære samlinger (Kloos 1998). MPN metoden skelner ikke mellem enkeltvist forekommende og samlinger af stafylokokker. Det gør derimod kimtalsbestemmelsen i det omfang stafylokokkerne disaggregeres ved analysen. Vores kimtalsundersøgelse afspejler den store variation, hvor få høje kimalt giver det højere gennemsnit for kimtallet. Især for rengjorte objekter, hvor der kun blev fundet to positive prøver (juniorseng og vugge), er koncentrationen afhængig af få positive prøver. Modsat giver MPN metoden flere positive prøver, pga. opformeringstrinnet. Desuden er MPN metodens øvre grænse ved 149 delprøver a 20 cm<sup>2</sup> 0,25 MPN/cm<sup>2</sup>. Det er derfor sandsynligt, at kimtallet giver en bedre repræsentation af det totale antal stafylokokker især for de ikke rengjorte objekter. Derimod synes MPN metoden at give en bedre mulighed for at vurdere forureningen af de enkelte overfladetyper i forhold til hinanden og også et bedre estimat af sandsynligheden

(relativet mellem overflader) for at komme i kontakt med stafylokokker ved berøring, da opføringstrinnet gør analysen mere følsom.

#### 8.4.2 Forekomst af *qac*-bærende stafylokokker

Der blev fundet *qac* gener i 11 ud af 94 analyserede stafylokokker, med højest hyppighed hos *S. hominis*. Til sammenligning fandt Timez et al. (2014), at 14 af 61 coagulase negative stafylokokker isoleret fra sår på en operationsstue havde *qacA/B*. Jennings et al. (2015) fandt i et review en tendens til stigning i prævalensen af *qacA/B* i MRSA, med en stor spredning mellem de publicerede studier fra < 10% til > 80%. Prævalensen i vores undersøgelse ligger altså på linje med andre undersøgelser i hospitalsmiljøer.

De observerede *qac* bærende Stafylokokker kan være importeret udefra eller være selekteret på grund af anvendelsen af BZQ på hospitaler. De data, vi har, er for få til at vise forskel før og efter vasken, vi kan derfor ikke ad den vej påvise udvikling af *qac*-bærende stafylokokker på hospitalet. Inden anvendelse af desinfektionsmidler, der kan selektere for *qac*-gener, var prevalensen af *qac*-gener sandsynligvis lav (Skovgaard 2013a). I sammenligning hermed er forekomsten forhøjet, men vi har ikke nutidige data tilgængelige fra miljøer, hvor der ikke anvendes desinfektionsmidler, vi kan derfor heller ikke på den baggrund konkludere en forhøjet forekomst af *qac*-bærende stafylokokker.

De *qac*-bærende stafylokokker havde en gennemsnitlig MIC-værdi på 3,91 µg/ml (st.avg 1,70) mens de ikke *qac*-bærende havde en gennemsnitlig MIC-værdi på 1,37 µg/ml (st.avg 1,17). Koncentrationen af BZQ i brugsopløsningen er omkring 1000 gange højere end MIC-værdierne. De burde derfor ikke overleve desinfektionen. Vores undersøgelse viser, at der er Stafylokokker der overlever. Det kan derfor ikke udelukkes, at de *qac*-bærende stafylokokker favoriseres i vaskeprocessen.

#### 8.5 Model for spredning af *Staphylococcus* spp. og *qac*-gener

Projektets udvikling af modeller for spredning af resistens enten i form af direkte QAC resistens eller krydsresistens overfor antibiotika har været udfordret af manglende data. Vi kunne således ikke konstatere udvikling af krydsresistens overfor antibiotika i vores laboratorieforsøg. Vi kunne dog konstatere en vis adaptering til BZQ i vores laboratorieforsøg i form af øgede MIC værdier, men ikke en egentlig udvikling af resistens. Der foreligger en del videnskabelig litteratur om QAC resistens og de gener, herunder *qac*-gener, der er involveret heri, og også i forhold til mulig krydsresistens overfor antibiotika, hvilket for nyligt blev gennemgået i et review (Jennings et al., 2015). De fleste undersøgelser har dog været af epidemiologisk karakter, som har fokuseret på forekomst af resistens og/eller resistensgener i forskellige miljøer eller været egentlige genomstudier. For at kunne modellere hvorledes resistens udvikles og spredes som følge af QAC påvirkning, er det nødvendigt, at have viden om ved hvilke QAC koncentrationer dette foregår, samt med hvilken rate resistensudvikling og evt. resistensoverførsel kan forventes. Da denne viden mangler, har det ikke været muligt at udvikle modeller for horisontal spredning (mellem populationer) af resistens eller resistensgener i form af *qac*-gener i dette projekt.

Da vi ved vores undersøgelser kunne konstatere, at stafylokokker er til stede på HH på såvel senge som hjælpemidler både før og efter vask og desinfektion, fandt vi det relevant, at forsøge at estimere hvordan stafylokokker cirkulerer imellem sengevasken og afdelingerne. Vi har også bestemt hvor stor andel af hospitalsisolaterne, der bærer *qacA*- eller *qacB*-gener, og kan således estimere, hvordan *qac*-bærende stafylokokker cirkulerer imellem sengevasken og afdelingerne.

