

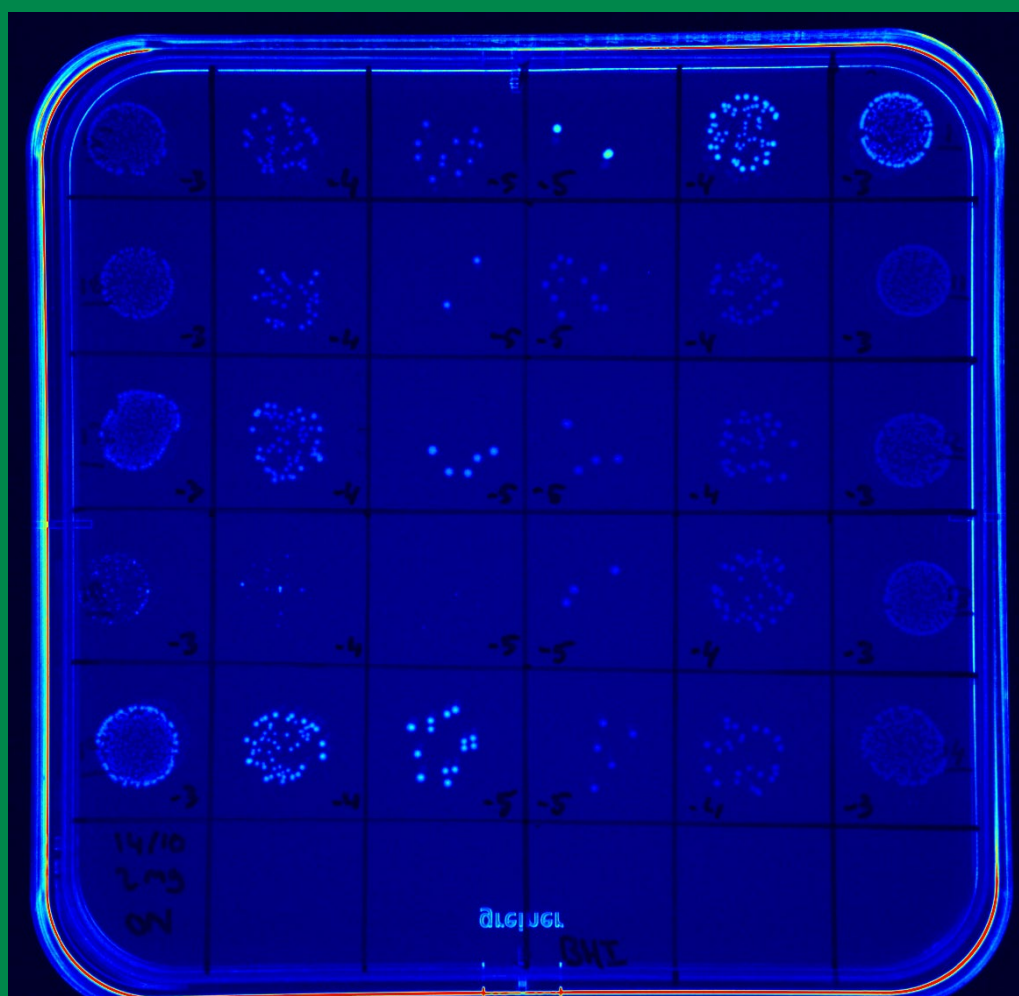


Miljøministeriet
Miljøstyrelsen

Enterokokkers følsomhed overfor klorfrigivende biocider

Bekæmpelsesmiddel-
forskning nr. 203

Oktober 2021



Udgiver: Miljøstyrelsen

Redaktion:

Skive, B.¹;

Pinholt, M.³;

Hammerum, A.M.²;

Hasman, H.² ;

Jensen, C.S.²;

Lawaetz, A.C.¹;

Kjerulf, A.²;

Knudsen, J.D.³;

Ingmer, H.¹

¹Veterinær- og Husdyrvidenskab, Københavns Universitet

²Statens Serum Institut

³Region Hovedstaden

Fotos:

Forside foto: ehtidium bromid akkumulering på agarplade
som mål for bakteriernes effluksaktivitet.

Ophavsret: Institut for Veterinær- og Husdyrvidenskab,
Københavns Universitet.

ISBN: 978-87-7038-349-3

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

1.	Forord	5
2.	Forkortelser	6
3.	Resumé	7
4.	Summary	9
5.	Introduktion	11
5.1	Baggrund	11
5.1.1	Hospitalsassocierede infektioner med enterokokker	11
5.1.2	Valg af biocid	13
5.1.3	Vancomycin resistens og VRE	14
5.1.4	Biocid følsomhed	14
5.1.5	Måling af biocid følsomhed	15
5.2	Formål og hypoteser	17
5.2.1	Projektets overordnede hypoteser	17
5.2.2	Formål	17
5.3	Valg af bakterieisolater	18
5.4	Valg af biocider	18
6.	Materialer og metoder	19
6.1	Stammesamling	19
6.2	Suspensionstest	19
6.2.1	Forberedelse af biocid, kemikalier og neutralisering	19
6.2.2	Bakteriesuspension	20
6.2.3	Forsøgsopsætning - biocidfølsomhed	20
6.2.3.1	Screeningsforsøg	20
6.2.3.2	Tidsdosisrespons	20
6.2.4	Statistik	21
6.3	Test af overlevelse på overflade	21
6.4	Test af præimprægneret klude til overfladedesinfektion	22
6.5	Effluksaktivitet	22
6.5.1	Akkumuleringsforsøg – screening	22
6.5.2	Efflukshæmning og aktivt effluks	22
7.	Resultater	24
7.1	Biocid følsomhed	24
7.1.1	Screening	24
7.1.2	Kortere eksponeringstider og længere inkubering	26
7.1.3	Effekt af bakterieantallet på biocideffektiviteten	28
7.2	<i>E. faecium</i> på overflader	29
7.2.1	Udtørring på laminat	29
7.2.2	Klorklude	31
7.3	Effluksaktivitet	31
7.3.1	Effluksscreening – agar assay	31

7.3.2	Efflukshæmning og -aktivitet over tid	32
8.	Diskussion	34
8.1	Effektiviteten af klorfrigivende stoffer	34
8.2	Overlevelse på overflader	35
8.3	Effekt af mekanisk rengøring og klordesinfektion	36
8.4	Effluksaktivitet	36
8.5	Sammenfattende diskussion	37
9.	Konklusioner	38
10.	Perspektivering	40
	Bilag 1. Stammesamling	41
11.	Referenceliste	41

1. Forord

Dette projekt om enterokokkers følsomhed overfor klorfrigivende biocider blev gennemført i perioden oktober 2018 til december 2020 og er finansieret af Miljøstyrelsens program for forskning i bekæmpelsesmidler.

Projektet blev udført som et samarbejde mellem Institut for Veterinær- og Husdyrvidenskab (IVH), Københavns Universitet (Professor Hanne Ingmer), Statens Serum Institut og hospitaler i Region Hovedstaden.

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

Bolette Skive, Andreas Lawaetz og Hanne Ingmer (IVH, Københavns Universitet), Anette M. Hammerum, Henrik Hasman, Christian S. Jensen og Anne Kjerulf (Statens Serum Institut) og Mette Pinholt og Jenny D. Knudsen (Region Hovedstaden).

Tak til medlemmer af følgegruppen "Eksponering Bekæmpelsesmiddelforskning" for kommentarer og forslag i projektperioden.

Tak til hygiejnesygeplejerskerne på Bispebjerg Hospital for hjælp til kortlægningen af rengøringsprocedure og desinfektionsmiddelansøgelsen på Bispebjerg Hospital. Desuden tak til laborant Vi Phoung Thi Nguyen for bidrag til gennemførelse af forsøg.

2. Forkortelser

Aktivt klor = koncentrationen af den aktive hypochlorsyre i brugsopløsningen

BA = blodagar

BHIa eller BHIb = brain heart infusion agar eller – boullion

CFU/ml = Colony forming units per milliliter = antal kolonier per milliliter

CT = helgenom sekvens type/klon kompleks

E. faecium = *Enterococcus faecium*

EthBr = ethidiumbromid

Frit klor = summen af klor, hypochlorit og hypochlorsyre i brugsopløsningen

HOCl = hypochlorsyre

NaDCC = natrium dichloroisocyanurat = natrium troclosen

NaOCl = natrium hypoklorit

OCl⁻ = hypochlorit

ON = over natten = bakterier der er groet ved 37°C over natten, ca. 16-18 timer

Ppm = parts per million = milliontedele

ST = sekvens type

VRE = vancomycin resistente enterokokker

VREfm = vancomycin resistente *E. faecium*

VSEfm = vancomycin sensitive *E. faecium*

VVEfm = vancomycin variable *E. faecium*

3. Resumé

Projektet tilknyttet denne rapport omhandler udvikling af metoder til vurdering af biociders effektivitet. Metoderne blev anvendt til at analysere en bakterierart, som er kendt for at være vanskelig at udrydde i hospitalsmiljøer. I projektet er der udviklet en suspensions analysemetode, hvorved følsomhed over for biocider effektivt kan undersøges i en række koncentrationer og med varierende eksponeringstider. Problemstillingen bag projektet er bakteriearten, *Enterococcus faecium*, og dennes følsomhed og overlevelsessevne overfor klorfrigivende biocider, samt overlevelse på overflader før og efter desinfektion. Herudover er bakteriernes evne til at pumpe potentielle skadelige stoffer ud over deres cellemembran blevet undersøgt.

Enterococcus faecium (*E. faecium*) er vigtig, fordi den i stigende omfang forårsager hospitalserhvervede infektioner, altså infektion som patienten ikke bliver indlagt med, men får under indlæggelse. Disse infektioner giver anledning til forlængede indlæggelser og øget dødelighed hos patienterne med store menneskelige såvel som økonomiske omkostninger. Særligt problematisk er den øgede forekomst af *E. faecium*, som er resistente over for det antibiotikum, man typisk bruger til at behandle alvorlige infektioner, nemlig vancomycin. Derfor bliver der gjort en stor indsats for at undgå spredning af disse vancomycin resistente *E. faecium* (VREfm) i form af smitteopsporing, screeninger og isolering af inficerede patienter. Intensivering af rengøring og desinfektion i tilfælde af udbrud, hvor mere end to patienter er smittede på en afdeling, er ligeledes en del af strategien. Til trods for disse tiltag opstår der gentagne udbrud og visse varianter (kloner) af VREfm er overrepræsenteret i disse udbrud.

Formålet med dette projekt var således at udvikle en metode, hvormed en større bakteriesamling kunne undersøges for at adressere, om VREfm, og *E. faecium* i det hele taget har udviklet øget tolerance over for det anbefalede desinfektionsmiddel anvendt ved udbrud af VREfm, nemlig klorfrigivende biocider, her især natrium dichlororisocyanurate (NaDCC) og natrium hypoklorit (NaOCl). Forskning har vist, at visse kloner af VREfm persisterer i hospitalsmiljøet og giver gentagne udbrud med spredning imellem patienter. En hypotese i projektet var derfor, at adaptation af disse kloner til klorfrigivende biocider kunne være en medvirkende årsag til udfordringerne med at fjerne dem fra hospitalsmiljøet. Det var derfor relevant at sammenligne disse kloners følsomhed med VREfm kloner som kun isoleres sporadisk, samt at sammenligne med vancomycin følsomme *E. faecium* (VSEfm), for at undersøge om en eventuel øget tolerance kunne være associeret med vancomycin resistens. Herudover blev der foretaget en sammenligning med *E. faecium* som ikke er associeret med hospitaler, for at få et indblik i den generelle følsomhed over for klorfrigivende biocider.

Følsomhed overfor klorfrigivende biocider

I projektet undersøgte en bakteriesamling på 59 *E. faecium* isolater fra dyr og mennesker, som inkluderede vancomycinresistente og -følsomme, samt en særlig gruppe resistente enterokokker, der har været hyppigt forekommende de sidste år, nemlig de vancomycin variable *E. faecium* (VVEfm). Ved analyser af disse fandt vi, at den gennemsnitlige højeste koncentration af frit klor, som bakterierne kunne overleve efter 10 min. eksponering var 415 milliontedel (ppm). Denne værdi er overraskende tæt på den anbefalede brugskoncentrationen ved 10 min kontakttid, som er på 1000 ppm. Som forventet påvirkede en øget koncentration sandsynligheden for vækst negativt. Ved sammenligning af de forskellige grupperinger af isolater blev der imidlertid ikke fundet grupper, som var statistisk signifikant mere tolerante end andre grupper.

Ved mere dybdegående undersøgelse af et udvalg af 6 bakteriestammer ved forskellige kontakttider, samt øget tid til regenerering efter kloreksponering, sås en signifikant positiv effekt af

begge disse faktorer på sandsynligheden for vækst. En lavere kontakttid gav øget sandsynlighed for vækst, ligesom længere tids inkubering efter endt eksponering gav øget sandsynlighed for vækst, også ved højere koncentrationer, endda ved koncentrationer over den anbefalede brugskoncentration.

Overlevelse på overflader og effektivitet af præimprægnerede klorklude

For at bakterier kan overleve i hospitalsmiljøet kræver det, at de kan overleve udtørring på overflader. Det er tidligere vist, at enterokokker har netop denne evne, men det er uklart hvor mange der overlever og hvor længe. Dette er vigtigt med henblik på at estimere risikoen for spredning fra overflader til patienter. For at estimere denne overlevelse blev ca. 10^5 VREfm spredt på testarealer af 25 cm² og henfaldet estimeret ved pladespredning. Efter 8 dage fandt vi at der var under 2 log reduktion i antallet af bakterier ($> 5 \cdot 10^3$ CFU tilbage), og efter 27 dage kunne der stadig genfindes levende bakterier på overfladerne (ca. 10^2). Den lange overlevelse viser med al tydelighed, hvor vigtigt det er med tilstrækkelig rengøring og desinfektion.

I de senere år er desinfektion med præ-imprægnerede klorklude blevet mere udbredt på hospitalerne. Derfor var det vigtigt at undersøge, om disse har tilstrækkelig effekt, da kludene er godkendt med en kontakttid på kun 2 min. Her viste vores resultater, at antallet af bakterier på overfladerne skulle være $> 10^7$ før bakterier kunne genfindes efter overtørring med klorkluden, selv når et opformeringstrin var tilføjet. Det tyder således på, at effekten af overtørring med klorklude er høj ved de forhold det er testet under i laboratoriet.

Vurdering af effluksaktivitet

Der mangler basal viden om årsagerne til, at nogle *E. faecium* kloner synes mere succesfulde i hospitalsmiljøet end andre. En fordel kunne være tilstedeværelse eller forøget aktivitet af effluks-pumper, hvilket vil gøre bakterierne bedre i stand til at skille sig af med skadelige stoffer, herunder antimikrobielle stoffer. Stammesamlingen (n = 59) blev screenet for evnen til at udskille ethidiumbromid (EthBr), et substrat for efflukspumper, som desuden er fluorescerende og derfor kan monitoreres. Meget interessant viste resultaterne, at de hospitalsassocierede kloner generelt havde bedre evne til at udskille EthBr sammenlignet med ikke hospitals-associerede isolater, hvilket tyder på, at de hospitalsassocierede bakterier har en højere effluksaktivitet end andre. De 11 isolater som var bedst til at udskille EthBr var alle hospitalsisolater, og 10 af disse var desuden VREfm. Disse resultater blev bekræftet ved yderligere en effluksaktivitetsmåling, som målte EthBr løbende over et tidsinterval på 6 timer.

Konklusion

Samlet kan det konkluderes at anbefalingerne til kontakttid og koncentration skal overholdes for at sikre den baktericide effekt af klorfrigivende biocider overfor *E. faecium*, samtidigt viser overlevelsen på overfladerne at rengøring og desinfektion er essentiel for at undgå transmission af VREfm fra kontakthader til patienter og personale. Det virker heldigvis til at de præimprægnerede klorkulde har meget god effekt under de forhold de hér er undersøgt.

Høj effluksaktivitet kan være medvirkende til bedre overlevelse for hospitalsassocieret *E. faecium*, f.eks. hvis disse er i kontakt med sub-letale koncentrationer af antimikrobielle stoffer.

4. Summary

This report describes the development of methods for assessing the effectiveness of biocides. The methods were applied to analyze a bacterial species, which causes difficulties to infection control in hospital environments. In the project, a suspension test method has been developed with which sensitivity to biocides can be effectively investigated at different concentrations and with varying exposure times simultaneously. The project centers on the bacterial species, *Enterococcus faecium*, and its survival and resuscitation after exposure to chlorine-releasing biocides, as well as survival on surfaces before and after disinfection. In addition, the ability of bacteria to excrete (efflux) potentially harmful substances across their bacterial cell membrane has been investigated.

Enterococcus faecium (*E. faecium*) is important as an increasing cause of hospital-acquired infections, i.e. infections that are acquired by patients during their hospitalization. These infections give rise to prolonged hospitalizations, increased mortality rates and associated substantial economic burden. Particularly problematic is the increased incidence of *E. faecium* that are resistant to vancomycin, an antibiotic used to treat severe infections. Great efforts are made, such as screenings, detection and tracing, isolation of infected patients as well as carriers. Cleaning and disinfection are intensified in cases of outbreaks where more than one patient is infected in a department to avoid further spread of vancomycin resistant *E. faecium* (VREfm). Despite these measures, repeated outbreaks occur and certain variants (clones) of VREfm are overrepresented in these outbreaks.

The aim of this project was thus to develop a method by which a larger collection of bacteria could be examined to address whether VREfm and *E. faecium* in general have developed increased tolerance to the recommended disinfectant used to control outbreaks of VREfm, namely chlorine-releasing biocides, here especially sodium dichloroisocyanurate (NaDCC) and sodium hypochlorite (NaOCl). Research has shown that certain clones of VREfm persist in the hospital environment and repeatedly cause outbreaks with transmission between patients. One hypothesis in the project was that adaptation of these clones to chlorine-releasing biocides could be a contributing factor to the challenges of removing them from the hospital environment. Comparing the susceptibility of these outbreak clones with VREfm clones which are isolated only sporadically, as well as to vancomycin sensitive *E. faecium* (VSEfm) was performed to investigate whether any increased tolerance could be associated with vancomycin resistance and outbreak clones. In addition, a comparison was made with *E. faecium* which are not associated with hospitals, to get an insight into the general sensitivity towards chlorine-releasing biocides.

Sensitivity to chlorine-releasing biocides

The project examined a bacterial collection of 59 isolates which contained vancomycin resistant and sensitive *E. faecium* isolated from animals and humans as well as a special group of resistant enterococci that have arisen in recent years, the vancomycin variable *E. faecium* (VVEfm). Upon analysis of the collection, we found the average highest concentration of free chlorine that the bacteria could survive after 10 min. exposure to be 415 parts per million (ppm). This value is surprisingly close to the recommended in-use concentration at 10 min contact time, which is 1000 ppm. As expected, increasing the concentration negatively affected the probability of growth. However, when comparing the different groups of isolates, no groups were found statistically significantly more tolerant than other groups.

Upon more in-depth examination of a sample of 6 bacterial strains at different contact times, as well as increased time to regeneration after chlorine exposure, a significant positive effect of both of these factors was seen on the probability of growth. A lower contact time as well as

longer incubation gave an increased probability of growth at higher concentrations, even at concentrations above the recommended in-use concentration (1000 ppm).

