proLékaře.cz | 25.7.2025

Epidemiol. Mikrobiol. Imunol. 58, 2009, č. 1, s. 36–42

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

Votava M.[1], Šlitrová B.[2]

[1]Mikrobiologický ústav LF MU a FN u svaté Anny, Brno
[2]Fakulta chemická, VUT Brno

Souhrn

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

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

Summary

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

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

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

proLékaře.cz | 25.7.2025

Tab. 1. Testované dezinfekční přípravky

Table 1. Disinfectants tested

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

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

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

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

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

Materiál a metody

Použité mikroorganismy

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

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

Testované dezinfekční přípravky

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

Zkouška sporicidní aktivity

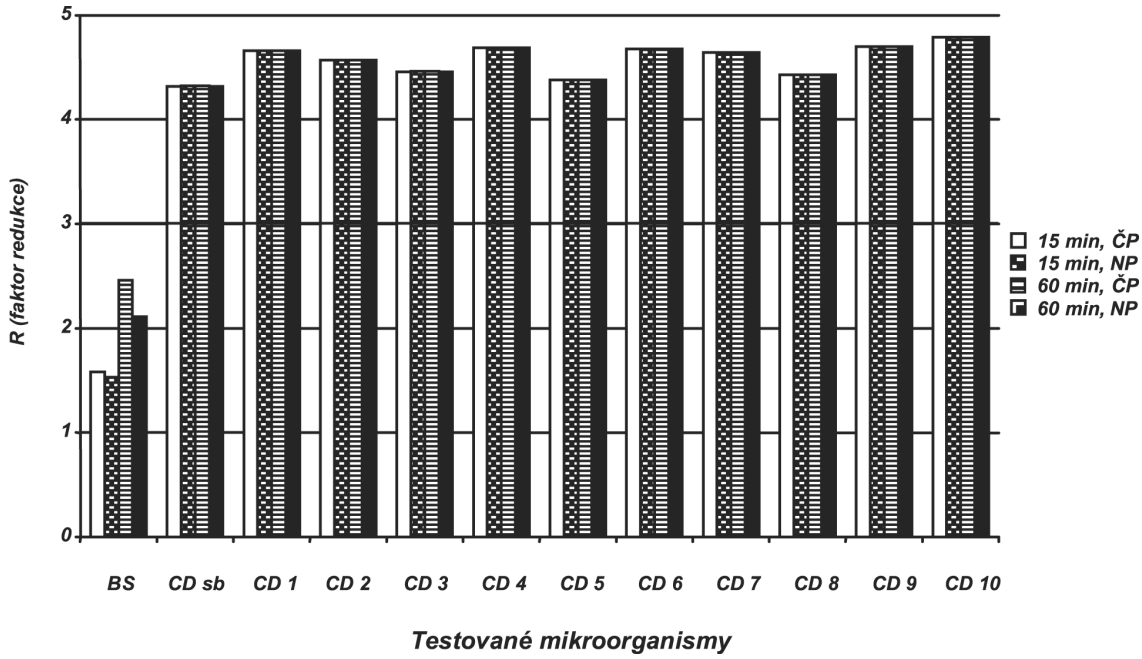
Postup vycházel z normy ČSN EN 13704 Chemické dezinfekční přípravky – Kvantitativní zkouška s použitím suspenze ke stanovení sporicidního účinku chemických dezinfekčních přípravků používaných pro potraviny, průmysl, domácnosti a veřejné prostory – Zkušební metoda a požadavky (fáze 2/stupeň 1) – což je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

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

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

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

proLékaře.cz | 25.7.2025



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

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

probíhala po 3 dny při 30 °C ±1 °C pro *B. subtilis* a anaerobně při 37 °C ± 1 °C pro *C. difficile*.

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

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

Požadavky normy. Podle normy ČSN EN 13704 má sporicidní účinnost přípravek, který je schopen při 20 °C a za čistých podmínek po 60 minutách kontaktního času redukovat počet spor *B. subtilis* o více než 3 řády (R>3). Přitom se počty CFU v testovací suspenzi s vodou (N_0) mají nacházet v intervalu $1{,}5\times10^6 – 5\times10^6$ [6].

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

Výsledky

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

Testovaný přípravek č. 1 v 1% koncentraci v časech působení 15 a 60 minut za podmínek nižšího i vyššího znečištění metodou ředicí neutralizační titr spor *B. subtilis* o více jak 3 řády neredukoval. Za stejných podmínek ale snižoval titr spor sbírkového kmene i všech 10 kmenů *C. difficile* izolovaných z klinického materiálu o více než 4 řády (obr. 1).

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

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

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

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

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

proLékaře.cz | 25.7.2025

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Diskuse

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

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

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

Další studie [17] srovnávala účinek běžného chlornanového přípravku pro domácnost jednak samotného, jednak okyseleného octem, dále roztoku vyvíjejícího oxid chloričitý a přípravku se 7% peroxidem vodíku na spory *B. subtilis, C. sporogenes* a *C. difficile* zaschlé na nosičích. Nejrychleji (během 10 minut) snížily počet spor všech tří druhů o 6 řádů chlornan (s 5000 mg volného Cl_2/l) a okyselený chlornan, přípravek s peroxidem jen u *C. difficile*. Oxid chloričitý inaktivoval spory *B. subtilis* a *Clostridium sporogenes* do 15 minut,

proLékaře.cz | 25.7.2025

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

proLékaře.cz | 25.7.2025

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

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

Poděkování

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

Literatura

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

proLékaře.cz | 25.7.2025

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

Do redakce došlo 11.8.2008

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

ČESKÁ LÉKAŘSKÁ SPOLEČNOST J. E. PURKYNĚ

ve spolupráci se

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

pořádá

XIX. KONGRES ČLS JEP S MEZINÁRODNÍ ÚČASTÍ

ZOONÓZY, NÁKAZY S PŘÍRODNÍ OHNISKOVOSTÍ

22. 4. 2009, Praha, Hotel Olympik

Registrace a informace na
www.cls.cz

PREZIDENTI KONGRESU

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

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

ODBORNÁ GARANCE

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

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

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

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

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

HLAVNÍ TÉMATA

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

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