Vores model viste, at der på sidegærder, fodgærder og kontrolpaneler føres omkring  $10^6$  stafylokokker (MPN/år) tilbage fra vaskeområdet til afdelingerne. Antallet er nogenlunde ligeligt fordelt mellem sidegærder, fodgærder og kontrolpaneler. På daglig basis svarer det til 2-3 x

$10^3$  MPN. Målt som kimalt forventes antallet at være omkring 100 gange højere. Mens sengene er i afdelingerne stiger antallet, således at antallet af stafylokokker, der transporteres via senge fra afdelingerne til vaskekælderen, ligger omkring  $10^7$  MPN/år. Hovedparten findes på sengegærder og fodgærder. Det kan således konstateres, at sengevasken formår at reducere antallet af stafylokokker, om end de ikke bliver helt fjernet.

Som nævnt ovenfor har vi ingen information om raten, hvormed *qac*-gener kan overføres imellem stafylokokker, og ved hvilke QAC koncentrationer, det i givet fald sker ved. Vi har derfor ikke kunnet modellere i hvilket omfang horisontal spredning af *qac*-gener forekommer i et lokalt miljø som Hvidovre Hospital. Det var således meningen, at modellen skulle beskrive, hvorledes og i hvilket omfang *qac*-gener spredes fra *qac* positive til *qac* negative bakterier under et selektivt pres i form af brugen af QAC-holdige desinfektionsmidler. Imidlertid lykkedes det ikke at generere data i laboratoriet for overførsel af *qac*-gener. Ligeledes er information om dette i den videnskabelige litteratur særdeles sparsom, og det var derfor ikke muligt, at modellere hvorledes disse gener kan spredes horisontalt mellem stafylokokpopulationer på HH.

Men da vores undersøgelser viste, at stafylokokker, der bærer disse *qac*-gener, er forekommende på HH, forsøgte vi, at estimere i hvor høj grad *qac*-positive stafylokokker cirkulerer imellem sengevask og afdelinger.

Vi kunne beregne, at der transporteres cirka  $10^6$  *qac*-bærende stafylokokker (MPN) fra afdelingerne til vaskekælderen og  $2 \times 10^5$  *qac*-bærende stafylokokker (MPN) fra vaskekælderen til afdelingerne. Hoveddelen af de *qac*-bærende stafylokokker er *S. hominis*.

Hvad hjælpemidlerne angår, er de rengjorte objekter med positive fund kun gjort efter opformering (til MPN) og hovedsageligt på kørestole. Blandt de ikke rengjorte hjælpemidler er det hovedsageligt kørestole og rollatorer, der er positive. Koncentrationerne er høje sammenlignet med sengene både før og efter rengøring, og kan derfor bidrage til patienters, personalets og de pårørendes kontakt med stafylokokker.

For de rengjorte vugger er positive fund ligeledes kun gjort efter opformering. På 11 ikke rengjorte vugger var 9 positive ved opformering og to positive i kimaltsbestemmelsen. Koncentrationerne (MPN/cm<sup>2</sup>) er høje sammenlignet med sengene både før og efter rengøring.

Der er ingen sammenlignelige data, da hjælpemidler tilsyneladende ikke tidligere er blevet undersøgt for stafylokokker.

Om end vores model ikke har kunnet påvise i hvilken grad QAC resistens og krydsresistens overfor antibiotika kan udvikles og spredes i et lokalmiljø som Hvidovre Hospital, så har vi vist, at stafylokokker cirkulerer imellem sengevasken og afdelingerne. Nogle af disse bakterier bærer tilmed på *qac*-gener med den kendte fare, der er for, at resistens kan spredes yderligere (Jennings et al., 2015). Til denne fare skal tillægges, at også andre bakteriearter kan bære disse gener, samt at der også findes andre gener, der er involveret i udviklingen af QAC resistens. Mange af disse gener bæres ofte på det samme "multidrug resistance plasmid" som antibiotikaresistensgener (Russel, 2003), hvilket øger risikoen for at sprede ikke kun QAC resistens, men også specifik antibiotikaresistens ved den udbredte brug af QAC baserede desinfektionsmidler (Laxminarayan, 2014).

Vask og desinfektion af senge og hjælpemidler er vigtig for at forhindre udvikling og spredning af QAC- og antibiotikaresistens på hospitalerne. Det er dog samtidigt et paradoks, at selvsamme nødvendige desinfektion, kan være med til at øge udviklingen af resistens. Det er derfor af afgørende betydning, at desinfektionen er så effektiv som muligt, således at så få stafylokokker (såvel som andre bakterier) cirkulerer fra sengevasken til afdelingerne. Endvidere bør det overvejes nøje hvilke aktivstoffer, der bruges til desinfektionen, da visse er mere tilbøjelige end andre til at fremme udviklingen af resistens (Jennings et al., 2015).