Survival of bacteria on inanimate surfaces in the hospital environment requires ability to survive dehydration on surfaces. It has been previously shown that enterococci have this ability, but it is unclear how many survive and for how long. This is important in order to estimate the risk of transmission from inanimate surfaces to patients. To estimate this survival, approx. 10^5 per 25 cm^2 of VREfm were spread on surfaces and survival estimated by culturing on plate. After 8 days we found less than 2 log reduction in the number of bacteria ($> 5 \times 10^3$), and after 27 days, living bacteria could still be found on the surfaces (approx. 10^2). The prolonged survival clearly emphasize the importance of adequate cleaning and disinfection.

In recent years, disinfection with pre-impregnated chlorine wipes has become more prevalent in hospitals. Therefore, it was important to investigate whether these have a sufficient effect, as the wipes are approved with a contact time of only 2 min. Here, our results showed that the number of bacteria on the surfaces had to be $> 10^7$ before bacteria could be recovered after wiping with a chlorine wipe, even when an enrichment step was added. Thus, it suggests that the effect of wiping with chlorine wipes is high under the conditions it has been tested in the laboratory.

Assessment of efflux activity

There is a lack of basic knowledge about the reasons why some *E. faecium* clones seem more successful in the hospital environment than others. One reason could be the presence or increased activity of efflux pumps, which will enable the bacteria to better dispose of harmful substances, including antimicrobials. The collection of isolates ($n = 59$) was screened for the ability to secrete ethidium bromide (EthBr), a substrate for efflux pumps, which is also fluorescent and can thus be measured. Very interestingly, the results showed that the hospital-associated clones generally had a greater ability to secrete EthBr compared to non-hospital-associated isolates, suggesting that the hospital-associated *E. faecium* have a higher efflux activity than other *E. faecium*. The 11 isolates that were best at EthBr efflux were all hospital-associated isolates, and 10 of these were resistant to vancomycin. These results were confirmed by an additional active efflux assay, which measured EthBr continuously over a time interval of 6 hours.

Conclusion

Overall, it can be concluded that the recommendations for contact time and concentration must be very carefully followed to ensure the bactericidal effect of chlorine-releasing biocides against *E. faecium*. At the same time, the survival on surfaces show that cleaning and disinfection are essential to avoid the transmission of VREfm from inanimate surfaces to patients and staff. Fortunately, it seems that pre-impregnated chlorine wipes have a good efficacy under the conditions tested here. Finally, hospital-associated *E. faecium* appears to have high efflux activity relative to other *E. faecium* bacteria, indicating that this activity may be particularly useful in the hospital environment. Further analyzes will be needed to determine what types of substances are exported out of the cells.

5. Introduktion

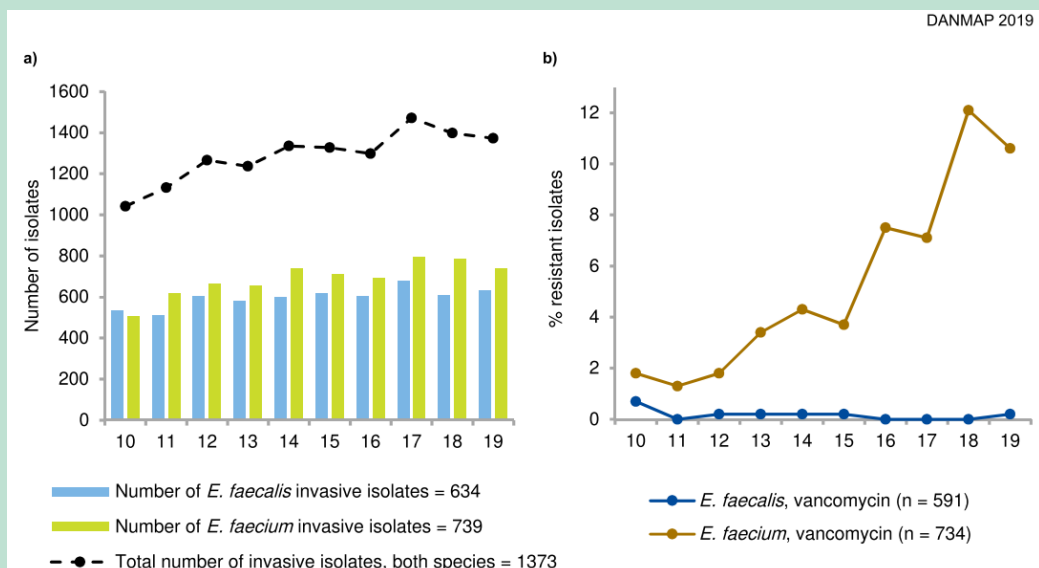
5.1 Baggrund

5.1.1 Hospitalsassocierede infektioner med enterokokker

Hospitalsassocieret infektion også kaldet hospitalserhvervet- eller nosokomial infektion, er en infektion som patienter erhverver i forbindelse med en indlæggelse på hospitalet. Disse infektioner udgør et stort problem for patienters sikkerhed, idet de er forbundet med forøget dødelighed og forlænget hospitalsindlæggelse. De er desuden forbundet med væsentlige økonomiske omkostninger pga. forlængede eller gentagne hospitalsindlæggelser. Flere forskellige bakterier kan forårsage disse infektioner, men de er karakteriseret ved at ofte være multiresistente over for antibiotika, generelt vanskelige at behandle, og have en udtalt evne til at overleve i hospitalsmiljøet på trods af den omfattende rengøring og hygiejne som udvises [1,2]. Til denne kategori hører de vancomycin resistente enterokokker.

Enterokokker er tarmbakterier naturligt forekommende hos raske mennesker og dyr, og på trods af den lave virulens har de ikke desto mindre vist sig i stigende grad at kunne forårsage infektioner. Hos mennesker er det primært de to arter *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) og *Enterococcus faecium* (*E. faecium*), som kan forårsage infektion. Af disse har især vancomycin resistente *E. faecium* (VRE_{fm}) vist sig at være en særlig udfordring i forbindelse med hospitalsinfektion [1]. De vancomycin resistente enterokokker (VRE) er resistente overfor glycopeptidet, vancomycin, som blandt andet bruges til at behandle alvorlige stafylokok infektioner, samt diarré med *Clostridium difficile*. Generelt er infektioner med *E. faecium* problematiske og nogle studier finder at VRE_{fm} infektioner er forbundet med øget økonomisk byrde og dødelighed [3,4], mens andre studier ikke finder statistisk signifikant højere dødelighed sammenlignet med infektioner med vancomycin sensitive enterokokker (VSE) [5,6].

E. faecium kan give infektion i blodbanen, med heraf følgende blodforgiftning, urinvejsinfektion, sårinfektion, inklusiv post kirurgiske infektioner og disse opstår typisk efter behandling med antibiotika [7]. Risikofaktorer associeret med VRE_{fm} infektioner er længerevarende hospitalisering, katetre i blodbanen og/eller urinvejen, patienter med post kirurgiske sår, svækkede patienter med nedsat immunforsvar og høj alder [7]. Enterokokker besidder en general iboende resistens overfor et antal førstevalgs antibiotika, inklusiv cephalosporiner. Har bakterien desuden erhvervet vancomycin resistens, bliver behandlingsmulighederne begrænset til nogle få antibiotika med højere bivirkningsprofil [8]. Derfor vækker den stigende forekomst af VRE_{fm} infektioner bekymring i Danmark så vel som globalt [9,10]. Forekomsten af VRE_{fm} var tidligere meget lav i Danmark, men fra 2012, hvor der var 54 tilfælde af VRE, har der været en kraftig stigning, således at antallet er steget til 660 i 2019, og 11% af de enterokokker der bliver isoleret fra infektioner i blodbanen er VRE [11,12], se figur 1.



FIGUR 1. Enterokokker. Antal isolater og antal vancomycin resistente invasive isolater (%) fra mennesker i Danmark i perioden 2010-2019. Invasiv vil sige isoleret fra blodbanen eller rygmarsvæske. a) Viser det totale antal invasive isolater per år. b) viser hvor mange af isolaterne der er vancomycin resistente. Antallet (n) viser hvor mange isolater der blev registreret i 2019. [2]

VRE FAKTABOKS

- VRE er en tarmbakterie, som er blevet resistent overfor Vancomycin (antibiotika)
- VRE kan overleve i miljøet i op til 4 måneder
- VRE smitter fækal – oralt
- VRE er i de fleste tilfælde en bærertilstand
- VRE kan give anledning til alvorlig sygdom, hvis den kommer over i blodet
- VRE rammer især personer 65+, som har fået behandling med antibiotika indenfor den senere tid og som samtidig er meget syge
- VRE bærertilstand kan ikke behandles, men bakterien vil på sigt blive udkonkurreret af den normale tarmflora
- VRE bærertilstand forebygges ved omhyggelig håndhygiejne efter toiletbesøg og før indtagelse af mad og drikke

En stor del af de patienter, der får konstateret VREfm under hospitalsindlæggelsen bliver ikke syge af den, men bærer bakterien i mave-tarmkanalen uden symptomer i en symptomfri bærertilstand. Som det er tilfældet med VREfm infektioner, fremmes denne bærertilstand betydeligt af forudgående behandling med antibiotika, hvorefter patienten kan risikere at blive "overkoloniseret" med VREfm i tarmen. Denne gruppe patienter udgør en betydelig risiko for spredning af VREfm til andre patienter via hospitalsmiljøet. Dette betyder også, at smitten med VREfm på hospitalerne sker primært via kontakt, hænder og udstyr.

For nuværende isoleres patienter der konstateres med VREfm under hele hospitalsindlæggelsen samt igen, hvis vedkommende bliver genindlagt indenfor 6 måneder. Herudover screenes patienter, som har ligget på samme stue. Er en eller flere positive bliver de ligeledes isoleret, og alle afdelingens patienter screenes. Findes der yderligere en eller flere positive på afdelingen

defineres det som et udbrud. Ved udbrud screenes alle patienter, som ikke allerede er kendte bærere, én gang per uge indtil der ikke findes flere nye tilfælde. Desuden udleveres der informationsfolder til de inficerede patienter. Alt dette for at bremse overførsel af bakterien. Endvidere iværksættes der særlig rengøring og desinfektion på isolationsstuerne, hvilket kan suppleres med andre arealer og kontaktpunkter ved udbrud på en afdeling. Slutrengøringen foretages enten med rengøring samt klorfrigivende desinfektionsmiddel eller med rengøring og en maskine der forstøver hydrogenperoxid. Procedurerne beskrevet ovenfor er gældende for Region Hovedstaden [3]. Region Sjælland og Region Midt foretager også screeninger (personlig kommunikation, Læge Mette Pinholt, KMA Hvidovre).

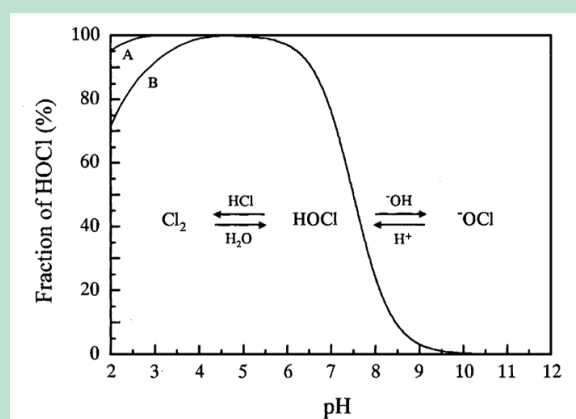
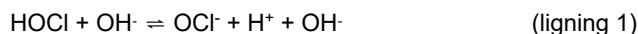
5.1.2 Valg af biocid

På de danske hospitaler vil der, efter en forudgående rengøring med detergent, typisk blive anvendt et klorfrigivende biocid enten i suspension eller i præimprægnerede klude til daglig desinfektion på isolationsstuer. Dog kan udstyr blive desinficeret med 70-85 % v/v ethanol, men på større overflader anvendes klor [4].

Et hyppigt anvendte biocid er natriumdichloroisocyanurate inkluderende detergent (NaDCC Plus) hvor brugskoncentrationen laves ud fra tabletter. Præimprægnerede klude indeholdende enten NaDCC plus eller natriumhypoklorit (NaOCl) uden detergent er dog blevet meget udbredt.

I vandig opløsning eksisterer klorin på tre former: klormolekyler (Cl_2), hypoklorsyre (HOCl) og hypoklorit (OCl^-), disse betegnes sammen som frit klor eller på engelsk "free available chlorine" (FAC) eller "free residual chlorine".

Den baktericide effekt af klorfrigivende biocider ligger primært i frigivelsen af hypoklorsyre (HOCl) og i det mindre aktive hypoklorit (OCl^-). Hypoklorsyre (HOCl) betegnes også aktivt klor og er en svag syre, som i vandig opløsning vil dissociere til $\text{OCl}^- + \text{H}^+$ afhængigt af pH (ligning 1). Klorfrigivende biocider er oxiderende og har et bredt antimikrobielt spektrum. Virkningsmekanismen er ikke fuldstændigt klarlagt, men involvere flere angrebepunkter. HOCl kan trænge over cellevæggen og membranen og aktiviteten er forbundet med hæmning af enzymaktivitet ved oxidation af sulfhydrylgrupper, samt skadelig effekt på DNA syntesen. Formentlig bliver der også dannet frie radikaler som yderligere skader cellen [5–8].



FIGUR 2. Ligevægten af hypoklorsyre (HOCl) og hypoklorit (OCl^-) i vandig opløsning som funktion af pH. Figur 1 i reference [5].

NaDCC har flere fordele over NaOCl. NaDCC er stabiliseret i en ca. 50% ligevægt mellem bundet og ubundet frit klor, hvilket betyder at der er et reservoir af HOCl , som bliver frigivet efterhånden som det frie klor bliver brugt. NaDCC bliver inaktiveret signifikant mindre af plasma

komponenter sammenlignet med NaOCl og er mindre følsom over for organisk materiale. En anden fordel er pH som er lavere, og således favoriseres det 40-80 gange mere baktericide hypoklorsyre fremfor hypoklorit. Der er vist en noget bedre aktivitet overfor vegetative bakterier under rene forhold og en signifikant bedre aktivitet under beskidte forhold sammenlignet med NaOCl. Dog er effekten overfor sporer vist lavere for NaDCC sammenlignet med NaOCl, såfremt NaOCl bliver justeret til neutral pH [6,7,9,10].

5.1.3 Vancomycin resistens og VRE

Vancomycin er et glycopeptid antibiotikum og bakterier bliver resistente ved at få tilført en række gener som er indeholdt i det såkaldte *van* operon. I bakterier, som er følsomme overfor vancomycin binder stoffet til byggestene i bakteriens cellevæg således at de ikke kan krydsbinde og væggen ikke færdigsyntetiseres. I de vancomycin resistente bakterier er cellevæggens byggestene ændret en lille smule således at vancomycin ikke kan binde sig, og cellevægssyntesen derfor godt kan finde sted. Der findes forskellige former for vancomycin resistens som relaterer sig til forskellige former for cellevægsmodifikationer, men i Danmark er det *vanA* typen, som er den mest dominerende. *VanA* giver anledning til et højt resistensniveau mens *vanB* resistens også kan forekomme og typisk giver anledning til en lidt lavere resistens [14,15].

Udover at der kan findes forskellige former for vancomycin resistens kan VREfm også underinddeles på baggrund af deres genome-sekvenser. På baggrund heraf kan man se at frem til 2017 var den dominerende sekvenstype (ST) og core-genom type (CT) ST203/CT859 med 63% af de kliniske isolater tilhørende denne undergruppe, mens fra 2018 og frem har det været ST1421/CT1134 der har været den mest forekommende type, der har udgjort 34% af isolaterne [14]. En udfordring med de sidstnævnte bakterier er, at de er såkaldt "vancomycin-variable" *E. faecium* (VVEfm). Den gruppe af bakterier har en variant af *vanA* operonet, som er muteret og derfor ikke som udgangspunkt udtrykker vancomycin resistens. Dette betyder, at når traditionelle resistensmålinger foretages er bakterierne følsomme, men hvis de udsættes for vancomycin opstår der suppressor mutationer, og disse mutationer kan gøre at bakterierne bliver resistente. Disse bakterier kræver en PCR test som genkender gener i *van* operonet for at blive detekteret [16–19]. Region Hovedstadens hospitaler udfører denne PCR som standard på *E. faecium* isolater.

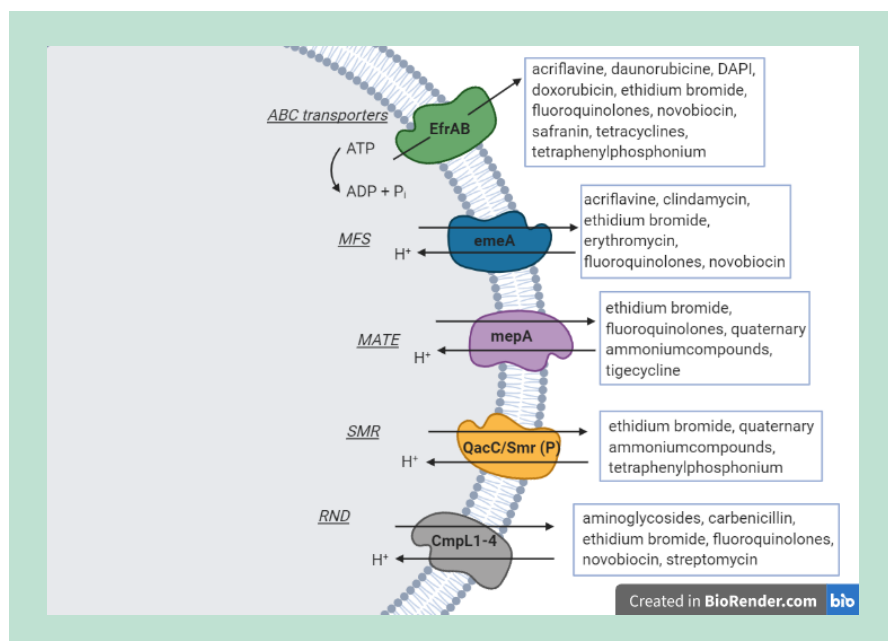
5.1.4 Biocid følsomhed

I modsætning til antibiotika anses de fleste biocider for at ramme multiple makromolekyler i bakterieceller inklusiv protein, DNA, lipider og celle membraner [11]. Dette medvirker til, at det kan være vanskeligt, at opnå egentlig resistens overfor biocider, omend der findes undtagelser, hvor f.eks. triclosan resistens kan opstå ved punktmutation i lipidsyntese gener [12], og resistens overfor kvartenære ammonium kan forekomme i celler som indeholder *qac* gener, og som derfor er bedre til at udskille denne gruppe af stoffer [13]. En anden grund til at man sjældent taler om biocid resistens er, at de biocidkoncentrationer som anvendes til desinfektion langt overstiger den baktericide koncentration, altså den koncentration der skal til for at slå bakterier ihjel. Derfor taler man om "nedsat følsomhed" eller "øget tolerance", når bakteriers evne til at blive slået ihjel af biocider påvirkes. Dette har også medført, at man i praksis har anset det for mindre væsentligt at kende niveauet af tolerance/nedsat følsomhed, eftersom sådanne ændringer ikke har været vurderet at kunne påvirke effekten af et givent desinfektionsmiddel.

