

Agnieszka Chojecka

**SPORICIDAL ACTIVITY OF THE DISINFECTANT WITH PERACETIC ACID AGAINST THE SPORES OF *BACILLUS SUBTILIS* AND *BACILLUS CEREUS* ACCORDING TO THE EUROPEAN STANDARD PN-EN 17126: 2019-01**

**AKTYWNOŚĆ SPOROBÓJCZA PREPARATU DEZYNFEKCYJNEGO Z KWASEM NADOCTOWYM WOBEC SPOR *BACILLUS SUBTILIS* I *BACILLUS CEREUS* WEDŁUG NORMY EUROPEJSKIEJ PN-EN 17126: 2019-01**

National Institute of Public Health NIH – National Research Institute  
Department of Bacteriology and Biocontamination Control  
Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego PZH – Państwowy Instytut Badawczy  
Zakład Bakteriologii i Zwalczania Skażeń Biologicznych

ABSTRACT

**INTRODUCTION.** The assessment of the sporicidal effectiveness of disinfectants is important from the point of view of the prevention of nosocomial infections and spore contamination of clinical samples, medical equipment and materials used in patient care. The rods of *Bacillus* spp. cause infections of the digestive system, bloodstream and, less often, respiratory tract. Cases were diagnosed in immunocompromised patients, malignant neoplasms and in neonatal wards. The source of the infection was hospital linen, reusable towels, catheters or milk from the human milk bank.

**AIM OF THE STUDY.** Determination of the minimal sporicidal parameters of a disinfectant containing peracetic acid.

**MATERIAL AND METHODS.** The sporicidal activity of a disinfectant containing peracetic acid against *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus* spore suspensions was tested in a defined concentration range during a contact time of 15 minutes, in the presence of various interfering substances (clean and dirty conditions) according to the European Standard PN-EN 17126: 2019-01.

**RESULTS.** The disinfecting preparation containing peracetic acid showed sporicidal activity against *Bacillus subtilis* at a concentration of 1% for 15 minutes under clean and dirty conditions and at concentrations of 0.5%, 1.00% and 1.25% against the *Bacillus cereus* spores during the same contact time but only under dirty conditions. The preparation showed no sporicidal activity against *Bacillus cereus* at concentrations of 2%, 3%, 4% and 5% during a contact time of 15 minutes under both dirty and clean conditions.

**CONCLUSIONS.** In areas where there is a risk of infecting a patient or contaminating clinical specimens, materials and equipment with spores of *Bacillus* spp., it is necessary to use disinfectants with sporicidal activity confirmed according to the PN-EN 17126: 2019-01 standard. The sporicidal activity of disinfectants containing peracetic acid may depend on the method of preparing the solutions, their concentration, pH, temperature and the contamination degree of the disinfected surface.

**Key words:** spores, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, disinfectants, peracetic acid

STRESZCZENIE

**WSTĘP.** Ocena skuteczności sporobójczej preparatów dezynfekcyjnych jest istotna z uwagi na przeciwdziałanie zakażeniom szpitalnym oraz zanieczyszczeniom sporami próbek klinicznych, sprzętu medycznego oraz materiałów stosowanych w opiece nad pacjentami. Laseczki *Bacillus* spp. powodują zakażenia układu pokarmowego, zakażenia krwi, rzadziej układu oddechowego. Zachorowania stwierdzano u pacjentów z obniżoną

odpornością, nowotworami złośliwymi oraz pacjentów z oddziałów neonatologicznych. Źródłem zakażenia była bielizna szpitalna, ręczniki wielorazowego użytku, cewniki czy też mleko pochodzące z laktarium.

**CEL PRACY.** Wyznaczenie minimalnych sporobójczych parametrów dezynfekcji preparatu zawierającego kwas nadoctowy.

**MATERIAŁY I METODY.** Aktywność sporobójczą preparatu dezynfekcyjnego zawierającego kwas nadoctowy badano wobec zawiesiny spor *Bacillus subtilis* i *Bacillus cereus* w zdefiniowanym zakresie stężeń, w czasie kontaktu 15 minut, w obecności zróżnicowanego obciążenia organicznego (warunki czyste i brudne) wg normy europejskiej PN-EN 17126: 2019-01.

**WYNIKI.** Preparat dezynfekcyjny zawierający kwas nadoctowy wykazywał działanie sporobójcze wobec *Bacillus subtilis* w stężeniu 1%, w czasie kontaktu 15 minut, w warunkach czystych i brudnych oraz w stężeniach 0,5%; 1,00%; 1,25% wobec spor *Bacillus cereus* w tym samym czasie kontaktu, tylko w warunkach brudnych. Preparat nie wykazywał aktywności sporobójczej wobec *Bacillus cereus* w stężeniach 2%, 3%, 4%, 5% w czasie kontaktu 15 minut zarówno w warunkach brudnych jak i czystych.

**WNIOSKI.** W obszarach niosących ze sobą ryzyko zakażenia pacjentów lub zanieczyszczenia próbek klinicznych, materiałów i sprzętu sporami *Bacillus* spp. istnieje konieczność stosowania preparatów o potwierdzonym w badaniach działaniu sporobójczym. Aktywność sporobójcza preparatów zawierających kwas nadoctowy może być uzależniona od sposobu przygotowania roztworów, ich stężenia, pH, temperatury oraz stopnia zanieczyszczenia dezynfekowanej powierzchni.

**Słowa kluczowe:** spory, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, preparaty dezynfekcyjne, kwas nadoctowy

## INTRODUCTION

The sporicidal effectiveness of disinfectants in the medical area has not yet been tested according to unified European Standards. In 2019, European Standard PN-EN 17126: 2019-01 was introduced to test the sporicidal effectiveness of disinfectants. It allows for determining the effectiveness of disinfectants in suspension tests corresponding to phase 2; stage 1. The scope of application of this standard covers disinfection of surfaces, instruments and textiles. The standard provides for two ranges of action of disinfectants – sporicidal range (sporicidal activity against the *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus* spores) and sporicidal activity against *Clostridioides difficile* (1).

*Bacillus* spp. are sporulating Gram-positive, aerobic bacteria responsible mainly for gastrointestinal infections and bloodstream infections, especially in immunocompromised patients and malignant neoplasms (2, 3). Endocarditis, meningitis, and, less frequently, respiratory tract infections have also been reported. *Bacillus* spp. may also contaminate clinical specimens, including blood samples (3). Clinical samples contaminated with *Bacillus* spp. may cause an inadequate diagnosis and treatment with unnecessary antibiotics, as well as prolonged hospitalisation (4). The most common source of *Bacillus* spp. infections is the hospital environment. In Japan, there have been bacteremia reported where the cause of infection was *Bacillus cereus*, transmitted from hospital linen and reusable towels (4, 5). The seasonality of this type of outbreaks has also been found. Most of them occurred in summer (2). Infections with *Bacillus cereus* have

## WSTĘP

Skuteczność sporobójcza preparatów dezynfekcyjnych w obszarze medycznym nie była jak dotychczas badana wg ujednoczonych standardów europejskich. Od 2019 roku do badań skuteczności sporobójczej preparatów dezynfekcyjnych wprowadzono Normę Europejską PN-EN 17126: 2019-01, która pozwala określić skuteczność działania preparatów dezynfekcyjnych w badaniach zawiesinowych odpowiadających fazie 2; etap 1. Zakres zastosowania normy obejmuje dezynfekcję powierzchni, narzędzi i tekstyliów. Norma przewiduje dwa zakresy działania produktów dezynfekcyjnych zakres sporobójczy (aktywność sporobójczą wobec spor *Bacillus subtilis* i *Bacillus cereus*) i sporobójczy wobec *Clostridioides difficile* (1).