## 9. Konklusioner

I dette projekt er risikoen for at bakterier kan adaptere til biocider efter længere tids påvirkning blevet vurderet. Projektet har fokuseret på to Gram positive bakterier nemlig *Listeria monocytogenes*, som er en meget relevant fødevareråren patogen, samt *Staphylococcus aureus*, der er kendt for at give infektioner både i og udenfor hospitalerne. De valgte biocider har været hydrogenperoxid, benzalkoniumklorid og nanosølv. Baggrunden for valget har været baseret på relevans for fødevarerindustrien og hospitalerne, samt at "nye" stof-grupper såsom nanosølv adresseres. Foruden adapteringer under laboratorieforhold har der i projektet været undersøgt i hvilket omfang, der kan findes stafylokokker i forbindelse med vaskefaciliteter på Hvidovre hospital, og i hvilket omfang de er associeret med potentielle biocid resistensgener.

På baggrund af analyserne kan der drages en række konklusioner:

- 1) Resultaterne i de foretagne studier viser tydeligt, at der sker en adaptering af de analyserede bakterier, og at graden hvormed denne tilvænnning sker er artsspecifik. Især *S. aureus* adapterede til at vokse i langt højere koncentrationer af  $H_2O_2$  efter eksponering til ikke-dødelige koncentrationer af  $H_2O_2$  end ikke-eksponerede celler. Det viste sig tilmed, at adaptationen tillod vækst ved  $H_2O_2$  koncentrationer langt højere end dem, der var anvendt under adaptationen. Efter eksponering kunne de tilvænnede kulturer overleve i almindelig brugskoncentration af  $H_2O_2$ . Denne nedsatte følsomhed tilskrives bakteriernes opregulering af det naturlige respons til denne type stress, som kommer målbart til udtryk ved forhøjet katalase-aktivitet. For *Listeria monocytogenes* sås ikke stigninger i den minimale inhibitoriske koncentration (MIC) overfor  $H_2O_2$ , og vi observerede heller ikke bedre overlevelse i høje koncentrationer af dette stof.
- 2) For den kvarternære ammonium forbindelse, benzalkoniumklorid (BZK) udviste både *S. aureus* og *L. monocytogenes* potentiale for adaptation, idet MIC værdien ændrede sig, men det var ikke muligt at påvise bedre overlevelse af de eksponerede kulturer ved tilstedeværelse af BZK i sammenligning med ikke-eksponerede celler. Dette tyder på, at der kan ske ændringer i bakterierne, som kan lede til øget tolerance overfor BZK, også selvom stammerne som udgangspunkt ikke indeholder kendte resistensgener.
- 3) Den anvendte test til måling af følsomhed overfor antimikrobielle stoffer, MIC; som er anerkendt standardmetode til antibiotika, blev ikke vurderet velegnet til at bedømme bakteriernes følsomhed overfor biocider pga. den lange kontaktid mellem bakterier og biocid (18-24 timers inkubation) samt de store spring i biocidkoncentrationer, der anvendes i metoden. Endvidere var der ringe korrelation imellem de målte MIC værdier, og de enkelte biociders evne til at slå bakterierne ihjel. Det var særligt vanskeligt at vurdere effekten af sølv-nanopartikler med traditionelle metoder, og metoder til vurdering af effektivitet og adaptation overfor sølv bør udvikles yderligere.
- 4) På baggrund af de udførte forsøg konkluderer vi, at antibiotikaresistens af de to udvalgte Gram-positive bakterier ikke blev påvirket af biocideksponering. Virulensen blev vurderet ved et meget simpelt assay, som udelukkende baserer sig på udtryk af virulens gener. Ved disse målinger viste vores resultater, at når *S. aureus* udsættes for biocider, reduceredes virulensen generelt.

- 5) Ved indsamling af bakterieprøver fra hospitalsmiljøet fandt vi, at en mindre del af *Staphylococcus* isolaterne indeholdt *qac* gener, især i *S. hominis*, der hører under gruppen af koagulase-negative stafylokokker (CoNS). I disse stammer korrelerede tilstedeværelse af *qac* gener med en gennemsnitlig højere MIC overfor BZK. Vi så dog også, at de stammer, som var adapteret til BZK i laboratoriet, kunne opnå samme MIC som isolaterne med *qac*-gener, der var indsamlet. Dette viser, at *qac* generne ikke er de eneste risikofaktorer for at stafylokokker overlever desinfektion.
- 6) Undersøgelsen af stafylokokker på senge og hjælpemidler viste, at forekomsten af *S. aureus* er beskednen. Derimod blev der observeret koagulase negative stafylokokker. Effektiviteten af rengøringen blev estimeret til at være i omegnen af 80%, hvilket er nogenlunde i overensstemmelse med, hvad der beskrives i litteraturen. På de rengjorte senge var risikoen for kontakt med stafylokokker størst på kontrolpanelerne, mens det var sidegærdene, der udgjorde den største risiko på de "brugte" senge.
- 7) Undersøgelsen gav ikke mulighed for at vurdere horisontal spredning af resistens mellem populationer. Modellen for spredning er derfor kun baseret på spredningen af stafylokokker. Der kunne ikke observeres en forøget andel af *qac*-bærende stafylokokker i forbindelse med vaskeprocessen. Spredningen af *qac*-bærende stafylokokker synes derfor at følge spredningen af stafylokokker proportionalt.