I de seneste år er der dog studier der tyder på at bakterier kan udvikle tolerance over desinfektionsmidler, og at denne tolerance måske kan påvirke vores evne til at desinficere. Som et eksempel herpå undersøgt en gruppe forskere i Australien, *E. faecium* bakterier indsamlet fra hospitalerne i perioden fra 1997 frem til 2015 for deres følsomhed overfor alkohol. Generelt anvendes alkohol-baserede desinfektions midler i stor udstrækning i forbindelse med håndhygiejne, og disse produkter har typisk et indehold på 70% (v/v) af isopropyl eller ethylalkohol [14]. Analyserne viste at bakterier indsamlet efter 2010 var mere end 10 gange så tolerante overfor alkohol som de bakterier, der var isoleret før 2010. Forfatterne konkluderede at *E. faecium* er i stand

til at adaptere sig til hospitalsmiljøet og at deres tilpasning til biocider udgør en væsentlig risikofaktor i forhold til bekæmpelse af hospitalsinfektioner [14].

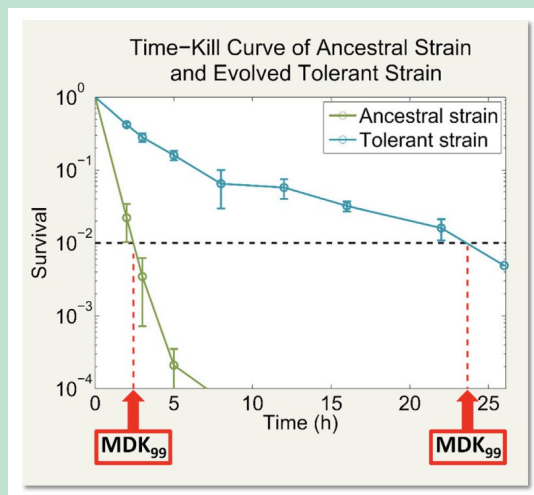
Nedsat følsomhed overfor biocider har også været mistænkt for at være forbundet med nedsat følsomhed overfor antibiotika. Bakterieceller har naturligt evnen til at udskille (eller "effluks") en lang række uønskede stoffer og samtidig kan de erhverve gener, der koder for egentlige "multidrug" efflukssystemer [15]. Eftersom de samme systemer kan håndtere mange forskellige stoffer, kan mutationer som øger effluksaktiviteten af et biocid samtidig øge aktiviteten overfor et antibiotikum, og dermed gøre cellen i stand til at overleve en antibiotikabehandling (figur 3). At der kan forekomme krydstolerance har været vist i adskillige studier såsom i analyser af *Salmonella* hvor eksponering til fire forskellige typer biocider resulterede i mutationer som øgede effluksaktiviteten, og som nedsatte følsomheden overfor en række forskellige antibiotika [16]. Disse resultater viser, at eksponering til biocider kan have en meget uheldig påvirkning på bakterier i tilfælde, hvor desinfektionen ikke er virksom.



FIGUR 3. Efflukspumper i gram-positive bakterier. De fem familier af pumper er vist: ABC-transportere, som er drives af ATP; MFS, MATE, SMR og RND, som alle drives af protoners bevægelseskraft (proton motive force). Der er vist eksempler identificerede pumper i de forskellige familier, samt hvilke substrater man ved de kan pumpe. Figur modificeret fra [17].

5.1.5 Måling af biocid følsomhed

Målinger af bakteriers resistens overfor antibakterielle stoffer i suspension har især været fokuseret på antibiotika, hvor bestemmelser af minimale inhibitoriske koncentrationer (MIC) og minimale bactericidale koncentrationer (MBC) ved eksponering i 18-22 timer har været grundlæggende. De to bestemmelser adskiller sig fra hinanden ved at man ved MIC-bestemmelserne undersøger et givent stofs evne til at forhindre vækst, mens man ved MBC er interesseret i at bestemme stoffets evne til at dræbe bakterieceller. Begge metoder kræver at der analyseres på fortyndingsrækker af bakterier i 96-brøndsplader, men især MBC-bestemmelserne er tidskrævende, da de kræver udpladninger på agarplader for at vurdere, hvorvidt bakterierne er i stand til at vokse. Derfor anvender mange studier kun MIC-bestemmelser, selvom der ikke altid er korrelation imellem MIC og MBC, som det er eksemplificeret i figur 4, hvor to bakterier har samme MIC-værdi, men dræbes meget forskelligt af et antibiotikum [18].



FIGUR 4. Her vises drabskurver ved behandling med antibiotika for to bakteriestammer med forskellige niveauer af tolerance. Den tolerante stamme blev udviklet ved at udsætte den oprindelige stamme (ancestral strain) for intermitterende behandlinger med antibiotika. Den minimale inhibitoriske koncentration efter 24 timer er den samme for de to stammer, men den tolerante stamme bliver dræbt i mindre grad og meget langsommere. Det langsommere drab kan ses ud fra tiden det tager at opnå drab af 99% af populationen (MDK₉₉). Figur 1 i referencen [18].

Brauner et al. (2017) har fremsat en ny protokol for måling af tolerance og persistens, som ikke bliver evalueret ved brug af traditionelle MIC-bestemmelser. Målet kalder de "minimum duration for killing 99%" (MDK₉₉) for en population. Kort foregår det således at parallelle populationer af 100 bakterier eksponeres i mikrotiterplader (96-brønde) for forskellige koncentrationer af antibiotika til forskellige tider. Ved observation af udfaldet, om der er nogle overlevne bakterier eller ej efter antibiotikaet er blevet vasket væk (vækst/ikke-vækst), kan det aflæses eller beregnes, hvor lang tid det tager at eliminere de 100 bakterier, og denne værdi er MDK₉₉ (figur 4). En anden traditionel måde at måle drab på er ved drabskurver (kill-curve kinetics), disse er dog arbejdstunge og kan ofte kun måle udfald for én koncentration ad gangen, hvorfor MDK₉₉ metoden har mange fordele og tilmed kan automatiseres [18].

Til evaluering af biociders effektivitet overfor bakterier i suspension findes der en europæisk standard, DS/EN 13727 + A1 "Kvantitativ suspensionsprøve til evaluering af desinfektionsmidlers bakteriedræbende virkning inden for den medicinske område" [19,20]. Standarden foregår typisk ved at bakterierne eksponeres for biocidet til den koncentration og eksponeringstid anført af producenten (evt. også kortere tid), hvorefter biocidet neutraliseres og en mindre del af blandingen plades ud på agarplader, som inkuberes og herefter tælles antal overlevne bakterier som kolonier på agarpladerne. I standarden går man efter at kvantificere > 5 log reduktion af bakteriepopulationen (99,999 % drab) før et biocid betragtes som tilstrækkeligt effektivt. Denne metode har de samme ulemper som beskrevet for drabskurver ovenfor.

Derfor har vi i dette projekt kombineret de to ovenfor beskrevne metoder. Dette muliggør test af koncentrationsgradienter til forskellige kontaktider simultant, hvilket ville være en stor opgave ved brug af standardtesten alene. Samtidigt var Brauner et al.'s protokol ikke direkte overførbart, da praksisrelevante eksponeringstider for biocider er meget kortere end ved antibiotika behandling [31].

Til vurdering af præimprægnerede klude, eller klude dyppet i biocid, findes en standard (4-field test) DS/EN 16615:2015 "Kemiske desinfektionsmidler og antiseptika - Kvantitativ prøvningsmetode til evaluering af bakterie- og svampedræbende virkning på ikke-porøse overflader med

mekanisk behandling ved brug af servietter inden for det medicinske område". Metoden bygger på vigtige principper, som standardisering af prøvetagningsareal, standardiseret tryk ved over-tørring af overfladen og ens tid til svabring af overflader, samt mange af de samme krav som fundet i standarden for suspensionstest DS/EN 13727 + A1. Denne standard har dannet grund-lag for de eksperimentelle forsøg som er kommunikeret i nærværende rapport.

5.2 Formål og hypoteser

Den øgede forekomst af hospitalserhvervede infektioner med vancomycin resistente og variable *Enterococcus faecium* (VREfm og VVEfm) er bekymrende. Tiltagene for at bremse transmissi-onen af smitte mellem patienter (isolering af patienter med infektion, samt smitteopsporing og, så vidt muligt, isolering af identificerede raske smittebærere, personalets brug af værnemidler og øget frekvens af rengøring og desinfektion ved udbrud), kan i mange tilfælde bremse og stoppe udbrud, men dette tager kortere eller længere tid. Udbrudskloner når at smitte flere pa-tienter, hvilket tydeliggøre at transmission foregår, og visse kloner er overrepræsenterede på tværs af hospitaler og regioner.

Smitte fra patient til patient kan foregå via en række forskellig transmissionsveje. I dette projekt har vi valgt at fokusere på effektiviteten af desinfektion og overfladedesinfektion overfor VREfm, samt *E. faecium*'s evne til at udskille et skadeligt stof over cellevæggen.

5.2.1 Projektets overordnede hypoteser

- 1) At hospitalsassocierede VREfm's og VVEfm's nedsatte følsomhed overfor biocidet an-vendt til desinfektion er en medvirkende årsag til den øgede forekomst af disse infek-tioner og udfordringerne med at bremse udbrud.
- 2) At udbrudsklonernes succes skyldes høj tolerance overfor biocidet og således mulig-hed for overlevelse i miljøet i længere tid, hvilket øger risikoen for gentagne udbrud med samme klon.
- 3) At korte eksponeringstider, særligt ved brugen af præimprægnerede klorklude, giver anledning til inadækvat desinfektion, som kan være en årsag til øget overlevelse i hos-pitalsmiljøet og derfor øget spredning.
- 4) At de hospitalsassocierede VREfm's og VVEfm's har øget evne til at udskille skadelige stoffer og cellevæggen, og således potentielt tåler de antimikrobielle stoffer de bliver udsat for bedre sammenlignet med samfundsassocierede *E. faecium*.

5.2.2 Formål

Hovedformålet var at undersøge om en nedsat følsomhed overfor klorfrigivende biocider kunne være en forklarende faktor bag den øgede forekomst af VREfm og VVEfm infektioner og om udbrudsklonerne havde særlig høj tolerance og således potentielt en fordel i hospitalsmiljøet. Desuden ville vi undersøge om nogle VRE stammer var bedre til at udskille skadelige stoffer over deres cellemembran end andre og dermed udviste øget effluksaktivitet. Dette blev belyst gennem følgende delformål:

- 1) Udvikling af en dosis-respons screeningsmetode til karakterisering af biocidfølsomhed hvormed en udvalgt samling af 58 danske *E. faecium* isolaters kunne evalueres overfor praksisrelevante koncentrationer af det klorfrigivende biocid NaDCC.
- 2) Sammenligning af *E. faecium* isolaternes følsomhed ift. deres forskellige genetiske baggrunde for at anskueliggøre om der er fænotypiske tegn på adaptation.
- 3) Foretage tids-dosis-respons forsøg for at undersøge hvorledes drabseffekten af bioci-det bliver påvirket af biocideksponeringstiden, samt inkuberingstiden for bakterierne efter endt eksponering.
- 4) Overlevelse af VREfm på en overflade, samt overlevelse efter overtørring med præim-prægnerede klorklude blev foretaget for at vurdere desinfektionseffektivitet.

- 5) Undersøgelser af *E. faecium*'s evne til at udskille et skadeligt stof, for at anskueliggøre om dette kan være en årsag til øget overlevelsesmuligheder især med henblik på erhvervede effluxgener knyttet eller ikke knyttet til vancomycin resistens.

5.3 Valg af bakterieisolater

Totalt blev 58 danske *E. faecium* isolater og én *E. faecium* type stamme (ATCC 19434) udvalgt. Af disse var 40 isolater hospitalsassocierede, mens 18 var samfundsassocierede (bilag 1).

De hospitalsassocierede kliniske isolater og screeningsprøver er udtaget fra patienter på danske hospitaler (2015-2019). Der blev primært udvalgt isolater fra urinvejsinfektioner, for at give en bedre sammenlignelighed. Ved udvælgelsen blev der lagt vægt på at have flere isolater af en dominant VREfm og VVEfm udbrudsklon, samt VREfm isolater ikke associeret med udbrud, og VSEfm isolater samlet fra hospitaliserede patienter.

De 18 var samfundsassocierede isolater bestod af VSEfm humane isolater fundet i kliniske prøver fra ikke-hospitaliserede patienter i 2013 og VSEfm isolater fra dyr (2007-2016).

5.4 Valg af biocider

NaDCC Plus (ActiChlor Plus) undersøgt i denne rapport er tilsat adipinsyre og natriumbicarbonat og har således buffer kapacitet, som sænker pH i brugsopløsningen til pH 5,5 – 6,5 og holder denne mere stabil, hvilket bevirker at størstedelen af det frie klor vil være aktivt klor på HOCl formen. Desuden indeholder tabletterne detergent [21].

Af sikkerhedsdatabladet for de præimprægnede klorklude fremgår det at de indeholder NaOCl med pH 8,5-9,5 og en koncentration af aktivt klor (HOCl) på minimum 1000 ppm (1000 – 7500 ppm) [22].

Studier hvor større stammesamlinger af *E. faecium* er undersøgt for deres følsomhed overfor klorfrigivende biocider, er os bekendt, ikke foretaget, derfor var det relevant at undersøge effektiviteten over for en bredere stammesamling af danske *E. faecium* isolater.

6. Materialer og metoder

6.1 Stammesamling

Totalt blev 58 danske *E. faecium* isolater og én *E. faecium* type stamme (ATCC 19434) udvalgt. Af disse var 40 isolater hospitalsassocierede, mens 18 var samfundsassocierede (bilag 1).

De hospitalsassocierede kliniske isolater og screeningsprøver er udtaget fra patienter på danske hospitaler (2015-2019), alle helgenomsekventeret. Isolaterne var primært fra urinvejsinfektioner. Isolaterne blev udvalgt, så de bestod af:

- a) VRE udbrudsklon: 10 VREfm (ST203/CT859/CT1051/CT1507)
- b) VVE udbrudsklon: 5 VVEfm (ST1421/CT1134)
- c) Ikke-udbrudskloner: 10 VREfm med ST/CT typer som sjældnere er blevet isoleret, som er sekventeret i forbindelse med et tidligere studie [23]
- d) Vancomycin følsomme isolater: 15 hospitalsassocierede VSEfm isolater af forskellige ST/CT typer samlet fra hospitaliserede patienter, hvoraf 5 var kliniske prøver, mens 10 var fra rektalsvaber selekteret med medie som indeholdt cefoxitin 3.5 mg/L og aztreonam 20 mg/L.

De 18 var samfundsassocierede isolater bestod af:

- e) Humane vancomycin følsomme isolater: 5 VSEfm humane isolater fundet i kliniske prøver fra ikke-hospitaliserede patienter (≤ 30 dage) in 2013, følsomme for ampicillin og vancomycin og genetisk adskilt fra kliniske VREfm (≥ 5000 enkeltnukleotidpolymorfi (SNPs)), inkluderet i denne gruppe var type stammen ATCC 19434.
- f) Vancomycin følsomme isolater fra dyr: 13 VSEfm isolater fra dyr (2007-2016), hvoraf 7 var kliniske isolater og 6 var fekalprøver fra raske hunde [24,25].

Alle isolater er opbevaret i 15% glycerol ved -80°C . Inden forsøg bliver de strøget op på "brain and heart infusion" (BHI) agar (Oxoid) med 5% kalveblod og inkuberet ved 37°C over natten (ON).

6.2 Suspensionstest

6.2.1 Forberedelse af biocid, kemikalier og neutralisering

Defineret hårdt vand (HV) blev fremstillet som beskrevet i dansk/europæiske standard DS/EN 13727 [19] og bestod af destilleret vand, 1.2 mM MgCl_2 (Sigma-Aldrich), 2.5 mM CaCl_2 (Merck), and 3.3 mM NaHCO_3 (Merck), justeret til $\text{pH } 7.0 \pm 0.2$.

Ved hvert forsøg blev NaDCC Plus lavet friskt, ved at opløse en NaDCC Plus tablet af 1.7 g (ActiChlor™ Plus, Ecolab, Danmark) [21] i 100 ml HV. NaDCC Plus suspensionen vil efterfølgende blive betegnet frit klor med den engelske forkortelse "free available chlorine" (FAC) Plus (plus detergent) i millionte dele (ppm). NaDCC CAS.nr. 2893-78-9.

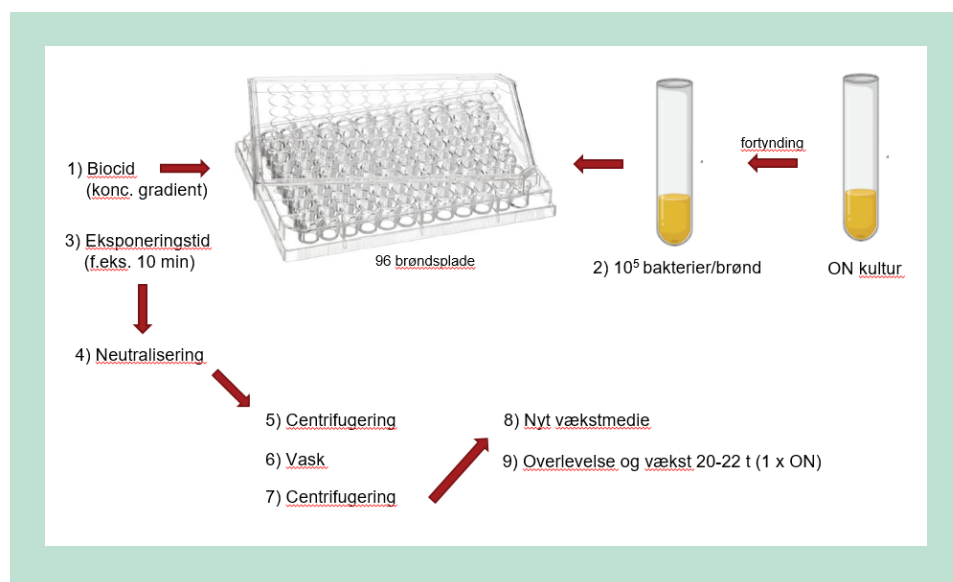
I testpladerne, som var 96-brøndsplader (TPP® tissue culture plates, Sigma), blev FAC Plus yderligere fortyndet i HV til slutkoncentrationer fra 1000 ppm til 50 ppm FAC Plus (0.1 – 0.005%) i screeningsforsøgene og fra 1400 ppm til 200 ppm i tids-dosis-respons forsøgene. Den biocid neutraliseringsblanding (Nb) var sammensat som tidligere beskrevet [14,19] og bestod af autoklaveret 0.25 M KH_2PO_4 (Sigma-Aldrich) buffer ($\text{pH } 7.2 \pm 0.2$) tilsat 60 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (Merck), 12.5 mM sojabønne lecithin (Carl Roth GmbH) og 15% Tween 80 (Sigma-Aldrich) som et 2-fold koncentrat klar til at mixe 1:1 med biocid for at neutralisere efter endt eksponering.

6.2.2 Bakteriesuspension

Bakteriesuspensionen for hver enkelt isolate blev forberedt ud fra overnatskulturer (ON) inkuberet ved 37°C og 180 rpm ryst i BHI bouillon. Disse blev fortyndet ned, således at bakteriekoncentration var ca. 1.5×10^5 (± 0.4 log) kolonier per brønd. Bakteriesuspensionen blev holdt på is ind til eksponering, for at bevare bakterierne metaboliske stadium, som bekræftet tidligere [18].