Laseczki *Bacillus* spp. to zarodnikujące Gram-dodatnie bakterie tlenowe odpowiedzialne głównie za zakażenia przewodu pokarmowego oraz zakażenia krwi szczególnie u pacjentów z obniżoną opornością i nowotworami złośliwymi (2, 3). Stwierdzano również zapalenie wsierdza, zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych oraz rzadziej zakażenia układu oddechowego. *Bacillus* spp. może również powodować zanieczyszczenie próbek klinicznych, w tym próbek krwi (3). Próbki kliniczne zanieczyszczone *Bacillus* spp. mogą być przyczyną nieodpowiedniej diagnozy i leczenia z niepotrzebnym zastosowaniem antybiotyków oraz przedłużonego pobytu pacjentów w szpitalu (4). Źródłem zakażeń *Bacillus* spp. jest najczęściej środowisko szpitalne. W Japonii występowały bakteremie, gdzie przyczyną zakażenia był *Bacillus cereus* pochodzący z bielizny szpitalnej i ręczników wielorazowego użytku (4, 5). Stwierdzono również sezonowość występo-

also taken place in neonatal wards, where the source of neonatal infection was probably milk from the human milk bank (6).

The issue of fighting spores in the hospital environment is important because *Bacillus* spp. is transmitted in that environment and induces nosocomial infection (4). One of the ways to remove spores from surfaces, instruments or hospital linen is disinfection using disinfectants with sporicidal activity.

Peracetic acid is one of the active substances with a sporicidal effect. Its use in disinfection products ensures the required reduction of spores within a short contact time. For this reason, peracetic acid has been used not only for surface disinfection, but also in decontamination of reusable thermolabile equipment (7, 8). Under certain parameters and conditions of use, disinfection with the use of peracetic acid ensures the reduction of spores most similar to the sterilization processes, although it cannot replace sterilization where it is required, e.g. in the case of decontamination of heat-resistant reusable medical devices that come in contact with mucous membranes or disturb the continuity of tissues (8, 9). The advantage of peracetic acid is its low toxicity, especially when its content in products is lower than 1%. The sporicidal activity of peracetic acid depends on pH and temperature. The optimal activity of peracetic acid is achieved at neutral and alkaline pH values. A higher activity of peracetic acid has been observed at lower temperatures. Changes in the pH of solutions of products based on peracetic acid may affect their sporicidal activity (7, 9). Similarly, a decrease in peracetic acid concentration in products stored contrary to the manufacturer's recommendations has been observed (10).

#### AIM OF THE STUDY

The aim of the research was to determine the minimum sporicidal activity of a product containing peracetic acid in accordance with the principles set forth in the PN-EN 17126: 2019-01 standard intended to determine the sporicidal activity of disinfectants in the medical area. In addition, the aim of this publication was (i) to describe the methodological modifications related to the assumptions of the PN-EN 17126: 2019-01 standard that were applied during its implementation to laboratory practice, i.e. the use of the *Bacillus cereus* ATCC 10876 strain and different cultivation conditions to obtain a spore suspension with an appropriate number and resistance on a reference substance and (ii) to present the problems related to the test and evaluation of the sporicidal activity of a peracetic acid disinfectant.

wania tego typu ognisk. Większość z nich przypadała na okres letni (2). Zakażenia *Bacillus cereus* miały również miejsce na oddziałach neonatologicznych, gdzie źródłem zakażenia noworodków było prawdopodobnie mleko pochodzące z laktarium (6).

Zagadnienie zwalczania spor w środowisku szpitalnym jest istotne z punktu widzenia transmisji spor *Bacillus* spp. w środowisku szpitalnym i wywoływania zakażeń szpitalnych (4). Jednym ze sposobów usuwania spor z powierzchni, narzędzi czy też bielizny szpitalnej jest dezynfekcja z zastosowaniem preparatów dezynfekcyjnych o działaniu sporobójczym.

Kwas nadoctowy jest jedną z substancji aktywnych wykazujących działanie sporobójcze. Jego zastosowanie w produktach do dezynfekcji zapewnia wymaganą redukcję spor w krótkim czasie działania. Z tego względu kwas nadoctowy znalazł zastosowanie nie tylko do dezynfekcji powierzchni, ale również w dekontaminacji termolabilnego sprzętu wielorazowego użytku (7, 8). W określonych parametrach i warunkach stosowania, dezynfekcja z zastosowaniem kwasu nadoctowego zapewnia redukcję spor najbardziej zbliżoną do procesów sterylizacji, nie może jednak zastąpić sterylizacji tam gdzie jest ona wymagana, np. w przypadku dekontaminacji termoopornych wyrobów wielorazowego użytku kontaktujących się z błonami śluzowymi czy też naruszającymi ciągłość tkanek (8, 9). Zaletą kwasu nadoctowego jest niska toksyczność zwłaszcza wówczas gdy jego zawartość w produktach jest niższa niż 1%. Aktywność sporobójcza kwasu nadoctowego jest uzależniona od pH i temperatury. Optymalna aktywność kwasu nadoctowego jest osiągnięta w pH obojętnym i zasadowym. Wyższe aktywności kwasu nadoctowego były również obserwowane w niższych temperaturach. Zmiany w pH roztworów produktów na bazie kwasu nadoctowego mogą wpływać na ich aktywność sporobójczą (7, 9). Podobnie obserwowano spadek stężenia kwasu nadoctowego w produktach przechowywanych niezgodnie z zaleceniami producenta (10).

#### CEL PRACY

Celem badań było określenie minimalnej aktywności sporobójczej produktu zawierającego kwas nadoctowy zgodnie z założeniami normy PN-EN 17126: 2019-01 przeznaczonej do określania aktywności sporobójczej preparatów dezynfekcyjnych w obszarze medycznym. Ponadto celem pracy było (i) opisanie modyfikacji metodycznych dotyczących założeń normy PN-EN 17126: 2019-01 jakie zostały zastosowane podczas jej wdrażania do praktyki laboratoryjnej tj. zastosowanie szczepu *Bacillus cereus* ATCC 10876 i odmiennych warunków jego hodowli, aby uzyskać zawiesinę spor o odpowiedniej liczbie i oporności na substancję referencyjną oraz (ii) przedstawienie pro-

## MATERIALS AND METHODS

**Materials.** A disinfectant based on peracetic acid – 1% product solution (10 g of powder per liter of water) contains 0.15% of peracetic acid. Product solutions were prepared by dissolving samples (dissolution time up to 15 minutes) in hard water with a pH of 6.93-7.02. The sporicidal activity of the peracetic acid-based disinfectant was tested at the following concentrations: in the case of *Bacillus subtilis* ATCC 6633 spore suspension: 0.1%; 0.25%; 0.50%; 0.75%; 1.00%; in the case of *Bacillus cereus* ATCC 10876 spore suspension, in concentrations: 0.25%; 0.5%; 1.00%; 1.25%; 2.00%; 3.00%; 4.00%; 5.00%. Contact time of the product with both spore suspensions was 15 minutes; the study was performed in clean (0.3 g/l bovine albumin) and dirty conditions (3 g/l bovine albumin and 3 ml/l sheep erythrocytes).

Reference substance: Peracetic acid (PAA) – a solution with about 35% of peracetic acid in acetic acid, stabilized (manufacturer ACROS ORGANICS). From the 35% peracetic acid solution a 5% solution was prepared, in which the concentration of peracetic acid was determined by titration with a sodium thiosulfate solution. After determining the peracetic acid content in the starting solution, the solutions of final concentration in the test i.e. 0.5%; 0.05%; 0.001% were prepared against which the resistance of spores to peracetic acid was determined in accordance with the criteria of PN-EN 17126: 2019-01 (1).

**Spores.** Spores obtained by culturing the *Bacillus subtilis* ATCC 6633 and *Bacillus cereus* ATCC 10876 strains. The *Bacillus cereus* ATCC 10876 strain was used in the study instead of the *Bacillus cereus* ATCC 12826 strain, which cultured in accordance with the PN-EN 17126: 2019-01 methodology, did not produce spores.

1) The culture of *Bacillus subtilis* spores ATCC 6633 – the preparation of the spore suspension from the *Bacillus subtilis* culture was done by inoculating the strain on TSA (Tryptone Soya Agar) medium and incubating it for 24 hours at 37°C±1°C. A second passage was then prepared by streaking onto TSA medium and incubating for 24 hours at 37°C±1°C. One colony was seeded on TGB (Tryptone Glucose Broth) medium and incubated for 24 hours at 37°C±1°C. 2-3 ml of the culture was transferred to a Roux bottle with MYA (Meat Yeast extract Agar) medium and spread over the entire surface of the medium. The excess suspension was collected. The culture was incubated at 37°C±1°C for 10 days. After the first 3 days, microscopic observation was carried out to evaluate the sporulation. After 10 days, the spores were washed off with sterile distilled

blemów związanych z badaniem i oceną działania sporobójczego preparatu dezynfekcyjnego na bazie kwasu nadoctowego.