# 10. Perspektivering

I projektet har vi vist, at bakterier, som er relevante i fødevarereproducerende miljøer samt i hospitalerne, kan adapteres til biocider, når disse forekommer i ikke-dødelige koncentrationer. Generelt kan bakterier ikke "vænnes" til biocider i en sådan udstrækning, at de kan tåle de anbefalede brugskoncentrationer, men i et enkelt tilfælde skete der adaptering til biocid koncentrationer, som rent faktisk anvendes, nemlig for *S. aureus* til 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. På baggrund af disse resultater vil man kunne forvente, at der vil kunne ske en adaptation af bakterier, som er i kontakt med biocider i sub-lethale koncentrationer. Sådanne forhold kan tænkes at forekomme, hvis desinfektion sker uden forudgående grundig rengøring, eller hvis der sker fejl i doseringen af biociderne. Resultaterne fremkommet her understreger betydningen af grundig rengøring og opmærksomhed blandt rengøringspersonalet omkring korrekt rengøring.

I projektet har vi også fundet, at den udbredte metode til at måle følsomhed nemlig MIC generelt ikke er et godt mål for, hvor effektive bakterierne slås ihjel af biocider. Metoder til vurdering af biocidfølsomhed i bakterier bør udvikles yderligere baseret på drabseffektivitet, og herunder kunne "hurtig tests" til at vurdere tolerance overfor biocider være særdeles nyttige. Sådanne metoder kunne anvendes som en del af rengøringskontrollen. Nogle stafylokokker ses at overleve den manuelle sengevask; der bør være fokus på kontakttid og risiko for krydskontaminering. I litteraturen har man for nylig rapporteret at MRSA ikke dræbes effektivt med H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, og dette understøttes af vores resultater, hvor vi endvidere kan pege på mekanismen bag, nemlig at adapterede bakterier producerer mere katalase end normalt, og denne aktivitet inaktiverer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Derfor bør det overvejes, om der overfor MRSA, skal veksles imellem flere forskellige typer biocider. Forøget katalase aktivitet synes også at reducere følsomheden overfor sølvioner, om end dette skal undersøges yderligere.

I forbindelse med fremtidig forskning vil det være interessant at undersøge nærmere tilstedeværelse af coagulase negative stafylokokker, som bærer *qac* gener i hospitalsmiljøet, og i hvilket omfang tilstedeværelse af *qac* gener påvirker resistens niveauet overfor biocider. Endvidere er det væsentlig at undersøge, hvad evolutionspotentialer er for stafylokokker som bærer *qac* gener, men som ikke nødvendigvis endnu er resistente overfor biocider. Formentlig kan der, ved evolution af disse stammer udvikles et betydeligt højere resistens niveau end i stammer, som ikke bærer *qac* gener, men et spørgsmål er så, hvor levedygtige sådanne stammer er, og hvad deres resistens niveau er overfor antibiotika.

Hvorvidt rengøring og desinfektion af senge og hjælpemidler på HH er tilstrækkelig, kan ikke afgøres ved denne undersøgelse, og det har heller ikke været formålet. Undersøgelsen har peget på, hvor risikoen for at komme i kontakt med stafylokokker er størst. Hvis risikoen for hospitalserhvervede infektioner anses for at være for høj, kan undersøgelsens resultat derfor anvendes til at reducere den potentielle risiko for kontakt med stafylokokker via senge og hjælpemidler. Den anvendte MPN metodik vil desuden kunne udvikles til en metode til overvågning af, om spredning af stafylokokker eller andre kritiske sygdomsfremkaldende organismer hospitaler udvikler sig over tid, således, at man kan intervenere på et tidligt tidspunkt.