6.2.3 Forsøgsopsætning - biocidfølsomhed

En forsøgsopsætning blev udviklet som en kombination af principperne fra standarden DS/EN 13727 + A1 "Kvantitativ suspensionsprøve til evaluering af desinfektionsmidlers bakteriedræbende virkning inden for den medicinske område" [19,20] og en tidligere beskrevet high-throughput metode til evaluering af bakteriers tolerance overfor antibiotika [18]. Forsøgene blev foretaget i 96-brøndsplader, hvor hvert isolat havde én række med en biocidkoncentrationsgradient og total volumen på 100 µl. Eksponeringstiden var 10 min, 5 min eller 3 min (± 3 sek). Biocidet blev neutraliseret med 100 µl biocid neutraliserende blanding per brønd. Pladen blev centrifugeret ved 3700 rpm i 5 min ved 22 °C. Supernatanterne fjernet og bakterierne i bunden genoplslæmmet i 200 µl fysiologisk saltvand. Centrifugeringen blev gentaget, supernatanterne fjernet og 100 µl nyt BHI bouillon tilsat. Pladerne blev inkuberet ved 37°C ON (20-22 timer) og ved senere forsøg yderligere 22 timer (2 x ON). Se figur 5.



FIGUR 5. Undersøgelse af biocidfølsomhed – basisforsøgsopstilling. Se tekst for detaljer.

6.2.3.1 Screeningsforsøg

Screeningen blev foretaget på hele stammesamlingen med en fast kontakttid på 10 min og hvert isolate blev undersøgt i biologisk singletter eller duplikater, for duplikater blev et gennemsnit beregnet. Slutkoncentrationerne af FAC Plus var fra 1000 ppm til 50 ppm (0.1 – 0.005%). Udfaldet var binært og blev registreret som vækst eller ikke-vækst i hver brønd. Vækst indikerede overlevelse og opformering af mindst én af de ca. 10^5 *E. faecium* tilsat. Ét isolate (VRE 2961) blev inkluderet i alle forsøg på alle plader som en intern kontrol. De øvrige kontroller bestod af: a) en positiv kontrol per isolate uden biocid, b) en valideringskontrol af neutraliseringen, hvor neutraliseringsblandingen (Nb) var tilsat biocidet inden bakterien bliver tilsat, c) negative kontroller (HV med BHI; BHI alene; HV alene; Nb alene). Opsætningen af en plade kan ses i figur 5 og repræsentative resultater i figur 6.

6.2.3.2 Tidsdosisrespons

Tids-dosis-respons havde eksponeringstider på 3 min, 5 min og 10 min og blev foretaget på et mindre udvalg af isolaterne. I alt 5 udbrudskloner, hvoraf 3 var VREfm (Strain ID: 1798, 2961,

3473) og 2 VVEfm (Strain ID: 3171, 3978), samt én ATCC 19434 typestammen. Slutkoncentrationerne af FAC Plus var fra 1400 ppm til 200 ppm (0.14 – 0.02%). Der blev undersøgt for vækst/ikke-vækst efter både 1xON og 2xON. Der blev foretaget tekniske duplikater og biologiske tripplikater for hver isolat. VRE 2961 var inkluderet med 10 min eksponeringstid, som intern kontrol, hvor udfaldet skulle ligge på 400 ppm ($\pm$ 100 ppm). Opsætningen af en plade, samt repræsentative resultater kan ses i figur 8.

6.2.4 Statistik

Data blev analyseret vha. binær logistisk regression med den kategoriske afhængige variable værende vækst/ikke-vækst og de uafhængige variable værende: FAC koncentration, hospitalsassocierede isolater, humane isolater, VRE/VVE isolater, VRE udbrud, VVE udbrud. Den generaliseret estimationsligning (GEE) blev integreret i analysen for at justere for de afhængige målinger af den samme isolat i samme forsøg, men under påvirkning af forskellige koncentrationer. Disse observationer er ikke komplet uafhængige og skal derfor korrigeres i modellen. Statistik software Rstudio blev anvendt med "geepack" og "geeglm" funktionen [26,27]. For at sammenligne de sammenlignende uafhængige variables indvirkning på FAC koncentrationen, og således analysere for forskelle i følsomhed, blev en Tukey's multiple comparison test foretaget i softwaren GraphPad Prism 9.0. $P < 0,05$ blev betragtet som signifikant forskel.

6.3 Test af overlevelse på overflade

VREfm spredning i hospitalsmiljøet involverer overlevelse på overflader og medicinsk udstyr, som ikke er engangsudstyr. Her undersøgte vi overlevelsen på en lamineret overflade, samt evaluerede effektiviteten af svabering og sammenholdt vores resultater med resultaterne fra BactoBox® (SBT instruments), som kan måle totalt antal intakte celler. BactoBox® teknologien baseres på flowimpedanscytometri, hvor væsken der ønskes undersøgt ledes over en flowcelle, som med et sæt af mikroelektroder, med samme størrelse som bakterier. Mikroelektroderne detekterer bakterierne når de sammen med væsken strømmer forbi. Fordelen er måling af enkelt celler uden behov for dyrkning (intakte celler/ml), hvilket dels er hurtigt, dels en fordel, hvis man vil måle på stressede bakterier, som kan være svære at få til at gro på medier. BactoBox® kan diskriminere mellem andre typer partikler og døde bakterier, så kun intakte bakterieceller måles. Tanken med at inkludere BactoBox® var et ønske om at estimere den generelle rengøring- og desinfektionseffektivitet ved undersøgelse af overflader ude på hospitalerne i efterfølgende projekter.

Den interne kontrol stamme VRE2961 blev udvalgt til disse forsøg. På tørsteriliserede laminatplader blev områder af 25 cm² markeret. ON kultur blev fortyndet 100-fold og spredt på 25 cm² områder med 50 µl per område. I en 24-brøds bakke (TPP® tissue culture plates, Sigma) blev 50 µl deponeret i brøde. Inokulum blev efterladt til at tørre på overfladerne. Den initiale inokulumstørrelse blev undersøgt ved udpladning af passende fortyndinger på BHI agar plader. Det gennemsnitlige inokulum var $\sim 10^5$ CFU per testareal (25 cm²).

Der blev udtaget prøver efter 3, 24 og 48 timer og 8 og 27 dage. Overfladen blev svabret 1 min ($\pm$ 10 sek.) med en fugtig skumsvaber (TX761 swab, IW Biomedical Tech) og opslæmmet i 1,5 ml transportmedie (sterilt 0,45% saltvand) og vortexet i 2 min. Passende fortynder blev dyrket på BHI agar plader for bestemmelse af total antal CFU som blevet fundet overlevne og dyrkningsbare fra overfladen. Fra transportmediet blev 300 µl fortyndet i 2,7 ml sterilt vand (MilliQ, VWR) og målt på BactoBox®, som gav antal intakte celler/ml.

Til brønden blev der tilsat 1,5 ml transportmedie og mixet grundigt. CFU blev estimeret på lignende vis på BHI agar og vha. BactoBox®.

BHI agar plader blev talt efter 44-48 timers inkubering ved 37°C.

Tidspunkterne 3, 24 og 48 timer blev foretaget i tekniske og biologiske duplikater, 8 og 27 dage kun i tekniske duplikater.

Overfladen blev svabret først med fugtig svaber og herefter med tørsvaber og begge opslæmmet i transportmedie. Et tidligere studie har vist at svabring af overfladen med to svabere øger sensitiviteten [28], hvorfor vi ønskede at undersøge om det ville være tilfældet.

6.4 Test af præimprægneret klude til overfladedesinfektion

Præimprægnerede desinfektionsklude bliver i stigende grad anvendt på hospitalerne. Vi ønskede at vurdere effektiviteten af de klorklude som bliver anvendt i praksis.

Den interne kontrol isolat VRE2961, samt VVEfm isolat 3978 blev udvalgt. Metoden anvendt tog udgangspunkt i standarden EN 16615:2015 med modifikationer. På tørsteriliserede laminatplader blev områder af 25 cm² markeret. Kolonier fra BHI plader blev opslæmmet i fysiologisk saltvand til en optisk densitet på 1,0 (OD 600 nm). Inokulum blev blandet 9:1 med bovin serum albumin til en koncentration af 3 g/l, hvilket simulerer beskidte forhold. Inokulum blev spredt på 2 x 25 cm² testfelter med 50 ul per areal. Ét positiv kontrol område per stamme blev inokuleret. I en 24-brøndsplade (TPP® tissue culture plates, Sigma) blev 50 ul deponeret i brønde som kontrol. Den initiale inokulumstørrelse blev målt.

Efter 24 timer blev overfladen desinficeret med en klorklud med aktivstoffet NaOCl med pH 8,5-9,5 og en koncentration af aktivt klor (HOCl) på minimum 1000 ppm (1000 – 7500 ppm), CAS nr. 7681-52-9 (WipeClean Chlorine Disinfection, small, Plum, Danmark) [22]. Denne blev trukket én gang frem og tilbage påført en uniform vægt på 1,5 kg. Efter 2 min kontakttid blev de inokulerede overflader svabret med fugtig svaber og overført til 1,5 ml transportmedie inklusiv natrium thiosulfate i slutkoncentration på 5 g/l (Merck) til neutralisering. Herfra blev 200 ul spredt på BHI agar. Fra transportmediet blev 300 ul fortyndet i 2,7 ml sterilt vand (MilliQ, VWR) og målt på BactoBox®. Den positive kontrol, som ikke var desinficeret blev prøvetaget på lignende vis.

Til kontrolbrønden blev der tilsat 1,5 ml transportmedie og mixet grundigt. CFU blev estimeret på lignende vis på BHI agar og vha. BactoBox®.

Til den resterende mængde transportmedie inkl. svaber blev der tilsat 1:1 to gange koncentreret selektivt BHI vækstmedie tilsat vancomycin og aztreonam for VREfm og cefoxitin og aztreonam for VVEfm. Inkuberet i 48 timer ved 37°C, hvis positiv blev medie strøget ud på BHI blodagar, samt på selektiv VRE agar (chromid® VRE, Biomerieux).

Forsøget blev udført i tekniske duplikater. Forud gik en række pilotforsøg (data ikke vist).

6.5 Effluksaktivitet

*E. faecium*s evne til at overleve i miljøet kan blandt andet være påvirket af evnen til at skille sig af med skadelige substrater ved hjælp af efflukspumper som sidder i cellemembranen. I disse forsøg blev det undersøgt, om der var forskelle på de forskellige isolaters evne til at udskille substartet ethidium bromid (EthBr), som et udtryk for effluksaktivitet.

6.5.1 Akkumuleringsforsøg – screening

Screeningen blev foretaget på hele stammesamlingen. ON kulturer blev fortyndet til optisk densitet 0,07 (OD 600nm). Seriefortyndet (10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵) for at få enkelt kolonier og 10 ul per fortynding blev inokuleret på BHI agar indeholdende 2 mg/l ethidium bromid (EthBr) og på kontrolplader (0 mg/l EthBr) og inkuberet ON ved 37°C. På alle plader blev en stamme med lav effluksaktivitet inkluderet som en positiv kontrol (ID: VS5). Bakterier der har akkumuleret EthBr vil fluorescere ved eksitation i UV området. Fluorescensen blev aflæst i en scanner (ChemIDoc XSR+, Biorad). Billederne blev efterfølgende analyseret i et program, som blev trænet til at genkende enkelt bakteriekolonier og måle koloniernes fluorescensintensitet (ZenBlue, Zeiss). Agarpladerne blev holdt mørkt både før og efter inkubering for at modvirke blegning af EthBr. Screeningen blev foretaget én gang.

6.5.2 Efflukshæmning og aktivt effluks

Isolaterne inkluderet i dette studie var udvalgt ud fra data fra foregående studie. Der blev valgt lav-effluks stammer (ID: VS5; V2683; V2815) og høj-effluks stammer (VRE2583; VRE3190; VRE3234; VRE3336).

ON kulturer blev centrifugeret ned ved 5000 g, 10 min og bakterie pelletet vasket i 5 ml 80 mM HEPES buffer og processen gentaget to gange mere, hvorefter bakterierne blev genopslæmmet i 10 ml HEPES buffer.

En blanding af efflukspumpe hæmmeren CCCP (40 μ M), EthBr (5 μ M), HEPES buffer og bakterier blev lavet til et total volumen på 1 ml i eppendorf rør. Positive kontroller var bakterier i HEPES buffer uden EthBr og uden CCCP. Alle rør blev inkuberet 1 time ved 37 °C. Herefter blev bakterierne centrifugeret ned og vasket tre gange med 1 ml HEPES buffer med EthBr (5 μ M) og til slut genopslæmmet i 1 ml af samme blanding. Dette blev fordelt ud i 96 brønds mikrotiterplader med 184 μ l/brønd i tekniske triplikater og tilsat 16 μ l 2 x koncentreret BHI bouillon. Negative kontroller: EthBr plus CCCP i HEPES; EthBr i HEPES; CCCP i HEPES; kun HEPES. Pladen blev placeret i en Fluorescence Microplate Reader, som aflæser optisk densitet og fluorescens (BioTek Instruments) og inkuberer ved 37 °C. Målinger blev foretaget hver 10 min i 6 timer. Eksitations-bølgelængden sat til 500 nm og emission til 590 nm.

7. Resultater

7.1 Biocid følsomhed

Hovedformålet var at undersøge om en nedsat følsomhed overfor klorfrigivende biocider kunne være en forklarende faktor for den øgede forekomst af VREfm og VVEfm infektioner og om udbrudsklonerne havde særlig høj tolerance og således potentielt en fordel i hospitalsmiljøet. Hertil blev udviklet en metode hvor bakteriernes respons til en forskellige koncentrationer af biocid. Efter endt eksponering blev biocidet neutraliseret og fjernet, hvorefter bakterierne fik tilført friskt vækstmedie. Efter inkubering i ét døgn blev hver enkelt brønd aflæst for vækst eller Ikke-vækst. En skematisk oversigt over forsøgsopstillingen ses i figur 5, sektion 6.2.3.

7.1.1 Screening

Bestemmelsen af *E. faecium*s følsomhed overfor klorfrigivende biocider blev foretaget ved at screene 59 *E. faecium* isolater inkl. typestammen ATCC 19343. I 96-brøndsplader blev inokulum af ensartet størrelse ($\sim 10^5$ CFU/brønd = $\sim 10^6$ CFU/ml biocid) eksponeret i 10 min for en koncentrationsgradient af aktivt klor frigivet fra NaDCC Plus, hvorefter biocidet blev neutraliseret. Efter en vaskeprocedure blev der tilsat nyt vækstmedie til brøndene og pladerne blev inkuberet for at give overlevne bakterier mulighed for at vokse op som beskrevet i metodeafsnit 6.2.3 og illustreret i figur 5. Resultaterne havde et binært udfald med enten vækst eller ikke-vækst i hver brønd, som fremgår af figur 6, der viser opsætningen af en plade, samt repræsentative resultater.

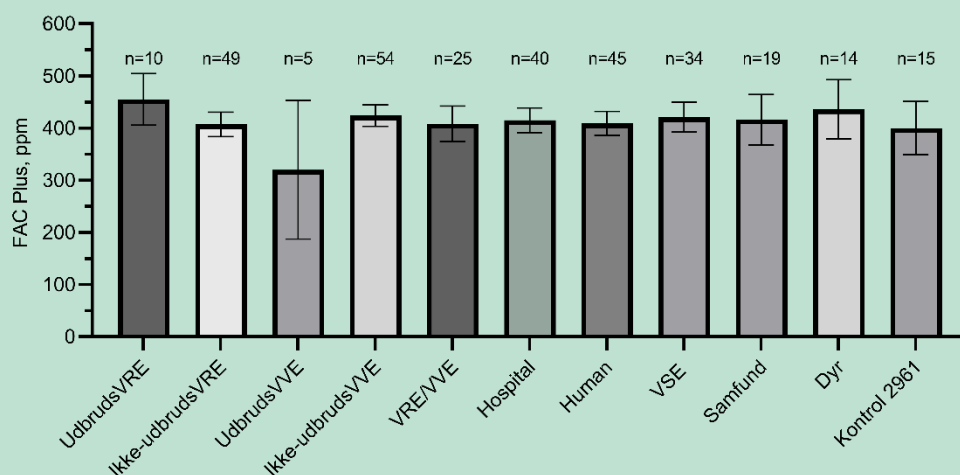
PPM/ Min	1000+Nb	1000	800	700	600	500	400	300	200	100	50	PC
10												
10												
10												
10												
10												
10												
Kontrol												
NC	1000+Nb +BHI	1000+ BHI	50+ BHI	HV+ BHI	HV+ BHI	BHI	BHI	BHI	BHI	BHI	HV	Nb

FIGUR 6. Opsætningen af 96-brøndsplade for screening og repræsentative resultater for seks isolater (3 hospitals-associerede VRE'er og 3 hospitals-associerede VSE'er). Grøn indikerer overlevelse og vækst efter 10 min eksponering, neutralisering og inkubering over natten. Hvid indikerer ingen vækst/drab af inokulum ($\sim 10^5$ CFU/brønd). PPM = koncentration af aktivt klor i millionte dele, første række. Minutter = eksponeringstid. Kontrol = internt kontrol isolat VRE2961. NC = negative kontroller. PC = positive kontroller. 1000+Nb = neutraliseringsblanding tilsat biocidet før inokulering med bakterier (validering). HV = hårdt vand. BHI = vækstmedie, brain hearth infusion boullion. Nb = neutraliseringsblanding.

For at kunne analysere på følsomheden overfor NaDCC Plus blev den subinhibitorisk baktericide biocidkoncentration (sub-BBC) aflæst for hvert isolat som den højeste koncentration, hvor der stadig var bakterier der havde overlevet og groet op. Den estimerede baktericide biocid koncentration (est.-BBC), som beskriver den koncentration der førte til eliminering af inokulum, var generelt 100 ppm højere, da koncentrationerne undersøgt var diskret numeriske med 100 ppm intervaller i størstedelen af tilfældene (figur 6). Den sande BBC vil ligge et sted mellem sub-BBC og est.-BBC.

Den gennemsnitlige sub-BBC som resulterede i overlevelse og vækst for de 59 *E. faecium* isolater undersøgt var 415 ppm (SD $\pm$ 78 ppm).

Isolaterne blev inddelt i forskellige grupper for at adressere hypotesen om, at visse genetiske baggrunde eller miljøer gav anledning til forskelle i følsomhed. Grupperne var: udbruds-VRE (ST203/CT859; ST203/CT1051; ST203/CT1507); ikke-udbruds VRE (alle andre isolater); udbruds-VVE (ST1421/CT1134); ikke-udbruds VVE (alle andre isolater); VRE/VVE hospitals-associerede isolater; alle hospitals-associerede isolater (VRE/VVE/VSE); alle human isolater; alle samfunds-associerede isolater og alle dyreisolater (figur 3). Ét VREfm isolat (VRE2961) blev inkluderet i alle pladerne som en intern kontrol, for at give et mål for variationen imellem forsøg. Den gennemsnitlige sub-BBC for grupperne varierede mellem 320-455 ppm med højeste og laveste standardafvigelse på henholdsvis 107 og 69 ppm. Udbruds-VVE havde den højeste standardafvigelse (SD 107 ppm) sammenlignet med de øvrige grupper, hvilket skyldes to VVEfm (3384 og 4045) med lav tolerance (gennemsnitlig sub-BBC på 250 ppm), som gav en øget spredning i denne gruppe (figur 7).