## MATERIAŁY I METODY

**Materiał.** Preparat dezynfekcyjny na bazie kwasu nadoctowego – 1% roztwór produktu (10 g proszku na litr wody) zawiera 0,15 % kwasu nadoctowego. Roztwory produktu były przygotowywane przez rozpuszczanie naważek (czas rozpuszczenia do 15 minut) w wodzie twardej o pH 6,93-7,02. Roztwory produktu były zużywane w badaniach w ciągu 2 godzin. Aktywność sporobójcza preparatu dezynfekcyjnego na bazie kwasu nadoctowego była badana w następujących parametrach: w przypadku zawiesiny spor *Bacillus subtilis* ATCC 6633 produkt badano w stężeniach: 0,1%; 0,25%; 0,50%; 0,75%; 1,00%; w przypadku zawiesiny spor *Bacillus cereus* ATCC 10876 w stężeniach 0,25%; 0,5%; 1,00%; 1,25%; 2,00%; 3,00%; 4,00%; 5,00%; czas kontaktu produktu z obiema zawiesinami wynosił 15 minut; badanie wykonano w warunkach czystych (0,3 g/l albuminy wołowej) i brudnych (3 g/l albuminy wołowej i 3 ml/l erytrocytów baranich). Substancja referencyjna: Kwas nadoctowy (PAA) – roztwór o zawartości około 35% kwasu nadoctowego w kwasie octowym, stabilizowany (producent ACROS ORGANICS). Z 35% roztworu kwasu nadoctowego przygotowywano roztwór 5%, w którym określano stężenie kwasu nadoctowego metodą miareczkowania roztworem tiosiarczynu sodu. Po ustaleniu zawartości kwasu nadoctowego w roztworze wyjściowym, przygotowywano roztwory o końcowych stężeniach w badaniu tj. 0,5%; 0,05%; 0,001% wobec których określano oporność spor na kwas nadoctowy zgodnie z kryteriami normy PN-EN 17126: 2019-01 (1).

**Spory.** Spory otrzymano w wyniku hodowli szczepów *Bacillus subtilis* ATCC 6633; *Bacillus cereus* ATCC 10876. Szczep *Bacillus cereus* ATCC 10876 został zastosowany w badaniach zamiast szczepu *Bacillus cereus* ATCC 12826, który hodowany zgodnie z metodyką PN-EN 17126: 2019-01 nie wytwarzał spor.

1) Hodowla spor *Bacillus subtilis* ATCC 6633 - przygotowanie zawiesiny do hodowli spor *Bacillus subtilis* wykonano poprzez posianie szczepu na podłoże TSA i inkubowanie 24 godziny w 37°C±1°C. Następnie przygotowano drugi pasaż przez wykonanie posiewu redukcyjnego na podłoże TSA (Tryptone Soya Agar) i inkubowano przez 24 godziny w 37°C±1°C. Posiano 1 kolonię na podłoże TGB (Tryptone Glucose Broth) i inkubowano 24 godziny w 37°C±1°C. Przeniesiono 2-3 ml hodowli do butli Roux z podłożem MYA (Meat Yeast extract Agar) i rozprowadzono po całej powierzchni podłoża. Nadmiar zawiesiny zebrano. Hodowlę inkubowano w 37°C±1°C przez 10 dni. Po pierw-



water. The obtained suspension was subjected to purification by 4 consecutive washes with 30 ml of sterile distilled water and by centrifugation at 4000 g<sub>N</sub> for 20 minutes. The resultant suspension was heated for 10 minutes at 75°C±1°C. In order to determine the number of spores, a series of dilutions in sterile distilled water was prepared and the spore suspension dilutions were plated on TSA using the pour plate method. The required spore density was 1.5-5×10<sup>7</sup> cfu/ml. The spore suspension was sealed in a screw cap tube with glass beads and left in the refrigerator for 4 weeks for the spores to mature.

Prior to being used to test disinfectant activity, the *Bacillus subtilis* spore suspension was tested for peracetic acid resistance of the spores. The parameters of the spore resistance test are as follows: 0.001% peracetic acid, contact time 30 minutes, required lg reduction <3; and 0.05% peracetic acid, contact time 30 minutes, required lg reduction ≥3. The spore resistance studies were performed without an interfering substance. The spore suspension density for the spore resistance test was 1.5-5×10<sup>6</sup> cfu/ml.

2) The culture of *Bacillus cereus* spores ATCC 10876. The preparation of the spore suspension for the *Bacillus cereus* culture was performed according to PZH DF 03/03: 2003.02.07 (11). *Bacillus cereus* was inoculated on TSA medium and incubated for 48 hours at 37°C±1°C. Then a second passage was prepared by inoculating it on TSB medium and incubating for 24 hours at 37°C±1°C. From the culture obtained, 5 ml were taken and spread on a surface prepared using 200 ml of manganese salt agar medium. The medium was solidified 72 hours prior to the inoculation in a horizontally arranged Roux bottle. The culture was incubated for 10 days at 37°C±1°C. The culture was then washed off by adding 25 ml of Ringer's solution. The obtained spore suspension was purified by 4 successive washes with 30 ml of sterile distilled water and by centrifugation at 4000 g<sub>N</sub> for 20 minutes. The resultant suspension was heated for 10 minutes at 75°C±1°C. The required spore density was 1.5-5×10<sup>7</sup> cfu/ml. The spore suspension was sealed in a screw cap tube with glass beads and left in the refrigerator for 4 weeks for the spores to mature. The spore suspension of *Bacillus cereus* was checked for resistance to peracetic acid before being used for testing disinfectants activity. The parameters of the spore resistance test are as follows: 0.05% peracetic acid, contact time 30 minutes, required lg reduction <3; and 0.5% peracetic acid, contact time 30 minutes, required lg reduction ≥3. The spore resistance studies were performed without an interfering substance. The spore suspension density for the spore resistance tests was 1.5-5×10<sup>6</sup> cfu/ml.

szych 3 dniach dokonywano obserwacji mikroskopowej w celu oceny sporulacji. Po 10 dniach spory sflukiwano jałową wodą destylowaną. Uzyskaną zawiesinę podawano oczyszczaniu poprzez 4 kolejne płukania 30 ml jałowej wody destylowanej i przez wirowanie przy 4000 g<sub>N</sub> przez 20 minut. Tak przygotowaną zawiesinę ogrzewano 10 minut w 75°C±1°C. W celu określenia liczebności spor przygotowywano szereg rozcieńczeń w jałowej wodzie destylowanej i rozcieńczenia zawiesiny spor wysiewano na podłoże TSA metodą posiewu wgłębnego. Wymagana gęstość spor 1,5-5×10<sup>7</sup> cfu/ml. Zawiesinę spor zamknięto w zakręcanej probówce z kulkami szklanymi i pozostawiono w lodówce na 4 tygodnie, aby spory osiągnęły dojrzałość.

Przed zastosowaniem do badań zawiesinę spor *Bacillus subtilis* sprawdzano w kierunku oporności spor na kwas nadoctowy. Parametry badania oporności spor to: 0,001% kwas nadoctowy, czas działania 30 minut, wymagana redukcja <3 w dziesiątej skali logarytmicznej oraz 0,05% kwas nadoctowy, czas działania 30 minut, wymagana redukcja ≥3 w dziesiątej skali logarytmicznej. Badania oporności spor wykonywano bez obciążenia organicznego. Gęstość zawiesiny spor w przypadku badań oporności spor wynosiła 1,5-5×10<sup>6</sup> spor/ml.