# 11. Referencer

- Allerberger F, Wagner M (2010) Listeriosis: a resurgent foodborne infection. *Clin Microbiol Infect* 16(1):16-23
- Amin, Z.R., Khashyarmansh, Z., Bazzaz, B.S.F., 2016. Different behavior of *Staphylococcus epidermidis* in intracellular biosynthesis of silver and cadmium sulfide nanoparticles: more stability and lower toxicity of extracted nanoparticles. *World J Microbiol Biotechnol* 32:140
- Andersson, D., Hughes, D. (2011) Persistence of antibiotic resistance in bacterial populations. *FEMS Microbiology Reviews*. 35: 901-911
- Anon. (2013) Principper for anvendelse af desinfektionsmidler i sundhedssektoren i Danmark. Central Enhed for Infektionshygiejne, Statens Serum Institut
- BAuA (2012) Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin. Tyskland. 2012
- Chowdhury, N.R., MacGregor-Ramiasa, M., Zilm, P., Majewski, P., Vasilev, K. 2016. 'Chocolate' silver nanoparticles: Synthesis, antibacterial activity and cytotoxicity. *Journal of Colloid and Interface Science* 482:151–158
- Christensen EG, Gram L, Kastbjerg VG. (2011) Sublethal triclosan exposure decreases susceptibility to gentamicin and other aminoglycosides in *Listeria monocytogenes*. *Antimicrob Agents Chemother*. 55(9):4064-71
- CLSI (2012) Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eleventh Edition. CLSI document M02-A11. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute
- Cottell A, Denyer SP, Hanlon GW, Ochs D, Maillard JY. (2009) Triclosan-tolerant bacteria: changes in susceptibility to antibiotics. *J Hosp Infect*. 72(1):71-6
- Curiale, M. MPN Calculator. Build 23. Ikke længere tilgængelig. Build 24 kan downloades på <http://i2workout.com/mcuriale/mpn>
- De Gelder L, Ponciano JM, Abdo Z, et al. (2004) Combining mathematical models and statistical methods to understand and predict the dynamics of antibiotic-sensitive mutants in a population of resistant bacteria during experimental evolution. *Genetics*. 168(3):1131–1144
- Deepak V, Kalishwaralal K, Kumar Pandian SR, Gurunathan S (2011) An insight into the bacterial biogenesis of silver nanoparticles, industrial production and scale-up. In: Rai M, Duran N (eds) *Metal nanoparticles in microbiology*. Springer, New York
- Firdhouse, M.J., Lalitha, P., 2016. Biogenic silver nanoparticles – Synthesis, characterization and its potential against cancer inducing bacteria. *Journal of Molecular Liquids* 222:1041 –1050
- Fishovitz, J, Hermoso, JA, Chang, M, Mobashery, S (2014) Penicillin-Binding Protein 2a of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *IUBMB Life*. 66(8): 572–577
- Halvorson, HO, Ziegler, NR (1933). "Application of Statistics to Problems in Bacteriology: I. A Means of Determining Bacterial Population by the Dilution Method." *J Bacteriol* 25(2): 101-121
- Hegstad K, Langsrud S, Lunestad BT, Scheie AA, Sunde M, Yazdankhah SP. (2010) Does the wide use of quaternary ammonium compounds enhance the selection and spread of antimicrobial resistance and thus threaten our health? *Microb Drug Resist*. 16(2):91-104
- Huslage, K, et al. (2010). A quantitative approach to defining "high-touch" surfaces in hospitals. *Infect Control Hospital Epidemiol* 31(8):850-853



- Iwase T, Tajima A, Sugimoto S, Okuda K, Hironaka I, Kamata Y, Takada K Mizunoe Y. (2013) A Simple Assay for Measuring Catalase Activity: A Visual Approach. *Sci Rep* 3:3081
- Jennings MC, William KPC, Wuest M (2015) Quaternary Ammonium Compounds: An Antimicrobial Mainstay and Platform for Innovation to Address Bacterial Resistance. *ACS Infect. Dis.*, 1 (7), pp 288–303
- Jensen A, Thomsen LE, Jørgensen RL, Larsen MH, Roldgaard BB, Christensen BB, Vogel BF, Gram L, Ingmer H (2008) Processing plant persistent strains of *Listeria monocytogenes* appear to have a lower virulence potential than clinical strains in selected virulence models. *Int J Food Microbiol* 23(3):254-61
- Kaatz GW, Seo SM (1995) Inducible NorA-Mediated Multidrug Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 39(12):2650–2655
- Kloos, WE (1998) *Staphylococcus*. In Eds. Collier L, Balows A, and Sussman M. Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections. 9<sup>th</sup> ed, Vol 2, 27. Arnold, London.
- Larsen MH, Kallipolitis BH, Christiansen JK, Olsen JE, Ingmer H (2006) The response regulator *ResD* modulates virulence gene expression in response to carbohydrates in *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* 61(6):1622-35
- Laxminarayan R (2014) Antibiotic effectiveness: Balancing conservation against innovation. *Science* 345: 1299-1301
- Loh E, Memarpour F, Vaitkevicius K, Kallipolitis BH, Johansson J, Sondén B (2012) An unstructured 5'-coding region of the *prfA* mRNA is required for efficient translation. *Nucleic Acids Res* 40(4):1818-27
- McShan D, Ray PC, Yu H (2014) Molecular toxicity mechanism of nanosilver. *J Food Drug Anal* 22(1):116-27
- MEEDDM (2009) Ministère de l'Ecologie, du Développement durable et de l'Energie. Frankrig. 2009
- MST (2001) Inventory of Biocides used in Denmark. Environmental Project No. 585 2001 Miljøprojekt. Miljøstyrelsen. 2001
- Murdoch, LE, Bailey, L, Banham, E, Watson, F, Adams, NMT, Chewins, J (2016) Evaluating different concentrations of hydrogen peroxide in an automated room disinfection system. *Lett Appl Microbiol*, 63 (3):178-182
- Nanda, A., Saravanan, M. 2009. Biosynthesis of silver nanoparticles from *Staphylococcus aureus* and its antimicrobial activity against MRSA and MRSE. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 5:452 –456
- Nielsen A, Nielsen KF, Frees D, Larsen TO, Ingmer H (2010) Method for screening compounds that influence virulence gene expression in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 54(1):509-12
- Nielsen LN, Larsen MH, Skovgaard S, Kastbjerg V, Westh H, Gram L, Ingmer H (2013) *Staphylococcus aureus* but not *Listeria monocytogenes* adapt to triclosan and adaptation correlates with increased *fabI* expression and *agr* deficiency. *BMC Microbiol* 13(1):177
- Nissen J (2014) Hospitalshygiejne. SUS, Serviceerhvervenes Efteruddannelsesudvalg
- Ortega Morente E, Fernández-Fuentes MA, Grande Burgos MJ, Abriouel H, Pérez Pulido R, Gálvez A. (2013) Biocide tolerance in bacteria. *Int J Food Microbiol*. 162(1):13-25
- Palisade Coporation (2012) @Risk for Excel. Version 6.0.1. Industrial Edition