FIGUR 7. Gennemsnitlige subinhibitorisk baktericide biocid koncentration (sub-BBC) med 95% konfidensintervaller. Sub-BBC for de enkelte grupper, som viser følsomheden overfor 10 min eksponering for aktivt klor. FAC Plus (ppm) = koncentrationen af aktivt klor i millionte dele (ppm). UdbrudsVRE = VREfm ST203/CT859, CT1051, CT1507; Ikke-udbrudsVRE = alle andre isolater; UdbrudsVVE = VVEfm ST1421/CT1134; Ikke-udbrudsVVE = alle andre isolater; VRE/VVE = hospitals-associerede isolater; Hospital = alle hospitals-associerede isolater (VRE/VVE/VSE); Human = alle human isolater; Samfund = alle samfunds-associerede isolater; Dyr = alle dyreisolater; 2961 = intern kontrol stamme VRE2961

En multipel logistisk regression på data viste som forventet at koncentrationen var en stærkt signifikant negativ beskrivende variabel for sandsynligheden for vækst ($p = 3.5 \times 10^{-8}$). Odds ratio for vækst for hver gang aktivt klor steg med 1 ppm var 0,98, mens odds ratio blev reduceret til 0,15 hver gang aktiv klor koncentrationen stiger med 100 ppm, hvilket svarer til en 6,7 gange ($1/0,15$) mindre sandsynlighed for vækst hver gang koncentrationen stiger med 100 ppm (tabel 1). Udbruds-VVE var den anden signifikant negative beskrivende variabel for sandsynligheden for vækst ($p = 0,03$) med odds ratio for vækst på 0,18, så VVEfm isolater havde 5,6 gange mindre sandsynlighed for vækst sammenlignet med andre isolater. Ingen af de andre grupper/variabler, beskrevet ovenfor og i figur 6 og tabel 1, havde signifikant indflydelse på sandsynligheden for vækst, hvilket indikerer at der ikke er signifikante forskelle i følsomheden (tabel 1).

TABEL 1. Multipel logistisk regression (geeglm) koefficienter på screenings data, hvor den afhængige variabel er vækst.

Variable	Estimat (β) ^a	Std. Error	Odds Ratio	CI 95%	Wald Test	Pr (> W)	Signifikans
Intercept	8.64	2,15	5667	[84; 382659]	16,2	6E-05	***
FAC (1 ppm) ^a	-0,02	3E-03	0,98	[0,97; 0,99]	30,4	4E-08	***
FAC (100 ppm)	-1,91	3E-03	0,15	[0,15; 0,15]	30,4	4E-08	***
Hosp. assoc. ^b	1,38	0,78	3,99	[0,86; 18,55]	3,1	0,08	
Human ^c	-0,80	1,08	0,45	[0,05; 3,74]	0,6	0,46	
VRE/VVE ^d	-0,57	0,46	0,57	[0,23; 1,39]	1,5	0,22	
Udbruds VRE ^e	0,99	0,56	2,69	[0,90; 7,98]	3,2	0,08	
Udbruds VVE ^f	-1,74	0,81	0,18	[0,04; 0,86]	4,6	0,03	*

^a FAC = koncentration aktivt klor i millionte dele. ^b Hosp. assoc. = hospitalsassocierede isolater (VRE/VVE/VSE). ^c Human = isolater fra mennesker. ^d VRE/VVE = vancomycin resistente og variable isolater. ^e UdbrudsVRE = isolater med sekvens type og klonal kompleks ST 203/ CT 859/ CT1051/ CT1507. ^f UdbrudsVVE = isolater med ST1421/CT1134. ^g β-koefficienten beskriver ændringen i den afhængige variabel (vækst) for hver unit den beskrivende variabel ændres (f.eks. + 1 ppm). Er koefficienten negativ nedsætter variabelen sandsynligheden for vækst med koefficients værdi, mens en positiv koefficient viser det modsatte, hvilket også afspejles i odds ratio.

7.1.2 Kortere eksponeringstider og længere inkubering

Der blev foretaget dosis-tids-respons forsøg for at vurdere effekten af kortere biocid eksponeringstider på overlevelsen. Et udvalg af stammer blev inkluderet. Tre udbruds-VRE (Stamme ID: 1798, 2961, 3473) og to udbruds-VVE (Strain ID: 3171, 3978), samt typestammen ATCC 19434. Kontakttiderne var 3 min, 5 min og 10 min og slutkoncentrationen af aktivt klor i spændet fra 1400 – 200 ppm. Pladerne blev aflæst for vækst/ikke-vækst efter én overnatsinkubering (20-22 timer) og igen efter to overnatsinkuberinger (44-46 timer). Hvert isolat blev undersøgt i tekniske duplikater og biologisk triplikater. Den interne kontrol stamme VRE2961 blev inkluderet med 10 min kontakttid i alle pladerne for at verificere at forsøget havde et forventet udfald med sub-BBC for kontrollen på 400 ppm (± 100 ppm). Repræsentative resultater er vist i figur 8.

PPM/ Min	1000+Nb	1400	1200	1000	800	700	600	500	400	300	200	PC
10												
10												
5												
5												
3												
3												
Kontrol												
NC	1000+Nb+ BHI	1000 +BHI	50+ BHI	HV+ BHI	HV+ BHI	BHI	BHI	BHI	BHI	BHI	HV	Nb

FIGUR 8. Opsætningen af 96-brøndsplade for tids-dosis-respons og repræsentative resultater for isolat VRE1798. Grøn indikerer overlevelse og vækst efter eksponering, neutralisering og inkubering over natten. Lysegrøn indikerer vækst efter to overnatsinkuberinger. Hvid indikerer ingen vækst/drab af inoculum (~ 10⁵ CFU/brønd). PPM = koncentration af aktivt klor i millionte dele, første række. Minutter = eksponeringstid, første kolonne. Kontrol = internt kontrol isolat VRE2961. NC = negative kontroller. PC = positive kontroller. 1000+Nb = neutraliseringsblanding tilsat biocidet før inokulering med bakterier (validering). HV = hårdt vand. BHI = vækstmedie, brain hearth infusion bouillon.

En multipel logistisk regression på data viste at både koncentrationen og kontakttiden var stærkt signifikante negative beskrivende variabler for sandsynligheden for vækst, mens længere inkuberingstid havde en signifikant positiv effekt på sandsynligheden for vækst (tabel 2). Forlænget inkuberingstid øgede sandsynligheden for vækst 7,8 gange. Nedsætning af eksponeringstiden

til 3 min og øgning af inkuberingstiden resulterede i gennemsnitlige sub-BBC over den anbefalede brugskoncentration på 1000 ppm (figur 9a og b).

Sammenligningstesten af de gennemsnitlige sub-BBC's for de forskellige kontakttider og inkuberingslængder viste signifikante forskelle med p-værdier fra 0,4- <0,0001 (tabel 3). Sammenfattende kan det konkluderes at både kontakttiden og tiden tilladt til genvækst signifikant påvirker overlevelsen i positiv retning, således at højere koncentrationer af aktivt klor er nødvendige for at opnå sammen drabseffekt. Dette indikerer vigtigheden af at overholde den anbefalede brugskoncentration, samt kontakttid. Intervallerne mellem desinfektioner kan også spille en rolle for eliminering af de uønskede bakterier i hospitalsmiljøet.

TABEL 2. Multipel logistisk regression (geeglm) koefficienter på data – forskellige eksponerings- og inkuberingstider. Den afhængige variable er vækst.

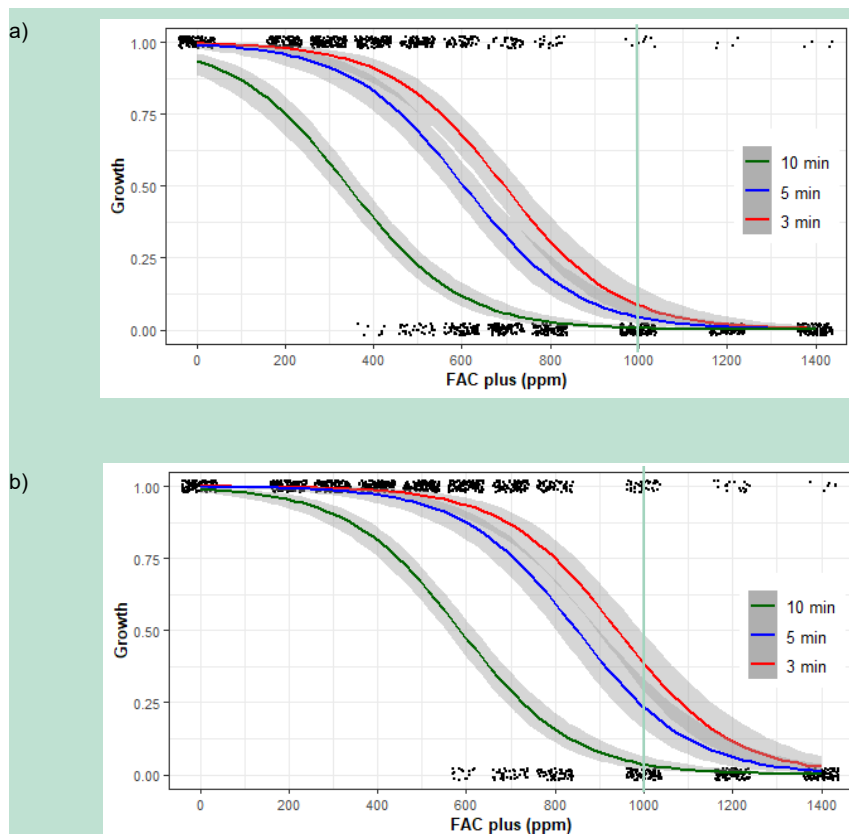
Variable	Estimat (β) ^d	Std. Error	Odds Ratio	CI 95%	Wald Test	Pr (> W)	Signifikans
Intercept	8,35	1,21	4230	[391; 45324]	47,7	6E-12	***
FAC (1 ppm) ^a	-0,008	1.3E-03	0,99	[0,99; 0,99]	45,7	1E-11	***
Eksponeringstid ^b	-0,39	0,07	0,67	[0,59; 0,77]	35,2	3E-09	***
2xON ^c	2,06	0,42	7,85	[3,41; 17,93]	23,6	1E-6	***

^a FAC = koncentration aktivt klor i millionte dele. ^b Eksponeringstid = eksponering for aktivt klor i minutter. ^c ONx2 = to gange overnatsinkubering. ^d β -koefficienten beskriver ændringen i den afhængige variabel (vækst) for hver unit den beskrivende variabel ændres (f.eks. + 1 ppm). Er koefficienten negativ nedsætter variabelens sandsynlighed for vækst med koefficientens værdi, mens en positiv koefficient viser det modsatte, hvilket også afspejles i odds ratio.

TABEL 3. Sammenligningstest på de gennemsnitlige sub-BBC for de forskellige kontakttider og inkuberingslængder.

Sammenligningstest (Tukey's multiple comparisons test)	Mean sub-BBC ^b	Mean sub-BBC ^b	P	Signifikans ^c
10 min (ON) vs. 5 min (ON) ^a	437	575	0,04	*
10 min (ON) vs. 3 min (ON)	437	739	< 1E-04	***
5 min (ON) vs. 3 min (ON)	575	739	0,01	*
10 min (2xON) vs. 5 min (2xON)	617	805	2E-03	**
10 min (2xON) vs. 3 min (2xON)	617	1058	< 1E-04	***
5 min (2xON) vs. 3 min (2xON)	805	1058	< 1E-04	***
10 min (ON) vs. 10 min (2xON)	437	617	2E-03	**
5 min (ON) vs. 5 min (2xON)	575	805	3E-04	***
3 min (ON) vs. 3 min (2xON)	739	1058	< 1E-04	***

^a Minutter = eksponering for aktivt klor i minutter (3, 5 or 10 min). ^b Gens. sub-BBC = højest gennemsnitlige koncentration der gav overlevelse og genvækst for hver respektive kontakttid efter én overnatsinkubering (ON) eller to overnatsinkuberinger (2xON) udtrykt i koncentration aktivt klor i millionte dele. ^c P < 0.05 betragtes som statistisk signifikant forskel mellem gennemsnit.



FIGUR 9. Logistisk regressionskurver for overlevelsen/væksten ved forskellige kontaktider som funktion af koncentrationen af aktivt klor i millionte dele (ppm) (FAC Plus, x akse). Kurver repræsenterer eksponeringstiderne 10, 5 og 3 min. Y-aksen viser den afhængige variable, vækst, hvor 0 er ikke-vækst og 1 er vækst. Sorte punkter er datapunkter. Regressionen forudsiger/modellerer sandsynligheden for vækst på baggrund af data. a) resultater for én overnatsinkubering b) resultater for to overnatsinkuberinger. Vertikal blågrøn linje = anbefalet brugskoncentration, 1000 ppm.

7.1.3 Effekt af bakterieantallet på biocideffektiviteten

Det blev undersøgt hvilken betydning antallet af bakterier, inokulum størrelsen, havde på effektiviteten af NaDCC Plus i et dosis-tids-respons forsøg lignende det der er vist i figur 8, men med en koncentrationsgradient fra 400 – 8000 ppm aktivt klor, samt dyrkning på BHI agar plader fra 500 ppm brøndene for kvantificering af overlevelsen. Den interne kontrolstamme VRE2961, blev udvalgt til forsøget, som blev udført i biologiske triplikater med en inokulumstørrelse på $\sim 10^7$ CFU/brønd (korresponderende til 10^8 CFU/ml biocid).

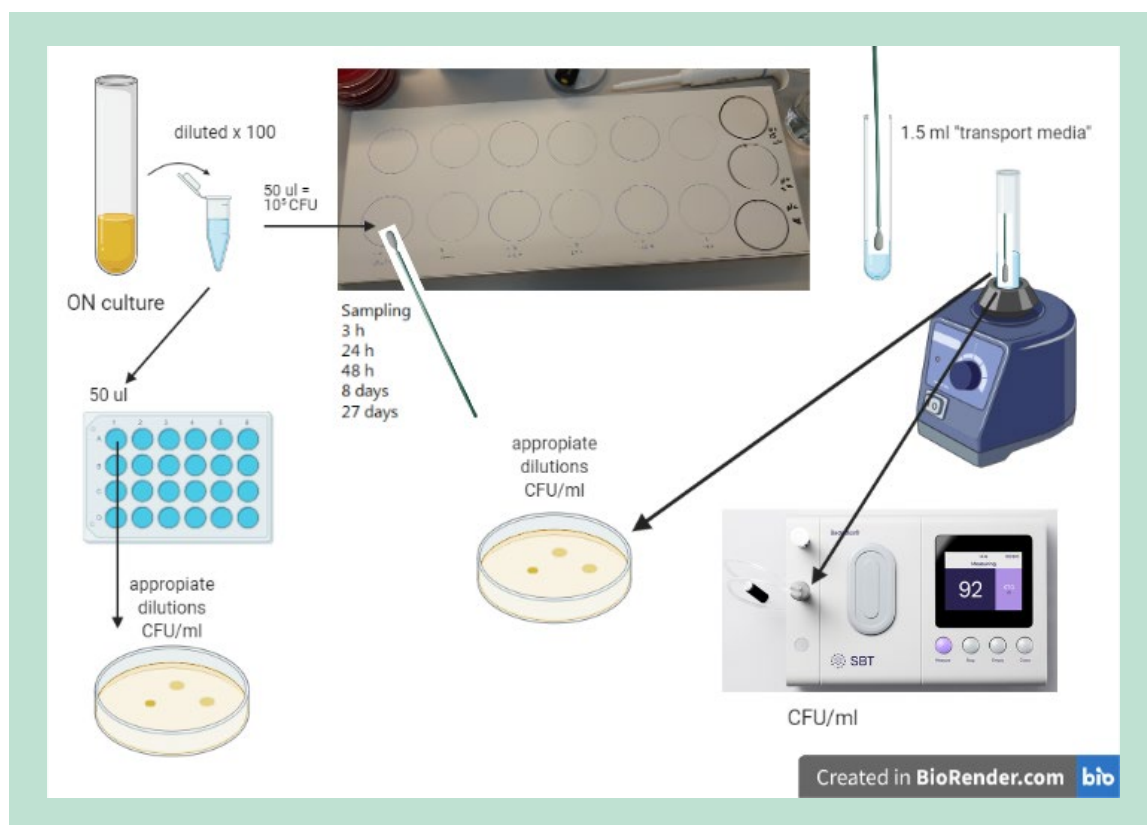
Resultaterne viste overlevelse og vækst helt op til de 8000 ppm aktivt klor for alle tre kontaktider (3, 5, 10 min), hvilket indikerer kompromitteret desinfektionseffektivitet ved denne 100 fold højere inokulumstørrelse sammenlignet med de øvrige studier gennemgået ovenfor (sektion 7.1.1 og 7.1.2). Ved udpladning af bakterierne eksponeret for brugskoncentrationen på 1000 ppm voksede der dog ikke bakterier frem, hvilket tyder på at antallet af overlevne bakterier var under detektionsgrænsen for udpladning på fast medie. Brøndene eksponeret for 500 ppm blev derfor undersøgt, og i disse blev bakterierne reduceret i størrelsesordenen 4,0 – 4,3 log reduktion for brøndene eksponeret i 5 min, mens log reduktionen kun var 2,5 – 2,6 for brøndene eksponeret i 3 min. I den europæiske standard, Standard EN 13727, skal et biocid bevirke en log reduktion på ≥ 5 log for at blive godkendt [19]. Dette forsøg viste at brugskoncentrationen formåede dette, hvis udpladning på fastmedie blev anvendt som metode, mens der synes at være overlevelse af en lille population af de initialt 10^7 CFU/brønd, som viste sig efter inkubering overnatten i

flydende medie. Forsøget viste desuden at 5 min eksponering for 500 ppm var utilstrækkeligt til at give ≥ 5 log og bekræfter, at det er vigtigt at den anbefalede brugskoncentration og kontakttid overholdes for at sikre adækvat desinfektion, især hvis der forventes et højt antal bakterier til stede.

7.2 *E. faecium* på overflader

En forudsætning for at VREfm kan overføres fra patient til patient uden direkte fysisk kontakt er at bakterien skal være i stand til at overleve i miljøet i kortere eller længere tid. Det var derfor vigtigt at undersøge, hvor længe *E. faecium* kunne overleve og genfindes fra en relevant overflade. Desuden var det ønskeligt at estimere genfindingsprocenten for vådsvabermetoden, altså hvor mange bakterier man kan forvente at kunne opsamle fra overfladerne vha. svaber. Basisopstillingen er vist i Figur 10.

Herudover blev effektiviteten af klordesinfektion på overfladen undersøgt, når denne blev kombineret med en mekanisk aftørring, som er tilfælde ved brug af de præimprægnerede klorklude.



FIGUR 10. Basisforsøgsopsætning for undersøgelse af *E. faecium* overlevelsen på overflade. Inokulum bliver spredt ud på testfelterne (25 cm²/felt), samt deponeret i en brønde i en 24-brøndsplade, som kontrol. Bakterierne tørrer ind på overfladerne. Efterfølgende prøvetages testfelterne vha. vådsvaber ved angivne tidspunkter, og undersøges på BactoBox (intakte celler/ml) og ved udpladning for traditionel kvantificering. Kontrollen (brønden) får tilført væske på samme tidspunkter og bliver undersøgt på lignende vis.