2) Hodowla spor *Bacillus cereus* ATCC 10876. Przygotowanie zawiesiny do hodowli spor *Bacillus cereus* wykonano zgodnie z PZH DF 03/03: 2003.02.07 (11). *Bacillus cereus* był posiany na podłoże TSA i inkubowany przez 48 godzin w 37°C±1°C. Następnie przygotowano drugi pasaż przez wykonanie posiewu na podłoże TSB i inkubację 24 godziny w 37°C±1°C. Z otrzymanej hodowli pobrano 5 ml i posiano na powierzchnię uzyskaną z 200 ml podłoża agarowego z solami manganu. Podłoże zostało zestalone na 72 godziny przed posiewem w poziomo ułożonej butli Roux. Hodowlę inkubowano 10 dni w 37°C±1°C. Następnie hodowlę sflukowano przez dodanie 25 ml płynu Ringera. Uzyskaną zawiesinę spor poddano oczyszczaniu poprzez 4 kolejne płukania 30 ml jałowej wody destylowanej i przez wirowanie przy 4000 g<sub>N</sub> przez 20 minut. Tak przygotowaną zawiesinę ogrzewano 10 minut w 75°C±1°C. Wymagana gęstość spor 1,5-5×10<sup>7</sup> cfu/ml. Zawiesinę spor zamknięto w zakręcanej probówce z kulkami szklanymi i pozostawiano w lodówce na 4 tygodnie aby spory osiągnęły dojrzałość.

Przed zastosowaniem do badań zawiesinę spor *Bacillus cereus* sprawdzano w kierunku oporności spor na kwas nadoctowy. Parametry badania oporności spor to: 0,05% kwas nadoctowy, czas działania 30 minut, wymagana redukcja <3 w dziesiątej skali logarytmicznej oraz 0,5% kwas nadoctowy, czas działania 30 minut, wymagana redukcja ≥3 w dziesiątej skali logarytmicznej. Badania oporności spor wykonywano bez obciążenia organicznego. Gęstość zawiesiny spor

**Method.** Testing the resistance of spores to peracetic acid and the activity of the product containing peracetic acid was carried out according to the quantitative suspension method described in the PN-EN 17126: 2019-01 standard intended to determine the sporicidal activity of disinfectants used in the medical area (1). The method involves combining a test product or reference substance with a spore suspension in an interfering substance. In the case of testing the resistance of spores to peracetic acid, peracetic acid was combined with a suspension of spores in sterile distilled water. The mixture was left for the specified contact time  $t$ , which was 15 minutes in the case of the tested product and 30 minutes in the case of the spore resistance test. The mixtures were then transferred to the neutraliser (Polysorbate 8 – 10 g/l; lecithin – 3 g/l; sodium thiosulfate – 5 g/l in the diluent). After the neutralization time, the mixtures from  $10^0$  and  $10^{-1}$  were flooded with TSA medium and incubated for 48 hours at  $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ . In parallel, the experimental conditions and their lethal effect on the bacterial spores (A), the influence of the neutralizer toxicity on the spore suspension (B) and the dilution-neutralization method validation (C) were performed. Spore reduction, expressed on a lg decimal scale, was calculated from the difference between the number of colonies in the spore suspension before the treatment with the product/reference substance and the average number of colonies obtained after the treatment with the test product/reference substance. The product has a sporicidal activity if, in certain disinfection parameters, it demonstrates the reduction of spore  $\geq 4$  on a decimal logarithmic scale. The results presented in the study were obtained with the method reproducibility according to PN-EN 17126: 2019-01 amounting to  $\pm 0.09$  on a logarithmic decimal scale.

## RESULTS

**The resistance of the *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus* spores to peracetic acid.** The parameters tested – peracetic acid concentration 0.001% and contact time  $t=30$  minutes – reduced the *Bacillus subtilis* spores below  $<3$  on a decimal logarithmic scale. The *Bacillus subtilis* spores met the requirements of PN-EN 17126: 2019-01 and showed resistance to the parameters applied. The parameters used – peracetic acid concentration 0.05% and contact time  $t=30$  minutes – did not cause the required reduction of the *Bacillus subtilis* spores. The *Bacillus subtilis* spores were resistant to the above parameters recommended in PN-EN 17126: 2019-01. The achieved reduction averaged 1.71 on a decimal logarithmic scale and was less than  $\geq 3$  on a decimal logarithmic scale (Table I). The *Bacillus subtilis* spore

w przypadku badań oporności spor wynosiła  $1,5-5\times 10^6$  spor/ml (1).

**Metoda.** Badanie oporności spor na kwas nadocetowy oraz aktywności produktu zawierającego kwas nadocetowy wykonano wg ilościowej zawiesinowej metody PN-EN 17126: 2019-01 przeznaczonej do określania aktywności sporobójczej preparatów dezynfekcyjnych stosowanych w obszarze medycznym (1). Zasada metody polega na połączeniu badanego produktu/substancji referencyjnej z zawiesiną spor w obciążeniu organicznym. W przypadku badania oporności spor na kwas nadocetowy był on łączony z zawiesiną spor zawieszoną w jałowej wodzie destylowanej. Mieszanina była pozostawiana na określony czas kontaktu  $t$ , który w przypadku badanego produktu wynosił 15 minut natomiast w przypadku badania oporności spor 30 minut. Następnie mieszaniny były przenoszone do inaktywatora (Polisorbat 8 – 10 g/l; lecytyna – 3 g/l; tiosiarczan sodu – 5 g/l w rozcieńczalniku). Po czasie neutralizacji mieszaniny z  $10^0$  i  $10^{-1}$  wysiewano na podłoże TSA metodą zalewową i inkubowano przez 48 godzin w temperaturze  $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Równoległe wykonywano kontrolę warunków eksperymentalnych i ich wpływu letalnego na spory bakterii (A), kontrolę wpływu toksyczności neutralizatora na zawiesinę spor (B) oraz walidację metody rozcieńczania-neutralizacji (C). Redukcja spor, wyrażona w dziesiątej skali logarytmicznej, była obliczana z różnicy otrzymanej z liczby kolonii w zawiesinie przed działaniem produktu/substancji referencyjnej oraz średniej liczby kolonii uzyskanej po działaniu badanego produktu/substancji referencyjnej. Produkt działa sporobójczo jeśli w określonych parametrach dezynfekcji wykazuje redukcję spor  $\geq 4$  w dziesiątej skali logarytmicznej. Prezentowane w pracy wyniki uzyskano przy odtwarzalności metody wg PN-EN 17126: 2019-01 wynoszącej  $\pm 0,09$  w dziesiątej skali logarytmicznej.

## WYNIKI

**Oporność spor *Bacillus subtilis* i *Bacillus cereus* na kwas nadocetowy.** Badane parametry: stężenie kwasu nadocetowego 0,001% i czas kontaktu  $t=30$  minut powodowały redukcje spor *Bacillus subtilis* poniżej  $<3$  w dziesiątej skali logarytmicznej. Spory *Bacillus subtilis* spełniały wymagania normy PN-EN 17126: 2019-01 i wykazywały oporność wobec założonych parametrów. Zastosowane parametry – stężenie kwasu nadocetowego 0,05% i czas kontaktu  $t=30$  minut – nie powodowały wymaganej redukcji spor *Bacillus subtilis*. Spory *Bacillus subtilis* były odporne wobec powyższych parametrów zalecanych w normie PN-EN 17126: 2019-01. Osiągnięta redukcja wynosiła średnio 1,71 w dziesiątej skali logarytmicznej i była niższa niż  $\geq 3$  w dziesiątej skali logarytmicznej (Tabela I). Zawie-

Table I. Resistance of *Bacillus subtilis* ATCC 6633 spore suspension to peracetic acidTabela I. Oporność zawiesiny spor *Bacillus subtilis* ATCC 6633 na kwas nadoctowy

Reference substance	Concentration [%]	Contact time [min]	Required reduction [lg]	Obtained reduction [lg]
Peracetic acid	0.001	30	<3	<0.65
Peracetic acid	0.05	30	≥3	1.71

suspension was qualified for further studies because the spores obtained showed a higher resistance to the concentration of the reference substance used than expected in the PN-EN 17126: 2019-01 standard, and thus set higher requirements for the tested product in accordance with the “over-kill” principle. The parameters tested – peracetic acid concentration 0.05% and contact time  $t=30$  minutes – resulted in the reduction of the *Bacillus cereus* spores below <3 on a decimal logarithmic scale. The *Bacillus cereus* spores met the requirements of PN-EN 17126: 2019-01 and showed resistance to the parameters applied. Similarly, the use of a higher peracetic acid concentration, 0.5%, and the same contact time  $t=30$  minutes resulted in achieving the reduction of the *Bacillus cereus* spores required by the standard. The *Bacillus cereus* spores were sensitive to the above parameters. The achieved reduction was on average >3.38 on a decimal logarithmic scale and was higher than ≥3 on a decimal logarithmic scale. The resistance of the *Bacillus cereus* spores to peracetic acid as the reference substance met the requirements of PN-EN 17126: 2019-01 (Table II).