- Paulsen IT, Brown MH, Littlejohn TG, Mitchell BA, Skurray RA (1996) Multidrug resistance proteins QacA and QacB from *Staphylococcus aureus*: Membrane topology and identification of residues involved in substrate specificity. *Proc Natl Acad Sci*. 93:3630-3635
- Penna TC, Mazzola PG, Silva Martins AM (2001) The efficacy of chemical agents in cleaning and disinfection programs. *BMC Infect Dis*, 1:16–23
- Rushdy, AA, Othman, AS. (2011) Bactericidal efficacy of some commercial disinfectants on biofilm on stainless steel surfaces of food equipment. *Ann Microbiol*, 61(3):545-552
- Russell AD (2001) Mechanisms of bacterial insusceptibility to biocides. *Am J Infect Control*. 29(4):259-61
- Russel AD (2003) Biocide use and antibiotic resistance: the relevance of laboratory findings to clinival and environmental situations. *The Lancet Infectious Diseases Vol 3*: 794-803
- Sahl J, Lemmer D, Travis J, Schupp J, Gillece J, Aziz M, Driebe E, Drees K, Hicks N, Williamson C, Hepp C, Smith D, Roe C, Engelthaler D, Wagner D, Keim P. (2016) NASP: an accurate, rapid method for the identification of SNPs in WGS datasets that supports flexible input and output formats. *M Gen* 2(8)
- Skovgaard S, Larsen MH, Nielsen LN, Skov RL, Wong C, Westh H, Ingmer H. (2013a) Recently introduced *qacA/B* genes in *Staphylococcus epidermidis* do not increase chlorhexidine MIC/MBC. *J Antimicrob Chemother* 68(10):2226-33
- Skovgaard S, Nielsen LN, Larsen MH, Skov RL, Ingmer H, Westh H. (2013b) *Staphylococcus epidermidis* isolated in 1965 are more susceptible to triclosan than current isolates. *PLoS One* 8(4):e62197
- Spicknall IH, Foxman B, Marrs CF, Eisenberg JNS. (2013) A Modeling Framework for the Evolution and Spread of Antibiotic Resistance: Literature Review and Model Categorization. *Am J Epidemiol* 178(4):508–520
- Tamayo, L.A., Zapata, P.A., Vejar, N.D., Azócar, M.I., Gulppi, M.A., Zhou, X., Thompson, G.E., Rabagliati, F.M., Páez, M.A., 2014. Release of silver and copper nanoparticles from polyethylene nanocomposites and their penetration into *Listeria monocytogenes*. *Materials Science and Engineering C* 40: 24–31
- Tenover FC, Goering RV. (2009) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300: origin and epidemiology. *J Antimicrob Chemother* 64(3):441-446
- Vogel, BF, Jorgensen, LV, Ojeniyi, B, Huss, HH, Gram, L (2001) Diversity of *Listeria monocytogenes* isolates from cold-smoked salmon produced in different smokehouses as assessed by Random Amplified Polymorphic DNA analyses. *Int. J. Food Microbiol* 65, 83–92
- Wassenaar, TM, Ussery, DW, Ingmer, H. (2016) The *qacC* gene has recently spread between rolling circle plasmids of *Staphylococcus*, indicative of a novel gene transfer mechanism. *Front Microbiol*, 7: artikel 1528
- Watkins RR, David MZ, Salata RA (2012) Current concepts on the virulence mechanisms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol* 61
- Wessels S, Ingmer H. (2013) Modes of action of three disinfectant active substances: A review. *Regul Toxicol Pharmacol* 67(3):456-67
- Wulff G, Gram L, Ahrens P, Vogel BF. One group of genetically similar *Listeria monocytogenes* strains frequently dominates and persists in several fish slaughter- and smokehouses. *Appl Environ Microbiol* 2006 Jun;72(6):4313-22
- Yang Y., Bazhin, A.V., Werner, J., Karakhanova, S., 2013. Reactive Oxygen Species in the Immune System. *International Reviews of Immunology*, 32:249–270

Yuen JW, Chung TW, Loke AY. (2015) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) contamination in bedside surfaces of a hospital ward and the potential effectiveness of enhanced disinfection with an antimicrobial polymer surfactant. *Int J Environ Res Public Health*, 12(3):3026-41