7.2.1 Udtørring på laminat

I dette forsøg blev det undersøgt om VREfm stamme (VRE2961) kunne detekteres i svaberprøver fra laminatoverflader, hvorpå der var spredt i gennemsnit 10^5 CFU per testareal (25 cm²). Resultaterne viste vækst ved alle prøvetagningstilfældene (3, 24 og 48 timer, 8 og 27 dage). Efter de 3, 24 og 38 timer var reduktionen i bakterieantallet < 1 log, mens reduktionen efter 8 dage var gennemsnitligt 1,3 log og efter de 27 dage 3 log. Der kunne således stadig findes og fremdyrkes ca. 10^2 CFU fra overflader, hvor der var spredt ca. 10^5 CFU 27 dage forinden.

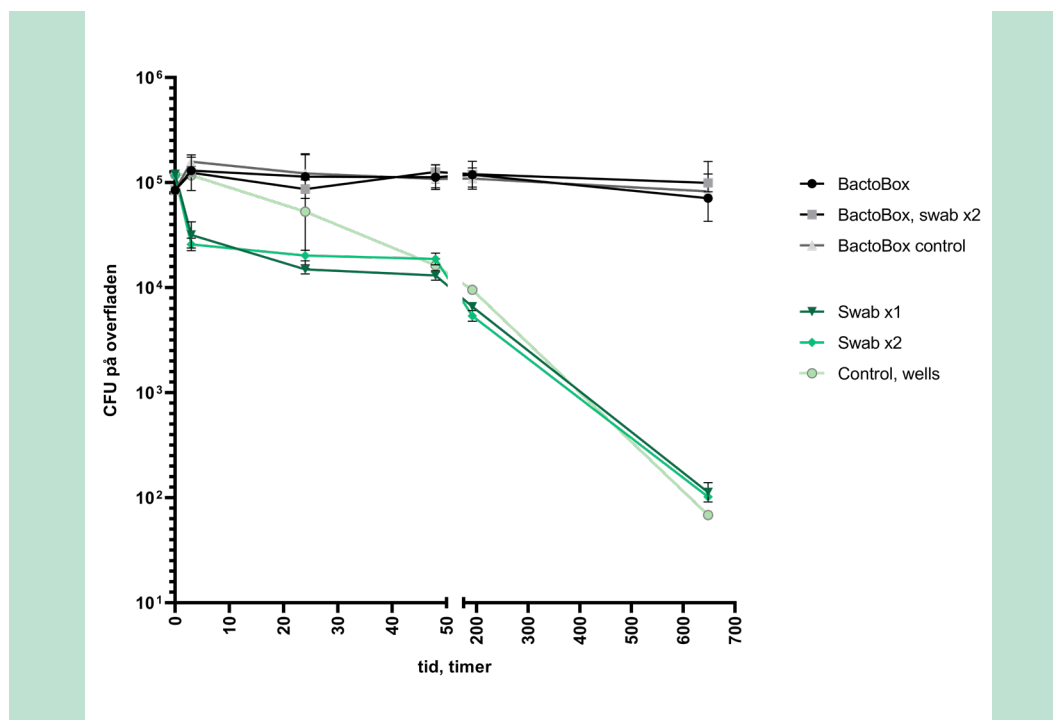
Resultaterne fra BactoBox®, hvis metode består af en flowcelle, som med et sæt af mikroelektroder kan detektere intakte bakterier, når de ledes forbi i en væske, viste initialt en lille vækst, hvorefter måleresultaterne for intakte bakterier forblev på samme niveau over de 27 dage (figur 11). En mulig forklaring kunne være at VREfm bibeholder intakt cellemembran trods udtørring, samt at en andel af bakterierne går ind i et levende, men ikke dyrkningsbart stadie "viable but non-culturable state" (VBNC), hvorfor dyrkningsresultaterne ligger ca. 1 log under antallet af bakterier med cellemembran integriteten intakt [29,30]. Det virker dog mindre sandsynligt at *E. faecium* cellemembran integriteten skulle være uanfægtet efter 27 dage. Man kunne undersøge andelen af bakterier med intakt membran f.eks. vha. farvning med propidium iodid, som passerer beskadigede cellemembraner og afgiver rødt fluorescerende signal ved emission [30]. Det er dog ikke sikkert at cellen kollapse helt trods skader i membranen, og kunne stadigvæk blive registreret som intakt af et instrument som BactoBox.

Når en overflade aftørres er det vanskeligt at få alle bakterier med på svaberen og efterfølgende få dem frigivet til væsken eller mediet man detekterer på. For at estimere hvor effektiv svaberen var i disse forsøg, blev CFU fra svaberingen sat i forhold til CFU fundet i kontrolbrøndene, hvor samme inoculum var udsat for udtørring, men kunne samles op fra brønden uden brug af svaber ved at tilsætte transportmedie direkte og måle på dette.

Genfindingsprocenten blev estimeret som:

$$\text{Genfindings\%} = (\text{CFU}_{\text{svaber}} / \text{CFU}_{\text{kontrolbrønd}}) * 100 \quad (\text{ligning 2})$$

Den gennemsnitlige genfindingsprocent når der blev anvendt én svaber var 71% (SD 28%), og for 2 svabre 75% (SD 32%).



FIGUR 11. Overlevelse af *E. faecium* (VRE2961) på laminatooverfladen som funktion af tid i timer bestemt som CFU fra dyrkning af svaberprøve. Kvantificering dels vha. Bactobox og vha. udpladning på agarplader. Swab x 2 = overfladen blev svabret med to svabre. Bactobox control og Control, wells = prøver fra kontrolbrønde med samme inoculumstørrelse, med prøvetagning uden brug af svaber.

7.2.2 Klorklude

I dette forsøg blev det undersøgt om *E. faecium* kunne genfindes på laminatoverflader efter 24 timers udtørring samt overtørring med klorklude. En VREfm (VRE2961) og en VVEfm (3978) var inkluderet. Der var i gennemsnit 2×10^7 CFU på overfladerne 24 timer efter udtørring estimeret ud fra den positive kontrol. Efter overtørring med klorkluden og 2 min kontakttid blev testområderne svabret. Resultaterne viste positiv dyrkning fra den ene af de fire VVEfm testfelter med $2,5 \times 10^2$ CFU/ 50 cm², mens de øvrige var negative. For VREfm var ingen af testfelterne positive ved dyrkning direkte fra svaberprøven. Efter berigelse med selektivt vækstmedie og overnatsinkubering blev den ene VREfm positiv og kunne efterfølgende dyrkes på VRE selektivt medie for at bekræfte at det var VREfm der var isoleret fra overfladen.

Effekten af selve den mekaniske aftørring blev undersøgt ved at overtørre testfelter med en klorklud, hvor klore blev inaktiveret og skyllet ud. Fra disse testfelter kunne der dyrkes 2×10^3 og 7×10^2 / 50 cm² af henholdsvis VREfm og VVEfm, således en log reduktion på 4,1 – 4,6. Ikke langt fra den log reduktion på > 5 log man ønsker for et biocid til overfladedesinfektion [19]. Klore bidrog til at reduktionen blev > 5 log for 4 af de 4 testfelter undersøgt.

7.3 Effluksaktivitet

*E. faecium*s evne til at overleve i miljøet kan blandt andet være påvirket af evnen til at skille sig af med skadelige substrater ved hjælp af efflukspumper som sidder i cellemembranen. I disse forsøg blev det undersøgt, om der var forskelle på de forskellige isolaters evne til at udskille substartet ethidium bromid (EthBr), som et udtryk for effluksaktivitet.

7.3.1 Effluksscreening – agar assay

Den samme samling af 59 isolater som screenet for følsomhed overfor klorfrigivende stoffer (bilag 1 og sektion 7.1.1) blev undersøgt for evnen til at udskille EthBr. Overnatskulturer blev spottet i 10 µl spots i passende fortyndinger til at få enkeltstående kolonier på BHI agarplader indeholdende 2 mg/l EthBr. Efter inkubering over natten blev pladerne fotograferet under eksponering for UV lys. EthBr er en fluorofores. Ved inkorporering og binding til DNA (eller RNA) øges fluorescensintensiteten signifikant, og derved kan der måles en signifikant forskel alt efter hvor meget af EthBr der er inde i bakterien og hvor meget der er uden for cellen. Et kraftigt fluorescenssignal vil betyde akkumulering af EthBr inde i cellen, og sandsynligvis mindre effluksaktivitet, mens et lavt signal tyder på at bakterien har pumpet EthBr ud, og således har mere effluksaktivitet. Et isolat (VS 5), som ved pilotforsøg havde vist kraftig fluorescensaktivitet og derfor lav effluksaktivitet, blev inkluderet i alle forsøg som en positivkontrol. Negativ kontrol bestod af at alle isolater også blev spottet på almindelige agarplader uden EthBr. Hver isolat blev undersøgt én gang. Fluorescensintensiteterne blev kvantificeret vha. software programmet Zen Blue.

På baggrund af disse tal kunne den gennemsnitlige fluorescensintensitet som skyldes EthBr akkumulering for hvert isolat udregnes:

$$\text{Gns. EthBr fluorescens} = (2 \text{ mg intensitet} - 0 \text{ mg intensitet}) / 2 \text{ mg intensitet} \quad (\text{ligning 3})$$

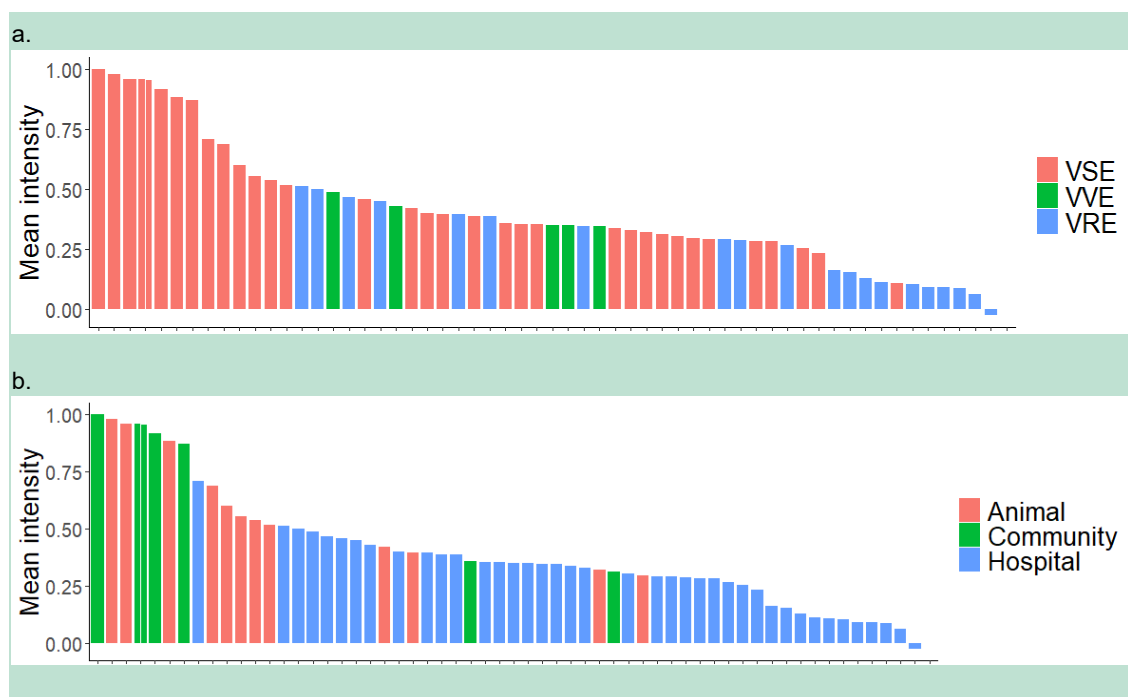
Herefter kunne EthBr fluorescens normaliseres til den positive kontrol:

$$\text{Norm. gns. EthBr fluorescens} = (\text{Gns. EthBr fluorescens}_{\text{prøve}} / \text{Gns. EthBr fluorescens}_{\text{kontrol}})$$

Denne normalisering betyder at den positive kontrol får værdien 1, mens de øvrige isolater fik værdier fra 0 til 1. Et isolat (VRE3336) havde så lav EthBr fluorescensintensitet at det endte med at komme i minus (-0,02), og i teorien var der højere autofluorescens (0 mg EthBr) end fluorescens fra EthBr akkumuleringen (2 mg EthBr). Dette er højst sandsynligt et udtryk for variationen og usikkerheden i metoden end reel negativ fluorescens (figur 12).

Ved at markere de forskellige isolater i forhold til deres vancomycin resistensprofil blev det synligt at den højeste EthBr fluorescens for VREfm isolaterne (n = 20) var 0,5 og at 10 af isolaterne havde intensiteter under 0,2. VVEfm isolaterne lå midt i ($0,5 > \text{EthBr fluorescens} > 0,3$). For VSEfm (n = 33) havde 13 af isolaterne EthBr fluorescens $> 0,5$ og kun ét isolat havde $< 0,2$ (figure 12a).

Ved i stedet at markere bakterierne efter hvor de var isolateret, viste resultaterne, at 2/3 dele afsamfunds- og dyreisolaterne havde EthBr fluorescens $> 0,5$ (12 ud af 18), og ingen havde under 0,3. Mens de hospitalsassocierede isolater (n = 40) havde EthBr fluorescens fra 0,5 og nedefter, på nær et enkelt isolat (VSE 2815 med 0,7) (figur 12b). Sammenfattende kan det siges at de hospitalsassocierede isolater synes at have en højere evne til at udskille EthBr (lavere fluorescens) og af disse er VREfm mest effektive til udskilles, hvilket tyder på en øget effluksaktivitet hos disse isolater sammenlignet med samfunds- og dyreisolaterne.



FIGUR 12. Normaliseret gennemsnitlig fluorescens som følge af EthBr akkumulering og effluks. Isolatet med højeste fluorescensintensitet (VS 5) var positiv kontrol med værdien 1,0 (y-aksen), da alle isolater er normaliseret til dette isolat. Hver søjle repræsenterer et isolat. A). viser isolaterne inddelt efter vancomycin resistensprofil (VSE-rød /VVE-grøn /VRE-blå). B) viser isolaterne inddelt efter isoleringssted (dyr-rød, samfund-grøn, hospital-blå).

7.3.2 Efflukshæmning og -aktivitet over tid

En mere detaljeret undersøgelse af effluks blev efterfølgende foretaget på 7 isolater valgt ud fra resultaterne fra screeningen (sektion 7.3.1). Der blev udvalgt 2 isolater som havde givet høj EthBr fluorescens (VS5 og V2815), begge VSEfm. Herudover 2 isolater med middel høj EthBr fluorescens (VRE 3234 og VSE 2683) og 3 VREfm isolater der havde vist meget lav EthBr fluorescens (VRE2583, VRE3190, VRE3336). Bakterier fra overnatkultur blev høstet og genoplslæmmet i buffer uden vækstmedie og med EthBr og efflukspumpehæmmeren Carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone (CCCP). Sulten af cellerne forhindrer de ATP drevne effluks-pumper i at virke, mens CCCP hæmmer elektron-transport-kæden, hvilket driver den anden klasse af effluks-pumper. Hæmning af effluks gør at EthBr akkumuleres inde i bakterierne uden at blive pumpet ud. Efter en præinkubering blev cellerne vasket fri for CCCP, og fik tilsat BHI vækstmedie samt EthBr, hvorefter EthBr fluorescensintensiteten blev fulgt over 6 timer med måling hver 10 min. Tilførsel af vækstmedie aktiverer bakterierne og pumperne ved tilførsel af

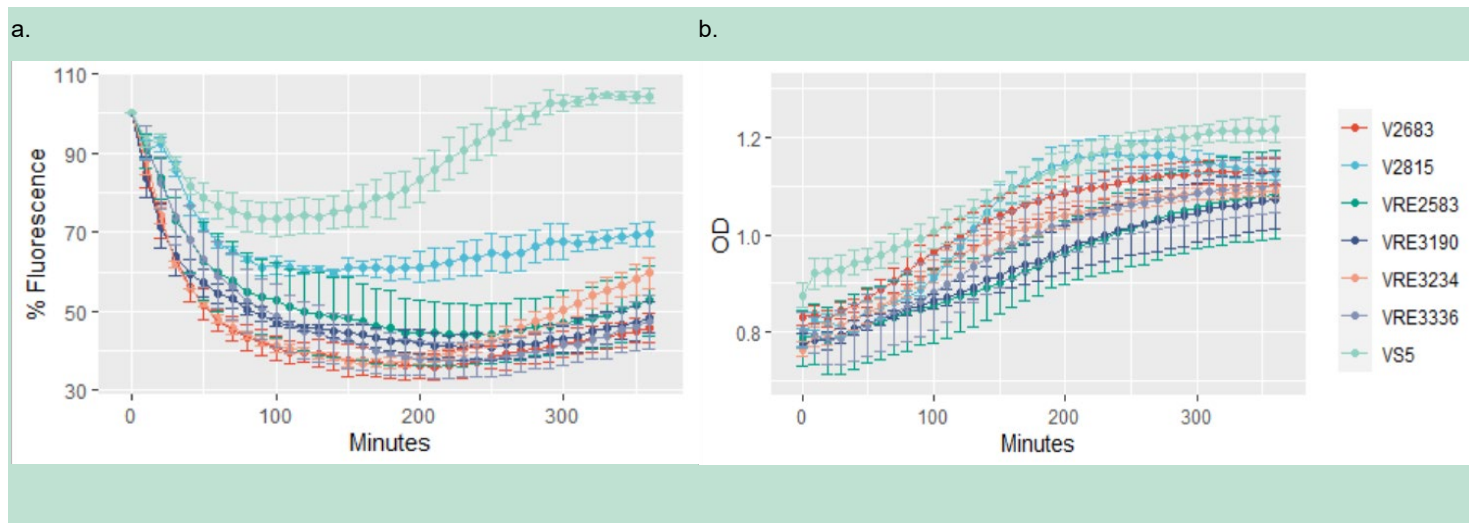
energi. Kontroller var bakterier der havde været gennem samme behandling, men som ikke blev aktiveret med vækstmedie, samt en række andre relevante kontroller (materialer og metoder sektion 6.5.2). Forsøget blev foretaget i tekniske triplikater.

Fluorescensintensiteten blev normaliseret ved at trække fluorescenssignalet fra kontrollen "EthBr/CCCP uden bakterier" fra fluorescensaktiviteten for de aktiverede prøver, som korrigeret af baggrundssignal. Herefter blev de aktiverede prøver taget som procent af de ikke aktiverede kontroller. Prøverne er aktiverede, hvis der er tilført vækstmedie, som aktiverer potentielle efflukspumper, der behøver energi for at virke.

Normaliseret fluorescens = $(\text{fluorescens}_{\text{aktiveret}} / \text{fluorescens}_{\text{kontrol}})$ (ligning 4)

Derefter normaliseres prøverne en yderligere gang ved at beregne hver normaliseret måling som en procent af udgangspunktet (tid 0 min) for lettere at kunne sammenligne isolaterne.