sina spor *Bacillus subtilis* została zakwalifikowana do dalszych badań, ponieważ uzyskane spory wykazywały wyższą oporność na zastosowane stężenie substancji referencyjnej niż przewidziano w normie PN-EN 17126: 2019-01, a tym samym stawiały wyższe wymagania badanemu produktowi zgodnie z zasadą „nadzabicia”. Badane parametry: stężenie kwasu nadoctowego 0,05% i czasu kontaktu  $t=30$  minut powodowały redukcje spor *Bacillus cereus* poniżej <3 w dziesiętnej skali logarytmicznej. Spory *Bacillus cereus* spełniały wymagania normy PN-EN 17126: 2019-01 i wykazywały oporność wobec założonych parametrów. Podobnie zastosowanie wyższego stężenia kwasu nadoctowego 0,5% i takiego samego czasu kontaktu  $t=30$  minut spowodowało osiągnięcie wymaganej normą redukcji spor *Bacillus cereus*. Spory *Bacillus cereus* były wrażliwe wobec powyższych parametrów. Osiągnięta redukcja wynosiła średnio >3,38 w dziesiętnej skali logarytmicznej i była wyższa niż ≥3 w dziesiętnej skali logarytmicznej. Oporność spor *Bacillus cereus* wobec kwasu nadoctowego jako substancji referencyjnej spełniała wymagania normy PN-EN 17126: 2019-01 (Tabela II).

Table II. Resistance of *Bacillus cereus* ATCC 10876 spore suspension to peracetic acidTabela II. Oporność zawiesiny spor *Bacillus cereus* ATCC 10876 na kwas nadoctowy

Reference substance	Concentration [%]	Contact time [min]	Required reduction [lg]	Obtained reduction [lg]
Peracetic acid	0.05	30	<3	<1.02
Peracetic acid	0.5	30	≥3	>3.38

**The sporicidal activity of the product with peracetic acid.** The tested disinfectant showed sporicidal activity against the spore suspension of *Bacillus subtilis* ATCC 6633 at a concentration of 1% during a contact time of 15 minutes, under clean conditions, and at a concentration of 0.75% and 1% during a contact time of 15 minutes, under dirty conditions. The pH of the solutions showing sporicidal activity ranged from 7.88 to 7.99 (Fig. 1 and 2). The sporicidal activity of the tested disinfecting preparation against the spore suspension of *Bacillus cereus* ATCC 10876 was observed only under dirty conditions at concentrations of 0.5%, 1% and 1.25% with a contact time of 15 minutes. The decrease in activity at higher concentrations could be related to

**Aktywność sporobójcza produktu na bazie kwasu nadoctowego.** Badany preparat dezynfekcyjny wykazywał aktywność sporobójczą wobec zawiesiny spor *Bacillus subtilis* ATCC 6633 w stężeniu 1% w czasie kontaktu 15 minut, w warunkach czystych oraz w stężeniu 0,75% i 1% w czasie kontaktu 15 minut, w warunkach brudnych. pH roztworów wykazujących aktywność sporobójczą wynosiło od 7,88 do 7,99 (Ryc. 1 i 2). Aktywność sporobójczą badanego preparatu dezynfekcyjnego wobec zawiesiny spor *Bacillus cereus* ATCC 10876 zaobserwowano tylko w warunkach brudnych w stężeniach 0,5%; 1%; 1,25% w czasie kontaktu 15 minut. Spadek aktywności w wyższych stężeniach mógł być związany ze wzrostem pH roztworów. Wzrost pH roztworów preparatu dezynfekcyjnego od

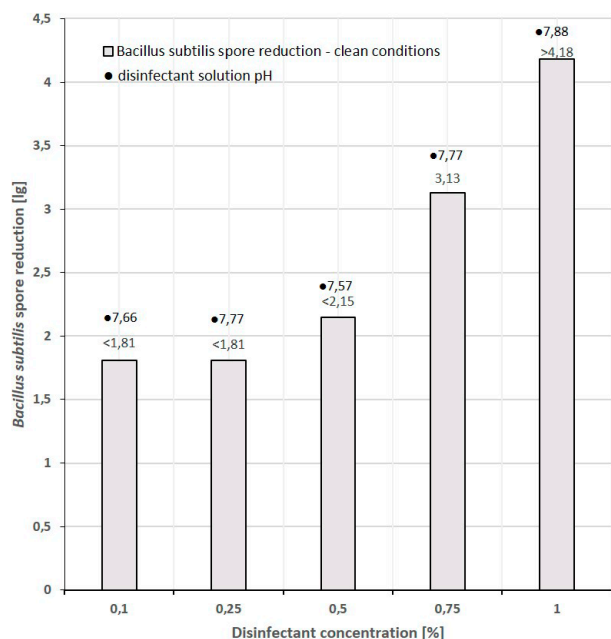


Fig. 1. Sporicidal activity against a *Bacillus subtilis* ATCC 6633 spore suspension of a disinfectant with peracetic acid and the pH of its solutions. Test conditions: concentration range: 0.1%; 0.25%; 0.50%; 0.75%; 1.00%; contact time: 15 minutes; temperature: 20°C; clean conditions: 0.3 g/l bovine albumin; density of the *Bacillus subtilis* ATCC 6633 spore suspension –  $1.5 \cdot 10^7$  cfu/ml.

Ryc. 1. Działanie sporobójcze wobec zawiesiny spor *Bacillus subtilis* ATCC 6633 preparatu dezynfekcyjnego zawierającego kwas nadooctowy oraz pH jego roztworów; warunki badania: zakres stężeń: 0,1%; 0,25%; 0,50%; 0,75%; 1,00%; czas kontaktu: 15 minut; temperatura 20°C; warunki czyste: 0,3 g/l albuminy wołowej; gęstość zawiesiny spor *Bacillus subtilis* ATCC 6633 –  $1,5 \cdot 10^7$  cfu/ml.

the increase in the pH of the solutions. An increase in the pH of the disinfectant solutions from 8.25 to 9.09 was observed at higher concentrations (2%; 3%; 4%; 5%), in which no sporicidal activity of the preparation against the *Bacillus cereus* spores was observed under dirty conditions (Fig. 4). There was also no sporicidal effect at higher concentrations, under clean conditions. The disinfecting preparation also showed no sporicidal activity against the *Bacillus cereus* spores under clean conditions, at concentrations of 0.5%, 1% and 1.25%, where the pH of the solutions ranged from 7.85 to 8.19, while only in the case of the 1.25% concentration did it exceed the pH value of 8 (Fig. 3).

Taking into account the obtained test results, it was established that the tested disinfecting preparation exhibits sporicidal activity at a concentration of 1% (0.15% peracetic acid) during a contact time of 15 minutes, at a temperature of 20°C, under clean and dirty conditions.

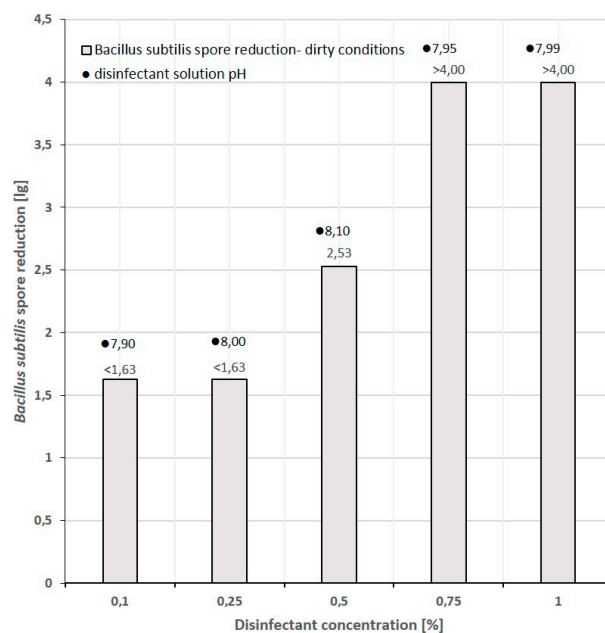


Fig. 2. Sporicidal activity against a *Bacillus subtilis* ATCC 6633 spore suspension of a disinfectant with peracetic acid and the pH of its solutions; test conditions: concentration range: 0.1%; 0.25%; 0.50%; 0.75%; 1.00%; contact time: 15 minutes; temperature: 20°C; dirty conditions: 3 g/l bovine albumin and 3 ml/l sheep erythrocytes; strain: density of the *Bacillus subtilis* ATCC 6633 spore suspension –  $1.5 \cdot 10^7$  cfu/ml.