Yun, HS, Kim, Y, Oh, S, Jeon, WM, Frank, JF, Kim, SH (2012) Susceptibility of *Listeria monocytogenes* biofilms and planktonic cultures to hydrogen peroxide in food processing environments, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 76(11):2008-201

# Bilag 1. Analyserapport



Product Testing

DHI-Institut For Vand og Miljø  
Torben Wilde Søhou  
Agern Alle 5  
2970 Hørsholm  
DENMARK

Eurofins Product Testing A/S  
Smedeskovvej 38  
8464 Galten  
Denmark

product-testing@eurofins.dk  
www.eurofins.dk/dk/product-testing

## PRØVNINGSRAPPORT

Modtagelsesdato	15-04-2016	Batchnummer	EUDKGA-16001500
Analysestart	19-04-2016	Rapportnummer	EUDKGA-16001500
Rapportdato	04-05-2016		
Kundens reference			

Prøve	392-2016-00150001 (Mikr-Quat Extra)					
Kode	Navn	Resultat	Enhed	LOQ	Enhed	Intern metode
SF4MX	Kvarternære ammoniumforbindelser					LA-LCMS-034
	Didecyldimethylammoniumchlorid (DDAC-C10)*a	11	g/kg	0,1	g/kg	
	Benzyl-dimethyldodecylammoniumchlorid (BAC-C12)*a	53	g/kg	0,1	g/kg	
	Miristalkoniumchlorid (BAC-C14)*a	22	g/kg	0,1	g/kg	
	Cetalkoniumchlorid (BAC-C18)*a	0,6	g/kg	0,1	g/kg	
	Benzalkoniumchlorid (total) (BAC)*a	76	g/kg	0,1	g/kg	
Metode reference						
LA-LCMS-034 - Internal Method 1						

Analyse er udført i underleverance på et Eurofins laboratorium.

Eurofins Product Testing

Jesper R. Bak

Cand.scient, kemi

<: Mindre end

>: Større end

LOQ: Kvantifiseringsgrænse

Um(%): Den ekspanderede usikkerhed Um(%) er lig 2 x RSD%.

Resultater er kun gældende for de(t) analyserede testemne(r).

Denne rapport må kun kopieres eller genudskrives i sin helhed, dele af rapporten må kun anvendes med skriftlig bekræftelse fra Eurofins.

\*) Ikke akkrediteret

=) Udført af Eurofins godkendt partner

n.d) Ikke detekteret

n.m: Ikke målbart

Side 1 af 1

## Bilag 2.

## Overfladearealer

Beregning af overfladearealer af de undersøgte objekter			
	Længde (cm)	Bredde/omkreds (cm)	Areal (cm <sup>2</sup> )
Børneseng, sengegærde	256	6,5	1.664
Børneseng, fodgærde	210	8	1.680
Børneseng, kontrolpanel	18	10	180
Børneseng, total <sup>2</sup>			3.524
Juniorseng, sengegærde	163	6,8	1.108
Juniorseng, fodgærde	159	8,3	1.320
Juniorseng, kontrolpanel <sup>1</sup>	18	10	180
Juniorseng, total <sup>2</sup>			2.608
Voksenseng, sengegærde	142	10,5	1.491
Voksenseng, fodgærde	82	8	656
Voksenseng, kontrolpanel <sup>1</sup>	18	10	180
Gennemsnit, sengegærde <sup>3</sup>			1.421
Gennemsnit, fodgærde <sup>3</sup>			1.219
Gennemsnit, kontrolpanel <sup>3</sup>			180
Gennemsnit, total <sup>3</sup>			2.820

<sup>1</sup>Kontrolpanelerne var af variabel størrelse. Der er anvendt en middelstørrelse for alle sengetyper.