Den normaliserede fluorescens % faldt for alle stammer, men aldrig under 70% for lav-effluks stammen VS5, hvor intensiteten steg igen samtidigt som EthBr formentlig fortsatte med at akkumulere, samt akkumulerede i nye bakterier der kom til som følge af vækst efter aktiveringen med BHI vækstmedie. Isolatet med næsthøjst fluorescensintensitet var V2815, som ikke kommer under 60%. De øvrige isolater, som var henholdsvis middel og lav fluorescens ved screeningen er sværere at differentiere i denne forsøgsopstilling, men falder alle brat i løbet af de første 100 min og ned til omkring 40% ved 200 min, hvorefter de stiger lidt igen, men holder sig omkring de 50% som udtryk for en aktiv effluks (figur 13a). Vækstkurverne følges ad for alle stammerne, dog ses mere variation i væksten for VRE2583 og VRE3336 (figur 13b).



FIGUR 13. Aktiv effluks, samt vækstkurver for 7 udvalgte *E. faecium* isolater. Gennemsnit af tekniske triplikater med angivelse af CI 95%. A) Normaliseret fluorescens i procent beregnet som fluorescenssignalet fra bakterier aktiveret med vækstmedie i forhold til tiden 0 min for bakterier der ikke er aktiveret (kontroller). B) vækst af bakterierne vist som optisk densitet (OD 600 nm) som funktion af tid i minutter. Til højre ses isolaternes ID, samme ID er gældende for figur a. og b.

8. Diskussion

8.1 Effektiviteten af klorfrigivende stoffer

Metoden, som er udviklet og tilpasset til screening for biocidfølsomhed i forbindelse med dette projekt ved at udføre forsøgene i 96-brøndsplader, også kaldet mikrotiterplader, viser sig at give et både fleksibelt og tidsbesparende setup, som tillader evaluering af effekten af eksponeringstid og koncentration samtidigt. Metoden kan bruges til at evaluere andre biocider, og desuden gøres high-throughput, hvis man har adgang til en væskehåndteringsrobot [18]. Screeningen af de 59 *E. faecium* isolater viste overlevelse af mindst én ud af de 10^5 *E. faecium* efter 10 min eksponering over for en gennemsnitlig koncentration af aktivt klor på 415 ppm, altså kun 2,4 gange under den anbefalede brugskoncentration (1000 ppm). Det er interessant, da man typisk anvender biocider i koncentrationer der mange gange overstiger den baktericidale effekt. Det kan dog være et udtryk for at brugskoncentrationer traditionelt set er blevet ekstrapoleret fra minimal inhibitoriske koncentrationer (MIC-bestemmelser), hvor eksponeringstiden er 18-22 timer [11].

Koncentrationen hvor *E. faecium* kunne overleve steg signifikant, når eksponeringstiderne blev kortere og inkuberingstiden længere, hvilket resulterede i overlevelse og vækst ved koncentrationer der oversteg den anbefalede brugskoncentration. Et tidligere studie fandt at den gennemsnitlige baktericidale koncentration (BBC) af natrium hypoklorit (NaOCl) var 500 ppm, når et klinisk hospitalsassocieret *E. faecium* isolate blev eksponeret i 10 min [31]. Dette stemmer overens med nærværende studie eftersom den gennemsnitlige estimerede BBC er 100 ppm højere end sub-BBC værdien, altså omkring 515 ppm (sektion 7.1.1).

Et nyere studie, som sammenligner forskellige enterokarters følsomhed, fandt en lille reduktion ($1.2 - 1.25$ log fold) for *E. faecium* efter eksponering i 1 min, 5 min og 15 min overfor 3 % NaOCl af en brugskoncentration på 6 – 14% frit klor svarende til 1800 – 4200 ppm frit klor, hvilket forfatterne finder bekymrende [32]. For at undersøge om den lave effektivitet vist i det pågældende studie af Suchomel *et al.* (2019) kunne skyldes det høje inokulum ($1.5 - 5.0 \times 10^8$ CFU/ml NaOCl) anvendt i deres modificerede metode af suspensionsteststandard EN 13272, valgte vi at undersøge effekten af at øge inokulum med ca. 100 fold til 1×10^8 CFU/ml aktivt klor for den interne kontrolstamme VRE2961 (sektion 3.3). Denne øgning i inokulumstørrelse havde en tydelig effekt på overlevelsen, således at 8000 ppm ikke var tilstrækkelig til at udrydde alle bakterier uagtet kontakttid (3, 5, 10 min), hvilket indikerer kompromitteret desinfektionseffektivitet ved denne høje byrde af *E. faecium*. Ved direkte udpladning på BHI ager kunne der ikke dyrkes bakterier frem fra hverken 8000 eller 1000 ppm brøndene, hvilket indikerer at antallet af overlevede bakterier har været lavt og under detektionsgrænsen for udpladning, men dog tilstrækkeligt til overlevelse og vækst ved berigelse med flydende vækstmedie. Den lave log reduktion demonstreret i studiet af Suchomel *et al.* kunne derfor ikke bekræftes her, men der er en begrænsning i og med at frit klor angivet i deres studie ikke nødvendigvis er sammenligneligt med den koncentration af det mere baktericide aktive klor (HOCl) anvendt i vores studie, da denne ligevægt vil afhænge af pH, som ikke bliver oplyst [32]. Uagtet viser resultaterne at inokulumstørrelsen har betydning ved undersøgelser af biocideffektivitet [5,33].

Et af formålene for projektet var at undersøge om udbrudskloner af VREfm og VSEfm havde særlig høj tolerance i forhold til den anbefalede brugskoncentration, og sammenlignet med andre *E. faecium* isolater. En sådan øget tolerance kunne være en fordel i hospitalsmiljøet. Resultaterne viste ikke signifikante forskelle i overlevelse og vækst mellem VREfm og VSEfm eller andre hospitalsassocierede *E. faecium*, sammenlignet med de samfundsassocierede isolater, om end den multiple logistiske regression viste tendenser imod at netop hospitalsassocierede isolater og udbrudsVRE kunne have en positiv indvirkning på sandsynligheden for vækst med

respektive odds ratioer på 4 og 2,7 ($p = 0,08$) (tabel 1). En koncentrationsgradient med mindre afstande mellem koncentrationerne kunne øge forsøgets diskriminatoriske kapacitet, hvilket muligvis ville gøre denne forskel signifikant, men på bekostning af effektiviteten ved screeningen og ikke med den store forskel for konklusionen i forhold til klinisk anvendelse. Resultaterne, for den klon af VREfm som hyppigst isoleres på danske hospitaler, viste at disse påvirkede sandsynligheden for vækst negativt, sammenlignet med andre *E. faecium* isolater, altså indikation for mere følsomhed over for det klorfrigivende biocid. Dog skal det bemærkes at prøvestørrelse var relativt lille ($n = 5$), derfor bør flere VREfm isolater undersøges, hvis man ønsker mere sikkerhed for denne indikation.

Virkningsmekanismerne for frit klor involverer flere angrebepunkter både ekstra- og intracelluært med inhibition af enzymaktivitet ved oxidation af sulfhydrylgrupper, samt skadelig effekt på DNA syntesen og der bliver formentlig også dannet frie radikaler som yderligere skader cellen [5–8]. Vores hypotese om at udbrudskloner kunne være mere tolerante bygger på *E. faecium*s høje genom plasticitet, hvilket betyder at den gerne optager, samt deler gener med andre bakterier af samme art eller relaterede arter [34]. Mange virulens og resistensgener spredes via plasmider, herunder vancomycin resistensen for størstedelens vedkommende. Sammen med mobile genetisk elementer, der giver resistens overfor antibiotika, kan der blive overført gener der ligeledes øger bakteriernes tolerance overfor visse biocider [16], eller effluxpumpegener, som kan udskille flere typer antimikrobielle stoffer, som set for *qac* gener [13], og for klorhexidin i populationer af *E. faecium* [35]. Vi kunne dog ikke påvise sådanne forskelle i klorfølsomhed, og vi spekulerer, at en forklaring kan være klors mange forskellige cellulære angrebepunkter som gør at ændret tolerance over for et af angrebepunkterne ikke nødvendigvis giver udslag på den samlede overlevelse.

Ved sammenligning med ældre studier af enterokokkers overlevelse ved eksponering overfor NaOCl kunne det tyde på, at *E. faecium* følsomheden overfor frit klor kan være blevet mindre i løbet af de seneste årtier fra 150 ppm ved 5 min eksponering til 500 ppm eller højere som vist i nærværende studie [32,36]. To studier fra 1985 på *Staphylococcus aureus* støtter at NaDCC syntes at have været mere effektiv førhen, med > 5 log reduktion ved 10 min kontakt til 12,5 ppm NaDCC, mens det andet studie finder 5 min kontakt til 5 ppm nok til at udrydde endnu højere inokulum [7,9]. For VREfm er der indikationer på at følsomheden overfor alkohol er aftaget for nyere hospitalsassocierede *E. faecium* sammenlignet med 10 år ældre isolater [14], og en sådan adaptation over tid kunne adresseres ved at screene ældre *E. faecium* isolater vha. metoden præsenteret i denne rapport og/eller ved at undersøge *E. faecium*s evne til at adaptere til sub-inhibitoriske koncentrationer af aktivt klor over gentagne passager og således længere påvirkning.

8.2 Overlevelse på overflader

Ved analyser af overlevelsen på overflader viste resultaterne, at VREfm klarer udtørring på overflader og at reduktionen i antallet af bakterier var begrænset inden for de første 8 dage (1,3 log reduktion), og at efter 27 dage var det stadig muligt at dyrke VREfm fra overfladen (3 log reduktion). Resultaterne er ikke som sådan overraskende, da andre studier viser overlevelse fra uger og helt op til > 46 måneder på overflader før total eliminering af *E. faecium*, og også i disse tilfælde var der ikke statistisk signifikant forskel mellem VRE og VSE [37–39]. Overlevelsen på overfladerne udgør en reel smitterisiko, og der er en signifikant sammenhæng mellem patientstuer konstateret kontamineret med VRE via miljøprøver, samt stuer tidligere beboet af en VRE koloniseret patient og efterfølgende erhvervelse af VRE infektion for den næste patient [40,41]. Vi foretog også analyser på antallet af intakte bakterieceller med BactoBox®, hvis teknologi består af en flowcelle, som med et sæt af mikroelektroder kan detekterer bakterier, når de ledes forbi i en væske. Det er, som spekuleret i resultaterne, svært at sige, hvorfor antallet af intakte celler ikke faldt over tid. En mulig spekulation kunne være hvis enterokokernes cellemembran ikke brister, trods mindre huller i membranen, og derfor bliver registreret som intakte af BactoBox® trods de formentlig er døde. Herudover er det meget muligt at en fraktion af populationen

udgøres af "variable but non culturable, VBNC" bakterieceller, som er i dette stadie efter stress-påvirkningen med udtørring og som ikke er døde og derfor tælles som intakte celler [30]. VBNC vil ikke umiddelbart kunne vokse på fast agarmedie, og kan derfor ikke kvantificeres på traditionel vis.

I forhold til genfindingsprocenten på i gennemsnit 71% (SD 28%) for én svaber og 75% (SD 32%) for 2 svabre har flere andre studier fundet lignende resultater [28,42,43]. Den relativt høje SD skyldes en lav genfindingsprocent på 22 % ved den første prøvetagning efter 3 timer, da inokulum tørrede langsommere ud i kontrolbrøndene og derfor overlevede bedre, og tilmed groede en anelse (figur 11). Generelt er en våd skumsvaber, som anvendt her, at foretrække til at opsamle bakterier der er indtørret på overflader [43]. Vi fandt ikke statistisk signifikant forskel på at svabre overfladen med én eller med to svabre.

8.3 Effekt af mekanisk rengøring og klordesinfektion

Resultaterne for klorkludenes effektivitet indikerer god effekt at den mekaniske overtørring i kombination med klor med > 5 log reduktion på testarealerne. Ved svabring af overflader skal man være opmærksom på risikoen for falsk negative resultater. Genfindingsprocenten vil være en begrænsning i forsøgsopsætningen, når der er få bakterier tilbage på overfladen. På baggrund af den gennemsnitlige genfindingsprocent på 71% og det tab man har pga. fortyndingsfaktorer, estimerer vi at der skal være > 100 CFU på testarealet, for at undgå falsk negative resultater, og da inokulum i gennemsnit var 2×10^7 og klorkluden synes at reducerer > 5 log er der en risiko for falsk negative. Denne risiko blev dog væsentligt nedsat af den efterfølgende berigelse af svaberen inkl. transportmediet med selektivt vækstmedie og dyrkning over natten, som vil give i teorien en enkelt bakterie mulighed for at vokse igen, også dem som sidder fast på svaberen og ikke er kommet ud i væsken.

Der er naturligvis flere begrænsninger i et studie gennemført under laboratorieforhold, så som at kluden blev anvendt på et lille areal ($< 0,5 \text{ m}^2$), som var sterilt, på nær de $4 \times 25 \text{ cm}^2$ inficerede testarealer. Desuden var overfladen relativt ny og glat, uden kanter og hjørner, hvilket også fremmer muligheden for desinfektion. Om end foranstaltninger er taget for at efterligne forholdene i hospitalsmiljøet, så er det en svær opgave. Det er værd at notere at overtørring med klud uden klor gav godt 4 log reduktion i antallet af bakterier, og at proceduren på hospitalerne er rengøring med detergent før desinfektion med klorklude [4], hvilket ville bringe bakterieantallet yderligere ned. Rengøring med klude med detergent er vist i praksis at reducere det samlede bakterieantal og bevare det under 5 CFU/cm² op til 24 timer (undtaget sengebord) [44], og eftersom dette kombineres med en efterfølgende desinfektion med klorklud, vil vi formode at dette vil være tilstrækkelig på de områder der bliver rengjort og desinficeret.

Undersøgelsen af klorkludenes effektivitet er kun foretaget 2 gange, og yderligere forsøg bør foretages for at eftervise disse indikationer.

Data fra fabrikanten Wipaclean på effektiviteten af deres klorklude, som anvendt i dette forsøg, er blevet gennemgået og godkendt af Statens Serum Institut [45], herudover har det ikke været muligt at finde sammenlignelige studier for desinfektion af *E. faecium* med præimprægnerede klorklude.

8.4 Effluksaktivitet

Resultaterne af screeningen for effluksaktivitet på hele stammesamlingen inkluderet i dette projekt viste spændende resultater. De hospitalsassocierede isolater fordelte sig alle i høj- eller midleffluks, men ingen i laveffluksgruppen. Yderligere var udbrudsVRE overrepræsenteret blandt højeffluks isolaterne. Fundet kan vække bekymring, da overekspression af efflukspumper er blevet associeret med øget mutations rater, hvilket kan fremme udvikling af resistente stammer [46,47].

E. faecium som art er divers og med høj grad af plasticitet i genomet, hvilket bevirker at de kan inddeles i forskellige klynger/grupper, og der er identificeret en klar separation mellem kliniske isolater og kommensaler [48,49]. Herudover er det blevet klart at plasmiderne, som de forskellige isolater indeholder, i endnu højere grad definerer klyngerne/grupperne, således at de hospitalsassocierede isolater identificeres med flere plasmider og med gener specifikke for disse [50]. Det er muligt at forskellene set på effluks i dette studie netop relaterer sig til gener båret på plasmider, som er specifikke for hospitalsassocierede stammer, hvilket vi vil undersøge nærmere i et kommende projekt.

Effluksaktiviteten kvantificeret over tid giver flere nuancer på den aktive effluks, og akkumulering kan adskilles fra effluks. Desuden giver det mulighed for at undersøge efflukshæmmere, samt lave knock-out mutanter af forskellige formodede effluksgener og monitorere effekten på effluksen for at identificere gener af betydning for effluksaktiviteten [51,52]. Resultaterne viste at høj- og lav effluksstammer kunne adskilles, men yderligere optimering af opstillingen forventes at give endnu bedre diskrimination mellem isolaterne.

8.5 Sammenfattende diskussion

Resultaterne fra dette projekt pointerer vigtigheden af overholdelse af de anbefalede guidelines i forhold til koncentration og kontakttid, særligt med tanke på at disse forsøg er foretaget under rene forhold, dog for overtørringsforsøget sammenblandet med bovin serum albumin, for at inddrage organisk materiale. Men overordnet set må der forventes mere organiske materiale, overflader med slitage og ujævnheder, samt mulighed for biofilmdannelse i det virkelige miljø, hvilket yderligere stiller krav til biocidet under anvendelse. Forekomsten af organisk materiale kan beskytte *E. faecium* og herved gøre biocidet mindre effektivt [32]. På den positive side var der indikation på at den mekaniske effekt ved overtørring bidrog til en væsentlig reduktion i bakterieantal, således at kombinationen af biocid og klud gav > 5 log reduktion, om end ikke konsekvent fjernelse af alle *E. faecium*. Da instruksen i forhold til isolationsstuer hedder rengøring med detergent og desinfektion i to arbejdsgange, må der formodes en yderligere positiv effekt af to mekaniske aftørninger af de overflader der bliver behandlet. Overlevelsen på overfladerne og den højere overlevelse ved længere tids inkubering indikerer desuden at intervallerne mellem rengøring og desinfektion er vigtige, og at VREfm i miljøet ikke forsvinder uden intervention. En risiko i forhold til gentagen eksponering overfor biocider, hvis koncentrationen ikke er tilstrækkelig til at dræbe bakterierne, kan dels være adaptation af bakterien over tid. Ikke-letale skader kan øge mutationsfrekvensen, fremme deling og optag af gener mellem bakterier og stimulerer overekspression af visse gener associeret med resistens, såsom effluksgener. Det er derfor vigtigt at biocider anvendes korrekt og ikke unødigt og ekstensivt. Herudover skal der tages miljøhensyn ved brug af biocider, hvorfor begrænsning i anvendelsen er at foretrække.

9. Konklusioner

I dette projekt er der blevet udviklet en suspensions-analysemetode, hvormed følsomhed over for biocider effektivt kan undersøges i en række koncentrationer og med varierende eksponeringstider simultant. Projektet har fokuseret på *E. faecium*, som er en problematisk opportunistisk patogen, som i stigende omfang er årsag til hospitalserhvervede infektioner. Især vancomycin resistente *E. faecium* (VREfm) er problematiske, og visse kloner synes særligt velegnede til at overleve i hospitalsmiljøet, og giver anledning til gentagne udbrud. Valget af klorfrigivende biocider er truffet på baggrund af relevans i forhold til sygehusvæsenet. En nøje udvalgt samling af danske isolater blev undersøgt for deres følsomhed og overlevelsessevne overfor klorfrigivende biocider, samt overlevelse på overflader før og efter desinfektion. Isolaterne er udvalgt for at kunne svare på en af hovedhypoteserne nemlig om isolater associeret med hospitaler og særligt udbrudskloner fra hospitalerne skulle have udviklet tolerance overfor det anvendte biocid. Herudover er bakteriernes evne til at pumpe potentielle skadelige stoffer ud over deres cellemembran blevet undersøgt, da evnen til effluks kan give bakterierne forskellige fordele og øgede mutationsfrekvens.