Ryc. 2. Działanie sporobójcze wobec zawiesiny spor *Bacillus subtilis* ATCC 6633 preparatu dezynfekcyjnego zawierającego kwas nadooctowy oraz pH jego roztworów; warunki badania: zakres stężeń: 0,1%; 0,25%; 0,50%; 0,75%; 1,00%; czas kontaktu: 15 minut; temperatura 20°C; warunki brudne: 3 g/l albuminy wołowej i 3 ml/l erytrocytów baranich; szczep: *Bacillus subtilis* ATCC 6633 – zawiesina spor o gęstości  $1,5 \cdot 10^7$  cfu/ml.

8,25 do 9,09 obserwowano w wyższych stężeniach (2%; 3%; 4%; 5%) w warunkach brudnych, w których nie stwierdzano aktywności sporobójczej preparatu wobec spor *Bacillus cereus*. (Ryc. 4). Nie zaobserwowano również działania sporobójczego w wyższych stężeniach, w warunkach czystych. Preparat dezynfekcyjny nie wykazywał również aktywności sporobójczej wobec spor *Bacillus cereus* w warunkach czystych, w stężeniach 0,5%; 1%; 1,25%; gdzie zakres pH roztworów wynosił od 7,85 do 8,19 i tylko w przypadku stężenia 1,25 % przekraczał wartość pH równą 8 (Ryc.3).

Biorąc pod uwagę uzyskane wyniki badań ustalono, że badany preparat dezynfekcyjny wykazuje aktywność sporobójczą w stężeniu 1% (0,15% kwasu nadooctowego) w czasie kontaktu 15 minut, w temperaturze 20°C, w warunkach czystych i brudnych.



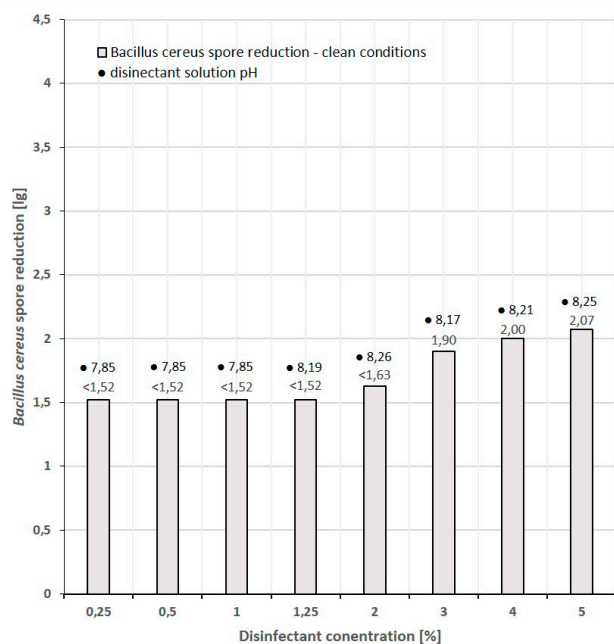


Fig. 3. Sporocidal activity against a *Bacillus cereus* ATCC 10876 spore suspension of a disinfectant with peracetic acid and the pH of its solutions; test conditions: concentration range: 0.25%; 0.5%; 1.00%; 1.25%; 2.00%; 3.00%; 4.00%; 5.00%; contact time: 15 minutes; temperature: 20°C; clean conditions: 0.3 g/l bovine albumin; density of the *Bacillus cereus* ATCC 10876 spore suspension –  $1.5 \cdot 5 \times 10^7$  cfu/ml.

Ryc. 3. Działanie sporobójcze wobec zawiesiny spor *Bacillus cereus* ATCC 10876 preparatu dezynfekcyjnego zawierającego kwas nadoctowy oraz pH jego roztworów; warunki badania: zakres stężeń: 0,25%; 0,5%; 1,00%; 1,25%; 2,00%; 3,00%; 4,00%; 5,00%; czas kontaktu: 15 minut; temperatura 20°C; warunki czyste: 0,3 g/l albuminy wołowej; gęstość zawiesiny spor *Bacillus cereus* ATCC 10876 –  $1,5 \cdot 5 \times 10^7$  cfu/ml.

## DISCUSSION

Infections caused by *Bacillus* spp. in the hospital environment can be prevented through the use of appropriate disinfectants with disinfection parameters determined in biocidal effectiveness tests. The use of improperly selected disinfectants with inadequate disinfection parameters makes disinfection ineffective and contributes to the survival of microorganisms resistant to the disinfectants (12). Bacterial spores are one of the most resistant forms of microorganisms, resistant to both physical and chemical factors (3, 12). Eliminating them requires highly reactive active substances, such as aldehydes, chlorine derivatives, hydrogen peroxide or peracetic acid, with appropriately defined parameters – concentration, contact time, temperature, clean or dirty conditions (12, 13). According to Staniszevska 2006, different research methods used to determine

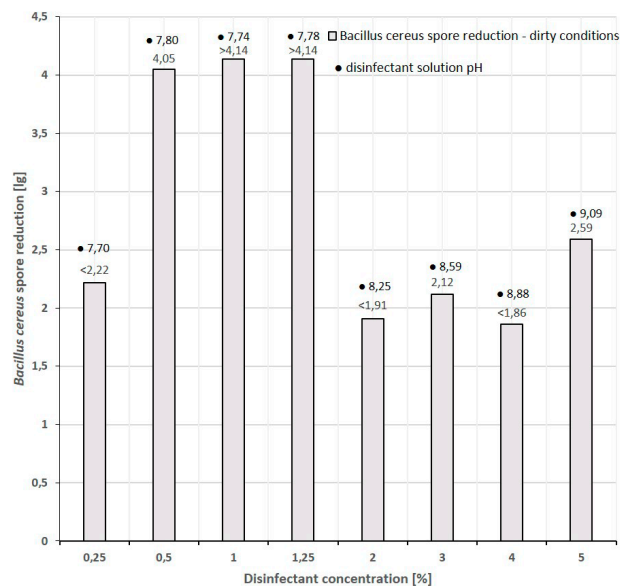


Fig. 4. Sporocidal activity against a *Bacillus cereus* ATCC 10876 spore suspension of a disinfectant with peracetic acid and the pH of its solutions; test conditions: concentration range: 0.25%; 0.5%; 1.00%; 1.25%; 2.00%; 3.00%; 4.00%; 5.00%; contact time: 15 minutes; temperature: 20°C; dirty conditions: 3 g/l bovine albumin and 3 ml/l sheep erythrocytes; density of the *Bacillus cereus* ATCC 10876 spore suspension –  $1.5 \cdot 5 \times 10^7$  cfu/ml.

Ryc. 4. Działanie sporobójcze wobec zawiesiny spor *Bacillus cereus* ATCC 10876 preparatu dezynfekcyjnego zawierającego kwas nadoctowy oraz pH jego roztworów; warunki badania: zakres stężeń: 0,25%; 0,5%; 1,00%; 1,25%; 2,00%; 3,00%; 4,00%; 5,00%; czas kontaktu: 15 minut; temperatura 20°C; warunki brudne: 3 g/l albuminy wołowej i 3 ml/l erytrocytów baranich; gęstość zawiesiny spor *Bacillus cereus* ATCC 10876 –  $1,5 \cdot 5 \times 10^7$  cfu/ml.