<sup>2</sup>Sum af sengegærde, fodgærde og kontrolpanel

<sup>3</sup>Gennemsnit af børne-, junior-, og voksensenge

# Bilag 3.

# Resultater af MPN bestemmelser

	Positive prøver	Totalt antal prøver	MPN (/cm2)	Lower 95% CI (/cm2)	Upper 95% CI (/cm2)	Red (%)	MPN (/seng)	Lower 95% CI (/seng)	Upper 95% CI (/seng)
<b>Alle arter</b>	64	149	0.028	0.022	0.036		79	62	102
Før rengøring	50	79	0.05	0.038	0.067		141	107	189
Efter rengøring	14	70	0.011	0.0066	0.019	78%	31	19	54
<b>S. epidermidis</b>	33	149	0.013	0.0089	0.018		37	25	51
Før rengøring	30	79	0.024	0.017	0.034		68	48	96
Efter rengøring	3	70	0.0022	0.00071	0.0068	91%	6	2	19
<b>S. hominis</b>	17	149	0.0061	0.0038	0.0097		17	11	27
Før rengøring	14	79	0.0098	0.0058	0.016		28	16	45
Efter rengøring	3	70	0.0022	0.00071	0.0068	78%	6	2	19
<b>Andre arter</b>	18	149	0.0064	0.0041	0.01		18	12	28
Før rengøring	9	79	0.006	0.0031	0.012		17	9	34
Efter rengøring	9	70	0.0069	0.0036	0.013	-15%	19	10	37
<b>11-4-2016</b>	16	50	0.019	0.012	0.032		54	34	90
Før rengøring	15	30	0.035	0.021	0.058		99	59	164
Efter rengøring	1	20	0.0026	0.00036	0.018	93%	7	1	51
<b>25-4-2016</b>	25	50	0.035	0.023	0.052		99	65	147
Før rengøring	17	25	0.057	0.035	0.094		161	99	265
Efter rengøring	8	25	0.019	0.0096	0.039	67%	54	27	110
<b>9-5-2016</b>	23	49	0.032	0.021	0.048		90	59	135
Før rengøring	18	24	0.069	0.042	0.11		195	118	310
Efter rengøring	5	25	0.011	0.0046	0.027	84%	31	13	76
<b>Alle senge</b>	38	111	0.021	0.015	0.029		59	42	82
Før rengøring	31	57	0.039	0.027	0.056		110	76	158
Efter rengøring	7	54	0.0069	0.0033	0.015	82%	19	9	42
<b>Alle børnesenge</b>	13	38	0.021	0.012	0.036		74	42	127
Før rengøring	10	20	0.035	0.018	0.065		123	63	229
Efter rengøring	3	18	0.0091	0.0029	0.028	74%	32	10	99
<b>Alle juniorsenge</b>	12	36	0.02	0.011	0.036		52	29	94
Før rengøring	10	18	0.041	0.021	0.077		107	55	201
Efter rengøring	2	18	0.0059	0.0015	0.024	86%	15	4	63
<b>Alle Voksensenge</b>	13	37	0.022	0.013	0.037		51	30	86
Før rengøring	11	19	0.043	0.024	0.08		100	56	186
Efter rengøring	2	18	0.0059	0.0015	0.024	86%	14	3	56
<b>Vugger</b>	11	19	0.043	0.024	0.08				
Før rengøring	9	11	0.085	0.041	0.18				
Efter rengøring	2	8	0.014	0.0036	0.058	84%			
<b>Alle hjælpermidler</b>	15	19	0.078	0.045	0.14				
Før rengøring	10	11	0.12	0.055	0.26				
Efter rengøring	5	8	0.049	0.02	0.12	59%			
<b>Sidegærde</b>	15	37	0.026	0.016	0.043		37	23	61
Før rengøring	14	19	0.067	0.038	0.12		95	54	171
Efter rengøring	1	18	0.0029	0.0004	0.02	96%	4	1	28
<b>Kontrolpanel</b>	15	37	0.026	0.016	0.043		5	3	8
Før rengøring	10	19	0.037	0.02	0.07		7	4	13
Efter rengøring	5	18	0.016	0.0067	0.039	57%	3	1	7
<b>Fodgærde</b>	8	37	0.016	0.0067	0.039		19	8	48
Før rengøring	7	19	0.023	0.011	0.049		28	13	60
Efter rengøring	1	18	0.0029	0.0004	0.02	87%	4	0.5	24



## Biocider

Dette projekt om risikofaktorer og resistens ved brug af antimikrobielle biocider i miljøer som hospitaler og fødevarer-produktioner blev gennemført i perioden juli 2014 til december 2016 og er finansieret af Miljøstyrelsens program for forskning i bekæmpelsesmidler. Rapporten omhandler bakteriers tilpasningsevne og overlevelse i kontakt med hydrogenperoxid og benzalkoniumklorid samt sølv-nanopartikler. Som modelorganismer blev der arbejdet med to hyppigt forekommende og sygdomsfremkaldende bakterier. Desuden blev der foretaget undersøgelser af et dansk hospitals sengevask, hvor forekomsten af bakterier blev målt før og efter vask og desinfektion af senge, vugger og kørestole. Et formål med projektet var at bedømme hvilke ændringer der sker i bakterier efter længere tids påvirkning med ikke-dræbende koncentrationer af biocider. Et andet formål var at identificere parametre og indhente data der kunne bruges i en model over risikoen for resistensudvikling blandt bakterier (Stafylokokker) på et hospital, der bruger benzalkoniumklorid til desinfektion. Bakterierne udviste tydelig tilpasningsevne til de anvendte biocider, og denne tilvænnning var artsspecifik. Især *S. aureus* var i stand til at vokse i højere koncentrationer af hydrogenperoxid efter eksponering til ikke-dødelige doser. I hospitalssengevasken efter rengøring var risikoen for kontakt med stafylokokker størst på kontrolpanelerne, mens det var sidegærdene, der udgjorde den største risiko på de "brugte" senge inden vask. Effektiviteten af rengøringen blev estimeret til at være ca. 80%. Samlet kan det konkluderes at bakterier ændrer sig under påvirkning af biocider og at disse ændringer kan føre til reduceret følsomhed såsom det er tilfældet med stafylokokker hvor forøget katalase produktion beskytter mod hydrogen peroxid.



Miljøstyrelsen  
Strandgade 29  
1401 København K

[www.mst.dk](http://www.mst.dk)