På baggrund af resultaterne fra dette projekt kan der drages følgende konklusioner:

- 1) Det klorfrigivende biocid NaDCC Plus, når dette blandes med 10^5 *E. faecium* i suspension (10^6 *E. faecium*/ml biocid) til den anbefalede kontakttid og koncentration (10 min, 1000 ppm), var effektivt til at slå alle de 59 isolater ihjel. Koncentrationen var en signifikant forklarende variabel for sandsynligheden for vækst. Værd at bemærke var, at den gennemsnitlige koncentration, som resulterede i overlevelse var 415 ppm, altså kun 2,4 gange under den anbefalede brugskoncentration på 1000 ppm. Herudover viste forsøg med 100 fold højere antal bakterier (10^8 *E. faecium*/ml biocid) sig at påvirke effektiviteten, således at der var overlevne bakterier efter eksponering for 8000 ppm. Disse kunne dog ikke dyrkes frem på fast medie, så der har formenligt været få.
- 2) Kontakttider og tid til at komme til live igen (inkuberingstiden) påvirker sandsynligheden for vækst signifikant, således at en kontakttid på 3 min og 2 døgns inkubering resulterede i overlevelse over den anbefalede brugskoncentrationen, hvilket pointerer vigtigheden af korrekt anvendelse af biocidet.
- 3) Udtørring på overflader er ikke noget der forhindrer overlevelse af *E. faecium*, og efter 8 dage var bakterieantallet kun faldet med i gennemsnit 1,3 log, hvilket pointerer nødvendigheden af at nedbringe bakterieantallet på overflader og medicinsk udstyr som kommer i kontakt med patienterne og/eller personalet. Svabring af testarealer med våd skumsvaber viste sig at være en god metode, som gav en tilfredsstillende genfindingsprocenten. Dog kan man stadig forvente falsk negative ved lavt antal bakterier på testoverfladen (estimat < 100 CFU/50 cm²).
- 4) Klorklude viste sig effektive til at fjerne > 5 log *E. faecium* fra testoverfladen. Der kunne dog stadig genfindes *E. faecium* sporadisk ved direkte dyrkning eller berigelse af svaberen og transportmediet med vækstmedie. Den mekaniske påvirkning alene bevirkede ca. 4 log reduktion. Studiet er småt og bør gentages før der kan drages nogle endelige konklusioner.
- 5) Screeningen for effluksaktivitet viste sig, med få undtagelser, at adskille hospitalsassocierede isolater fra samfundsassocierede isolater. Det bliver spændende at gå mere i dybden med dette. Forsøgssopstillingen der tillader måling af aktiv effluks over tid vil,

sammen med undersøgelser af forskelle i genomerne mellem høj- og laveffluks stammer, være et redskab til at kigge efter efflukspumper og beskrive biologien bag effluksaktivitet nærmere, med henblik på at undersøge deres medvirken til overlevelse i hospitalsmiljøer.

10. Perspektivering

I dette projekt er der blevet fokuseret på at bestemme *E. faecium*s følsomheden overfor praksisrelevante koncentrationer af klorfrigivende biocider. Det er således ikke blevet undersøgt i hvilken grad *E. faecium* er i stand til at adaptere ved eksponering for sub-inhibitoriske koncentrationer. Det kan være relevant i forhold til at risikovurdere betydningen af inadækvat eksponering, og dennes betydning for udvikling af tolerance ikke kun overfor biocidet, men også overfor andre antimikrobielle stoffer, f.eks. gennem overekspression af effluks pumper eller andre mekanismer aktiveret af stress respons.

Vi ønskede at undersøge følsomheden over for et større antal isolater, hvilket bevirkede at vi fokuserede på én gruppe af biocider. Den udviklede metode kan dog bruges til at undersøge følsomheden overfor andre relevante biocider, såsom klorhexidin og alkohol. Hydrogenperoxid vil være mere relevant at undersøge i dampform, da det er således det bliver anvendt.

Det var vigtigt at inddrage undersøgelser af overlevelse på overflader før og efter desinfektion, da det endnu bedre repræsenterer praksis end suspensionstest, og desuden inddrager den mekaniske del af processen. Det er dog stadig vanskeligt helt at efterligne forholdene på hospitalerne, og flere typer overflader kunne være relevante at undersøge. Denne form for studier er ikke velegnede til screeningsformål, da de er arbejdskrævende og forbundet med mere variation, men kunne overvejes på et mindre antal isolater fremadrettet. Det kunne også være interessant at vurdere, i hvilket omfang desinfektion bidrager til at eliminere VREfm i forhold til rengøring med detergent alene.

Et andet aspekt vi ikke har forhold os til er biofilmdannelse. I hvilket omfang de forskellige isolater bruger denne strategi til overlevelse i miljøet, og hvordan det påvirker effektiviteten af desinfektion.

Vores resultater tyder på at hospitalsassocierede isolater har en fordel i form af øget effluksaktivitet, og yderligere studier skal afdække betydningen af dette for overlevelse i hospitalsmiljøet, og om nye eller kendte efflukspumpegener er tilstede i højeffluksstammerne. Forsøgssopstillingen der tillader måling af aktiv effluks over tid vil, sammen med undersøgelser af forskelle i genomerne mellem høj- og laveffluks stammer, være et redskab til kigge efter efflukspumper og beskrive biologien bag effluksaktivitet nærmere.

Sidst har vi et ønske om at finde nye strategier til bekæmpelse af VREfm. Her tænker vi på identifikation af efflukspumpehæmmere og evaluering på effekten af en sådan hæmning. Desuden vil vi gerne undersøge fager (virus der angriber bakterier) fra hospitalsmiljøet og/eller overkoloniserede patienter for at lede efter fager med letal effekt på VREfm (fagterapi).

Overordnet set indikerer resultaterne at klorfrigivende biocider stadig er effektive overfor *E. faecium*, såfremt de anvendes korrekt. Vi spekulerer på hvor længe VREfm holdes nede efter rengøring og desinfektion? Hvor lang tid går der før miljøet er kontamineret igen i en grad hvor VREfm kan transmitteres, samt hvad er forekomsten på de områder der ikke kan blive eller sjældent bliver desinficeret? Vi formoder at disse punkter udgør den største risiko for smitte fra hospitalsmiljøet. Herudover kan opretholdelse af isolation af raske smittebærere være en vanskelig opgave (personlig kommunikation Jenny D. Knudsen), og disse patienter udgøre en stor risiko for kontaminering af hospitalsmiljøet, trods indsatsen i form af rengøring og desinfektion.

11. Referenceliste

- [1] Cetinkaya Y, Falk P, Mayhall CG. Vancomycin-Resistant Enterococci. *Clin Microbiol Rev* 2000;13:686–707.
- [2] Korsgaard HB, Ellis-Iversen J, Hendriksen RS, Borck Høg B, Ronco T, Attauabi M, et al. Danmap 2019 - Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark. 2019.
- [3] Region Hovedstaden. Region Hovedstaden Vejledning Multiresistente bakterier. 2020.
- [4] Marianne M, Marie S, Mikkelsen R, Andersen LP, Slotsbjerg T, Slott B, et al. Nationale Infektionshygiejniske Retningslinjer - Desinfektion i Sundhedssektoren. 2018.
- [5] Fukuzaki S. Mechanisms of Actions of Sodium Hypochlorite in Cleaning and Disinfection Processes. *Biocontrol Sci* 2006;11:147–57. <https://doi.org/10.4265/bio.11.147>.
- [6] Clasen T, Edmondson P. Sodium dichloroisocyanurate (NaDCC) tablets as an alternative to sodium hypochlorite for the routine treatment of drinking water at the household level. *Int J Hyg Environ-Health* 2006;209:173–81. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2005.11.004>.
- [7] Bloomfield SF, Uso EE. The antibacterial properties of sodium hypochlorite and sodium dichloroisocyanurate as hospital disinfectants. *J Hosp Infect* 1985;6:20–30. [https://doi.org/10.1016/S0195-6701\(85\)80014-1](https://doi.org/10.1016/S0195-6701(85)80014-1).
- [8] Slotsbjerg T. Desinfektion med 1000 ppm aktivt klor ved forekomst af *Clostridium difficile*. 2009.
- [9] Coates D. A comparison of sodium hypochlorite and sodium dichloroisocyanurate products. *J Hosp Infect* 1985;6:31–40. [https://doi.org/10.1016/S0195-6701\(85\)80015-3](https://doi.org/10.1016/S0195-6701(85)80015-3).
- [10] Coates D. Comparison of sodium hypochlorite dichloroisocyanurate disinfectants : by serum and sodium neutralization Accepted for publication. *J Hosp Infect* 1988;11:60–7.
- [11] Wessels S, Ingmer H. Modes of action of three disinfectant active substances: A review. *Regul Toxicol Pharmacol* 2013;67:456–67. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2013.09.006>.
- [12] Heath RJ, Li J, Roland GE, Rock CO. Inhibition of the *Staphylococcus aureus* NADPH-dependent Enoyl-Acyl Carrier Protein Reductase by Triclosan and Hexachlorophene*. 2000. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.7.4654>.
- [13] Wassenaar T, Ussery D, Nielsen L, Ingmer H. Review and phylogenetic analysis of *qac* genes that reduce susceptibility to quaternary ammonium compounds in *Staphylococcus* species. *Eur J Microbiol Immunol* 2015;5:44–61. <https://doi.org/10.1556/eujmi-d-14-00038>.
- [14] Pidot SJ, Gao W, Buultjens AH, Monk IR, Guerillot R, Carter GP, et al. Increasing tolerance of hospital *Enterococcus faecium* to handwash alcohols. *Sci Transl Med* 2018;10:1–10. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aar6115>.
- [15] Du D, Wang-Kan X, Neuberger A, van Veen HW, Pos KM, V Piddock LJ, et al. Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. *Nat Rev Microbiol* 2018. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0048-6>.
- [16] Webber MA, Whitehead RN, Mount M, Loman NJ, Pallen MJ, Piddock LJ V. Parallel evolutionary pathways to antibiotic resistance selected by biocide exposure. *J Antimicrob Chemother* 2015;70:2241–8. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv109>.
- [17] Munita JM, Arias CA. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr* 2016;4:1–24. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.vmbf-0016-2015>.
- [18] Brauner A, Shores N, Fridman O, Balaban NQ. An Experimental Framework for

- Quantifying Bacterial Tolerance. *Biophys J* 2017;112:2664–71. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.05.014>.
- [19] European Committee for Standardization. Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity in the medical area - Test method and requirements (phase 2, step 1) DS/EN 13727:2012+A1:2013 suspensionsprøvning.pdf. Danish Standards Foundation; 2013.
- [20] DS_EN 13727_2012_A1_2013_Annex A.pdf n.d.
- [21] ECOLAB. ACTICHLOR PLUS - SAFETY DATA SHEET according to Regulation (EC) No. 19. 2014.
- [22] WipeClean - WipeClean Chlorine Disinfection - Plum n.d. <https://plum.dk/produkter/hygiejne/wipeclean/wipeclean-chlorine-disinfection> (accessed May 25, 2021).
- [23] Hammerum AM, Justesen US, Pinholt M, Roer L, Kaya H, Worning P, et al. Surveillance of vancomycin-resistant enterococci reveals shift in dominating clones and national spread of a vancomycin-variable vanA *Enterococcus faecium* ST1421-CT1134 clone, Denmark, 2015 to March 2019 2019:1. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.34.1900503>.
- [24] Damborg P, Top J, Hendrickx APA, Dawson S, Willems RJL, Guardabassi L. Dogs are a reservoir of ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* lineages associated with human infections. *Appl Environ Microbiol* 2009;75:2360–5. <https://doi.org/10.1128/AEM.02035-08>.
- [25] Damborg P, Sørensen AH, Guardabassi L. Monitoring of antimicrobial resistance in healthy dogs: First report of canine ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* clonal complex 17. *Vet Microbiol* 2008;132:190–6. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.04.026>.
- [26] Halekoh U, Højsgaard S, Yan J. The R package geepack for generalized estimating equations. *J Stat Softw* 2006;15:1–11. <https://doi.org/10.18637/jss.v015.i02>.
- [27] R Core Team. R: The R Project for Statistical Computing 2020. <https://www.r-project.org/> (accessed December 29, 2020).
- [28] Hedin G, Rynbäck J, Loré B. New technique to take samples from environmental surfaces using flocked nylon swabs. *J Hosp Infect* 2010;75:314–7. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2010.02.027>.
- [29] Nocker A, Fernández PS, Montijn R, Schuren F. Effect of air drying on bacterial viability: A multiparameter viability assessment. *J Microbiol Methods* 2012;90:86–95. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.04.015>.
- [30] Lleò MM, Bonato B, Tafi MC, Signorello C, Boaretti M, Canepari P. Resuscitation rate in different enterococcal species in the viable but non-culturable state. *J Appl Microbiol* 2001;91:1095–102. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01476.x>.
- [31] El-Azizi M, Farag N, Khardori N. Efficacy of selected biocides in the decontamination of common nosocomial bacterial pathogens in biofilm and planktonic forms. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2016;47:60–71. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2016.06.002>.
- [32] Suchomel M, Lenhardt A, Kampf G, Grisold A. *Enterococcus hirae*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* show different sensitivities to typical biocidal agents used for disinfection. *J Hosp Infect* 2019;103:435–40. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2019.08.014>.
- [33] Johnston MD, Simons E-A, Lambert RJW. One explanation for the variability of the bacterial suspension test. *J Appl Microbiol* 2000;88:237–42.
- [34] García-Solache M, Rice LB. The enterococcus: A model of adaptability to its environment. *Clin Microbiol Rev* 2019;32. <https://doi.org/10.1128/CMR.00058-18>.
- [35] Duarte B, Pereira AP, Freitas AR, Coque TM, Hammerum AM, Hasman H, et al. 2CS-CHX T Operon Signature of Chlorhexidine Tolerance among *Enterococcus faecium* Isolates. *Appl Environ Microbiol* 2019;85:1589–608. <https://doi.org/10.1128/AEM.01589-19>.
- [36] Kearns AM, Freeman R, Lightfoot NF. Nosocomial enterococci: resistance to heat and sodium hypochlorite. *J Hosp Infect* 1995;30:193–9. [https://doi.org/10.1016/S0195-6701\(95\)90314-3](https://doi.org/10.1016/S0195-6701(95)90314-3).
- [37] Wagenvoort JHT, De Brauwier EIGB, Penders RJR, Willems RJ, Top J, Bonten MJ.

- Environmental survival of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *J Hosp Infect* 2011;77:282–3. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2010.11.008>.
- [38] Neely AN, Maley MP. Survival of Enterococci and Staphylococci on Hospital Fabrics and Plastic. *J Clin Microbiol* 2000;38:724–6. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.2.724-726.2000>.
- [39] Wendt C, Wiesenenthal B, Dietz E, Rüden H. Survival of Vancomycin-Resistant and Vancomycin-Susceptible Enterococci on Dry Surfaces. *J Clin Microbiol* 1998;36:3734–6. <https://doi.org/10.1128/JCM.36.12.3734-3736.1998>.
- [40] Drees M, Snyderman DR, Schmid CH, Barefoot L, Hansjosten K, Vue PM, et al. Prior Environmental Contamination Increases the Risk of Acquisition of Vancomycin-Resistant Enterococci. *Clin Infect Dis* 2008;46:678–85. <https://doi.org/10.1086/527394>.
- [41] Otter JA, Yezli S, Salkeld JAG, French GL. Evidence that contaminated surfaces contribute to the transmission of hospital pathogens and an overview of strategies to address contaminated surfaces in hospital settings. *Am J Infect Control* 2013;41:S6. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2012.12.004>.
- [42] Piepel GF, Hutchison JR, Kaiser BLD, Amidan BG, Sydor MA, Barret CA. Recovery efficiency, false negative rate, and limit of detection performance of a validated macrofoam-swab sampling method with low surface concentrations of two *Bacillus anthracis* surrogates. 2016. <https://doi.org/10.1111/jam.13128>.
- [43] Moore G, Griffith C. Factors Influencing Recovery of Micro-organisms from Surfaces by Use of Traditional Hygiene Swabbing. *Dairy, Food Environ Sanit* 2002;22:410–21.
- [44] Bogusz A, Stewart M, Hunter J, Yip B, Reid D, Robertson C, et al. How quickly do hospital surfaces become contaminated after detergent cleaning? *Healthc Infect* 2013;18:3–9. <https://doi.org/10.1071/HI12063>.
- [45] Central Enhed for Infektionshygiejne SSI. WipeClean Chlorine Disinfection. 2017.
- [46] Meouche I EI, Dunlop MJ. Heterogeneity in efflux pump expression predisposes antibiotic-resistant cells to mutation. *Science* (80-) 2018;362:686–90. <https://doi.org/10.1126/science.aar7981>.
- [47] Papkou A, Hedge J, Kapel N, Young B, Maclean RC. Efflux pump activity potentiates the evolution of antibiotic resistance across *S. aureus* isolates. *Nat Commun* 2020;11:1–15. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17735-y>.
- [48] García-Solache M, Rice LB. The enterococcus: A model of adaptability to its environment. *Clin Microbiol Rev* 2019;32. <https://doi.org/10.1128/CMR.00058-18>.
- [49] Werner G, Coque TM, Franz CMAP, Grohmann E, Hegstad K, Jensen L, et al. Antibiotic resistant enterococci—Tales of a drug resistance gene trafficker. *Int J Med Microbiol* 2013;303:360–79. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.03.001>.
- [50] de Maat V, Arredondo-Alonso S, Willems R, van Schaik W. Conditionally essential genes for survival during starvation in *Enterococcus faecium* E745. *BioRxiv* 2020:2020.04.10.036137. <https://doi.org/10.1101/2020.04.10.036137>.
- [51] Paixão L, Rodrigues L, Couto I, Martins M, Fernandes P, Ccr De Carvalho C, et al. Fluorometric determination of ethidium bromide efflux kinetics in *Escherichia coli*. *J Biol Eng* 2009;3:1–13. <https://doi.org/10.1186/1754-1611-3-18>.
- [52] Blair JMA, Piddock LJ V. How to Measure Export via Bacterial Multidrug Resistance Efflux Pumps 2016. <https://doi.org/10.1128/mBio.00840-16>.

Enterokokkers følsomhed overfor klorfrigivende biocider

Denne rapport omhandler udvikling af metoder til vurdering af biociders effektivitet. Metoderne blev anvendt til at analysere en bakterierart, som er kendt for at være vanskelig at udrydde i hospitalsmiljøer. I projektet er der udviklet en suspensions analysemetode, hvormed følsomhed over for biocider effektivt kan undersøges i en række koncentrationer og med varierende eksponeringstider. Problemstillingen bag projektet er bakteriearten, *Enterococcus faecium*, og dennes følsomhed og overlevelsessevne overfor klorfrigivende biocider, samt overlevelse på overflader før og efter desinfektion. Herudover er bakteriernes evne til at pumpe potentielle skadelige stoffer ud over deres cellemembran blevet undersøgt.

Samlet kan det konkluderes at anbefalingerne til kontakttid og koncentration skal overholdes for at sikre den baktericide effekt af klorfrigivende biocider over for *E. faecium*, samtidigt viser overlevelsen på overfladerne at rengøring og desinfektion er essentiel for at undgå transmission af VREfm fra kontaktflader til patienter og personale. Det virker heldigvis til at de præimprægnerede klorkulde har meget god effekt under de forhold de hér er undersøgt.

Høj effluksaktivitet kan være medvirkende til bedre overlevelse for hospitalsassocieret *E. faecium*, f.eks. hvis disse er i kontakt med subletale koncentrationer af antimikrobielle stoffer.



Miljøstyrelsen
Tolderlundsvej 5
5000 Odense C

www.mst.dk