## DYSKUSJA

Zapobieganie zakażeniom wywoływanym przez spory *Bacillus* spp. w środowisku szpitalnym jest możliwe dzięki zastosowaniu właściwych preparatów dezynfekcyjnych w parametrach dezynfekcji wyznaczonych w badaniach skuteczności biobójczej. Stosowanie niewłaściwie dobranych preparatów dezynfekcyjnych w nieodpowiednich parametrach dezynfekcji powoduje, że dezynfekcja jest nieskuteczna i przyczynia się do przeżywania mikroorganizmów opornych na preparaty dezynfekcyjne (12). Spory bakterii to jedne z najbardziej opornych form mikroorganizmów, opornych zarówno na czynniki fizyczne jak i chemiczne (3, 12). Ich zwalczanie wymaga zastosowania silnie reaktywnych substancji aktywnych takich jak: aldehydy, pochodne chloru, nadtlenek wodoru czy też kwas nadoctowy w odpowiednio określonych parametrach: stężenia, czasu kontaktu, temperatury, obciążenia or-

the sporicidal activity of disinfectants may yield different results, which is not conducive to establishing the correct parameters of disinfectant use (14). Currently in the medical area, it is possible to determine the sporicidal activity of disinfectants using standardized suspension methods according to European Standard PN-EN 17126: 2019-01 (1). However, not all the test conditions it contains can be implemented in laboratory practice. One of them is obtaining a specific density of the spore suspension and determining the resistance of obtained spore suspensions in accordance with the requirements of PN-EN 17126: 2019-01. In the present study, a strain of *Bacillus cereus* other than the standard specified in the standard was used to obtain a spore suspension, as well as other cultivation conditions. Nevertheless, the resistance of *Bacillus cereus* spores to peracetic acid was in accordance with the requirements of the standard.

According to the literature data, the *Bacillus subtilis* spores are more sensitive to peracetic acid than the *Bacillus cereus* spores (12). In the presented resistance studies, the *Bacillus subtilis* spore suspension showed a higher resistance to peracetic acid (0.05%, 30 minutes) than that prescribed by the standard. The *Bacillus subtilis* spores were eliminated by the test product at a concentration of 0.75-1% during a contact time of 15 minutes, where the peracetic acid content was 0.11-0.15%. The tested product showed reductions of the *Bacillus cereus* spores at the level required by the standard ( $\geq 4$  on a lg decimal scale) in concentrations from 0.5% to 1.25% i.e. with a lower peracetic acid content (0.075-0.19%) and a shorter contact time (15 minutes) than for the resistance parameters defined by the standard (0.5%; 30 minutes). Due to this, the range of activity of the tested product indicates similar resistance of spores obtained from the *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus* strains. Taking into account the results of the product activity obtained for both spore suspensions, the minimum disinfection parameters were set at a concentration of 1% and a contact time of 15 minutes at a temperature of 20°C, under clean conditions and dirty conditions. When it comes to the results obtained for the *Bacillus cereus* spore suspension in clean conditions, they were omitted due to the activity of the test preparation obtained under dirty conditions, i.e. with a higher organic load containing 10 times more bovine albumin and sheep blood erythrocytes.

Disinfectants containing peracetic acid are considered sensitive to the presence of organic pollutants, including blood contamination. The presence of blood can significantly reduce the effect of oxidizing agents, including peracetic acid (7, 15).

ganicznego (12, 13). Wg Staniszewskiej 2006 różne metody badawcze stosowane w określaniu sporobójczości preparatów dezynfekcyjnych mogą dawać różne wyniki, co nie sprzyja ustaleniu prawidłowych parametrów stosowania preparatów (14). Obecnie w obszarze medycznym istnieje możliwość określenia aktywności sporobójczej preparatów dezynfekcyjnych z wykorzystaniem ujednoczonych metod zawiesinowych wg normy europejskiej PN-EN 17126: 2019-01. Jednakże nie wszystkie zapisane w niej warunki badania można wdrożyć w praktyce laboratoryjnej. Jednym z nich jest uzyskiwanie określonej gęstości zawiesiny spor i określenie oporności uzyskiwanych zawiesin spor zgodnie z wymaganiami normy PN-EN 17126: 2019-01 (1). W prezentowanych badaniach do uzyskania zawiesiny spor zastosowano inny niż przewidziany normą szczep *Bacillus cereus* oraz inne warunki hodowli. Mimo to oporność spor *Bacillus cereus* na kwas nadoctowy była zgodna z wymaganiami normy.

Wg danych literaturowych spory *Bacillus subtilis* są bardziej wrażliwe na kwas nadoctowy niż spory *Bacillus cereus* (12). W przedstawionych badaniach zawiesina spor *Bacillus subtilis* wykazywała wyższą oporność na kwas nadoctowy (0,05%, 30 minut) niż przewidziana normą. Spory *Bacillus subtilis* były zwalczane przez badany produkt w stężeniu 0,75%-1% w czasie 15 minut, gdzie zawartość kwasu nadoctowego wynosiła 0,11%-0,15%. Badany produkt wykazywał redukcje spor *Bacillus cereus* na poziomie wymaganym normą ( $\geq 4$  w dziesiętnej skali logarytmicznej) w stężeniach od 0,5% do 1,25% czyli przy niższej zawartości kwasu nadoctowego w badanym preparacie (0,075%-0,19%) i w krótszym czasie kontaktu (15 minut) niż w przypadku parametrów oporności określonych normą (0,5%; 30 minut). Z uwagi na to zakres działania badanego produktu wskazuje na podobną oporność spor uzyskanych ze szczepów *Bacillus subtilis* i *Bacillus cereus*. Biorąc pod uwagę wyniki aktywności produktu uzyskane dla obu zawiesin spor minimalne parametry dezynfekcji ustalono na 1% i czas kontaktu 15 minut w temperaturze 20°C, w warunkach czystych i warunkach brudnych. Wyniki uzyskane wobec zawiesiny spor *Bacillus cereus* w warunkach czystych zostały pominięte z uwagi na aktywność badanego preparatu uzyskaną w warunkach brudnych, czyli przy wyższym obciążeniu organicznym zawierającym 10 razy więcej albuminy wołowej oraz erythrocyty krwi baraniej.

Preparaty zawierające kwas nadoctowy są uznawane jako wrażliwe na obecność zanieczyszczeń organicznych, w tym na zanieczyszczenie krwią. Obecność krwi może w znaczący sposób zmniejszyć działanie preparatów utleniających w tym kwasu nadoctowego (7, 15). Wg Kutrowskiej 2005 kwas nadoctowy nie jest odporny na zanieczyszczenia białkowe, pomimo, że ma mniejszy bład proteinowy niż wykazujący dzia-

According to Kutrowska 2005, peracetic acid is not resistant to protein contamination, despite the fact that it has a lower protein error than glutaraldehyde, which exhibits sporicidal activity (13). The sporicidal activity of preparations based on peracetic acid may also depend on the pH of the obtained product solutions and their solubility. According to Szumska, the best biocidal activity of peracetic acid is within the pH range from 3 to 8.5 (9). In the case of more alkaline solutions, achieving sporicidal effectiveness requires a higher content of peracetic acid and longer contact times (12, 13). In the conducted research, the use of higher concentrations of peracetic acid resulted in an increase in the pH of the solutions (pH > 8.25), which in turned could have resulted in a decrease in the activity of the tested product and the lack of the required reduction of *Bacillus cereus* spores. According to other literature data, peracetic acid dominates in a solution at a pH below 8.2, while at a higher pH, the peracetate ion dominates (7).

In the case of powder formulations, peracetic acid can be generated by the reaction of sodium percarbonate and TAED (tetraacetyloxyethylene diamine). It is believed that powdered preparations containing peracetic acid are usable for up to 3 years from the date of production, while their solutions are not stable and should be replaced frequently (16). The different sporicidal activity of the tested product found in the study could be related to its properties resulting from the powder production process itself and the variable release of peracetic acid after dissolving the product. According to Tarka, the activity of a solution containing peracetic acid may remain at the same level or increase for 60 minutes from the moment of dissolution, after which time the concentration of peracetic acid may decrease (7). All these features of preparations containing peracetic acid may influence the effectiveness of their sporicidal activity. The prerequisite for using powdered preparations for disinfection is their complete solubility, especially if such a type of product is used for disinfecting endoscopes (7, 8). Preparations intended for use should be stable. Producers of disinfectants containing peracetic acid as the active substance should provide a detailed method of preparing solutions of this type of products and specify their shelf life.

## CONCLUSIONS

In areas where there is a risk of infecting patients or contaminating clinical specimens, materials and equipment with *Bacillus* spp, it is necessary to use preparations with confirmed sporicidal activity. The PN-EN 17126: 2019-01 standard using the sporicidal suspension method enables the assessment of the

łanie sporobójcze aldehyd glutarowy (13). Aktywność sporobójcza preparatów na bazie kwasu nadooctowego może zależeć również od pH uzyskiwanych roztworów produktów oraz ich rozpuszczalności. Wg Szumska najlepszą aktywność biobójczą kwas nadooctowy wykazuje w zakresie pH od 3 do 8,5 (9). W przypadku bardziej alkalicznego pH roztworów osiągnięcie skuteczności sporobójczej wymaga wyższej zawartości kwasu nadooctowego i dłuższych czasów kontaktu (12, 13). W przeprowadzonych badaniach zastosowanie wyższych stężeń kwasu nadooctowego powodowało wzrost pH roztworów (pH > 8,25), co mogło wpłynąć na spadek aktywności badanego produktu oraz brak wymaganej redukcji spor *Bacillus cereus*. Wg innych danych literaturowych kwas nadooctowy dominuje w roztworze przy pH poniżej 8,2 natomiast przy wyższym pH w przygotowanym roztworze dominuje jon nadooctanowy (7).

Kwas nadooctowy w przypadku preparatów w postaci proszku może być generowany w reakcji nadwęglanu sodu oraz TAED (tetraacetyloetylenodiamina). Uważa się, że preparaty w proszku zawierające kwas nadooctowy wykazują przydatność do użycia do 3 lat od daty produkcji, natomiast ich roztwory nie są trwałe i należy je często wymieniać (16). Uzyskiwana w badaniach zróżnicowana aktywność sporobójcza badanego produktu mogła być związana z właściwościami badanego produktu wynikającymi z samego procesu produkcji proszku i zmiennym uwalnianiem kwasu nadooctowego po jego rozpuszczeniu. Wg Tarki aktywność roztworu zawierającego kwas nadooctowy może pozostawać na tym samym poziomie lub rosnąć przez 60 minut od momentu rozpuszczenia, po tym czasie stężenie kwasu nadooctowego może spadać (7). Wszystkie te cechy preparatów zawierających kwas nadooctowy mogą wpływać na skuteczność ich działania sporobójczego. Warunkiem użycia preparatów w proszku do dezynfekcji jest ich całkowita rozpuszczalność, szczególnie w przypadku zastosowania tego typu produktów do dezynfekcji endoskopów (7, 8). Preparaty przeznaczone do użytkowania powinny cechować stabilność. Producenci preparatów dezynfekcyjnych zawierających kwas nadooctowy jako substancję czynną powinni podać szczegółowy sposób przygotowywania roztworów tego typu produktów i określić ich czas przydatności do użycia.

## WNIOSKI

W obszarach niosących ze sobą ryzyko zakażenia pacjentów lub zanieczyszczenia próbek klinicznych, materiałów i sprzętu sporami *Bacillus* spp. istnieje konieczność stosowania preparatów o potwierdzonym w badaniach działaniu sporobójczym. Norma PN-EN 17126: 2019-01 wykorzystująca metodę zawiesinową

sporicidal activity of disinfectants in conditions similar to their practical application. However, the methods proposed in it for obtaining spore suspensions with a certain number and resistance do not always allow for obtaining spore suspensions with the characteristics specified in the standard (criterion of resistance to the reference substance). In this situation, the key solution for undertaking sporicidal testing of the disinfectant product on a given spore suspension is to determine the survival of spores at the minimum concentration of the reference substance and the contact time specified in the PN-EN 17126: 2019-01 standard. Obtaining resistance of spores to the reference substance using higher concentrations and longer contact times will not lower the disinfection parameters of the tested preparations. In practical conditions, the resistance of spores may be higher due to their attachment to the surface and the degree of drying. For this reason, the suspension method described in the PN-EN 17126: 2019-01 standard may turn out to be insufficient to determine the effective performance parameters of disinfectants with sporicidal activity. Currently, work is underway on a standard using carrier methods to assess the sporicidal effectiveness of disinfectants in the medical area.

The effectiveness of sporicidal activity of disinfectants containing peracetic acid may depend on the rules governing the preparation of their solutions, their concentration, pH, temperature and the contamination degree of the disinfected surface. The method of preparing disinfectant solutions should be precisely specified by the manufacturer and observed by the user.

#### REFERENCES

1. PN-EN 17126: 2019-01. Chemiczne środki dezynfekcyjne i antyseptyczne. Ilościowa zawiesinowa metoda określania działania sporobójczego chemicznych środków dezynfekcyjnych stosowanych w obszarze medycznym. Metoda badania i wymagania (faza 2; etap 1).
2. Fujita T, Nishiura H. Environmental Drivers of *Bacillus*-Positive Blood Cultures in a Cancer Hospital, Sapporo, Japan. *Int J Environ Res Public Health* 2018;15:1-9.
3. Leung EC. An unusual case of massive hemoptysis due to *Bacillus cereus* necrotizing pneumonia. *Respiratory Medicine Case Reports* 2019;28:1-4.
4. Saito N, Kondo J, Haruki S, et al. Possible involvement of reusable towels in the high rate of *Bacillus* species-positive blood cultures in Japanese hospitals. *J Infect Chemother* 2016;22:96-101.
5. Sasahara T, Hayashi S, Marisawa Y, et al. *Bacillus cereus* bacteremia outbreak due to contaminated linens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011;30:219-226.
6. Lewin A, Quach C, Rigourd V, et al. *Bacillus cereus* infection in neonates and the absence of evidence for the role of banked human milk: Case reports and literature review. *Infect Contr & Hosp Epidemiol* 2019;40:787-793.
7. Tarka P. Kwas nadctowy i możliwości jego wykorzystania w dekontaminacji. *Zakażenia* 2013;1:6-11.
8. Kudzia-Karwowska D. Kwas nadctowy w dekontaminacji endoskopów przewodu pokarmowego. *Zakażenia XXI wieku* 2019;2:237-240.



9. Szumska E., Klusewicz K. Preparaty oparte na kwasie nadoctowym w dezynfekcji wysokiego poziomu. *Forum Zakażeń* 2012;3:217-219.
  10. Cadnum JL, Jencson AL, O'Donnell MC, et al. An Increase in healthcare-associated *Clostridium difficile* infection associated with use of defective peracetic acid – based surface disinfectant. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2017;38(3):300-305.
  11. PZH DF 03/03: 2003.02.07. Metoda badania sporobójczego działania preparatów dezynfekcyjnych. Wydawnictwo PZH. Warszawa; 2003.
  12. Olesiak P, Smyła A, Krupa P, et al. The activity of selected disinfectants towards endospores of bacteria of the *Bacillus* genus. *Arch Environ Protect* 2012;38:63-73.
  13. Kutrowska E. Kwas nadoctowy w nowoczesnych procesach dekontaminacji. *Zakażenia* 2005;4:15-19.
  14. Staniszevska M, Staniszevska M, Röhm–Rodowald E, et al. Działanie sporobójcze środków dezynfekcyjnych. *Zakażenia* 2006;6(5):12-17.
  15. Tadeusiak B. Preparaty do dezynfekcji bielizny. In: *Higiena w placówkach opieki medycznej*. Dulny G, Lejbrandt E, Tymoczko A (red) Verlag Dashöfer, Warszawa 2004, tom IV: 1-7.
  16. Beilenhoff U, Neumann C.S, Rey J.F, et al. Wspólne wytyczne z 2008 r. czyszczenie i dezynfekcji w endoskopii gastroenterologicznej. *Endoskopia* 2008;40:939-957.
- Received: 08.07.2021**  
**Accepted for publication: 03.02.2022**  
Otrzymano: 08.07.2021 r.  
Zaakceptowano do publikacji: 03.02.2022 r.
- Address for correspondence:**  
Adres do korespondencji:  
Dr Agnieszka Chojecka  
Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego PZH -  
Państwowy Instytut Badawczy  
Zakład Bakteriologii i Zwalczenia Skażeń Biologicznych  
Tel.: 22 54 21 330  
E-mail: achojecka@pzh.gov.pl