

Rapportnr. 358303001

Vergelijkend onderzoek naar de fungicide werking
van desinfectantia

B.van Klingereren

W.Pullen

juni 1984

RIJKSINSTITUUT VOOR VOLKSGEZONDHEID EN MILIEUHYGIENE
UTRECHT/BILTHOVEN

Rapportnr. 358303001

Vergelijkend onderzoek naar de fungicide werking
van desinfectantia

B.van Klingeren

W.Pullen

juni 1984

Dit onderzoek werd verricht in opdracht en ten laste van
de Veterinaire Hoofdinspectie (opdrachtbrief VG/288811,
dd. 8-11-1983) in het kader van project 358303

Verzendlijst behorend bij Rapportnr. 358303001

- 1 Veterinaire Hoofdinspectie van de Volksgezondheid
- 2 Secretaris-Generaal van het Ministerie van Welzijn, Volksgezondheid en Cultuur
- 3 Directeur-Generaal van de Volksgezondheid
- 4 Plv.Directeur-Generaal van de Volksgezondheid, tevens Hoofddirecteur Financiering en Planning
- 5 Hoofddirecteur van de Gezondheidsbescherming
- 6 Hoofddirecteur van de Gezondheidszorg
- 7 Hoofdinspecteur van de Volksgezondheid, belast met het toezicht op de Levensmiddelen en de Keuring van Waren
- 8-22 Leden van de Werkgroep Desinfectantia van de Commissie Toelating Bestrijdingsmiddelen
- 23-32 Leden van de Steungroep Veterinaire Desinfectantia van de Commissie Toelating Bestrijdingsmiddelen
- 33 Directie RIVM
- 34 Dr.J.van Noordwijk
- 35 Drs.H.W.B.Engel
- 36-37 Auteurs
- 38-39 Projecten- en rapportenregistratie
- 40 Administratie
- 41-45 Reserve

Inhoud

	<u>bladzijde</u>
1. Samenvatting	1
2. Inleiding	1
3. Materiaal en methoden	1
3.1. Toetsorganismen	2
3.2. Bereiding van schimmel-sporensuspensies	2
3.3. Desinfectantia	3
4. Resultaten	3
5. Discussie	5
Tabel 1	

Vergelijkend onderzoek naar de fungicide werking van desinfectantia

1. Samenvatting

Om na te gaan of de giststammen *Candida albicans* ATCC 10231 en *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763, die worden gebruikt bij het onderzoek naar de microbicide eigenschappen van desinfectantia, voldoende representatief zijn voor de fungi in het algemeen, is vergelijkend onderzoek gedaan met een zestal desinfectantia ten opzichte van genoemde gisten, 2 *Aspergillus* stammen en 2 dermatofieten. Daarbij is o.a. gevonden dat *Aspergillus* sporen veelal minder gevoelig zijn voor desinfectantia dan gistcellen. Dit impliceert dat toekenning van een algemene fungicide-aanprijzing op grond van de SST of de EST, waarin naast bacteriestammen alleen een gist is opgenomen, niet verantwoord is.

2. Inleiding

In het kader van het toelatingsbeleid inzake desinfectiemiddelen worden deze middelen op werkzaamheid onderzocht in de zgn. Standaard Suspensie Test. Middelen bedoeld voor toepassing in de levensmiddelenindustrie, resp. de instellingen voor gezondheidszorg worden in het RIVM (Laboratorium voor Chemotherapie) getoetst, die voor de veterinaire sector in het CDI. Eén van de toetsorganismen in dit toetsmodel is de gist *C. albicans*, als representant van de fungi. De vraag doet zich nu voor in hoeverre dit organisme representatief is voor deze groep van microorganismen, m.a.w. of op grond van werkzaamheid tegen genoemde gist mag worden geconcludeerd tot fungicide in het algemeen. Aangezien de literatuur hieromtrent geen uitsluitsel geeft werd vergelijkend onderzoek met gisten, schimmels en dermatofieten wenselijk geacht.

3. Materiaal en methoden

De fungicide werking is onderzocht, gebruik makend van de Europese variant van de Standaard Suspensie Test, de zgn. EST. Deze

methode wijkt op de volgende essentiële punten af van de SST:

- i) De toetsconcentraties van de desinfectantia worden bereid in standaard hard water in plaats van in fysiologische zoutoplossing.
 - ii) De organische belasting (bovine albumine) wordt toegevoegd vóór in plaats van gelijktijdig met de toetsorganismen.
- De standaard inwerkingstijd bedraagt 5 min. Het volledige toetsvoorschrift is bij het RIVM verkrijgbaar.

3.1. Toetsorganismen

De fungicide werking is onderzocht t.o.v. *C.albicans* ATCC 10231, *S.cerevisiae* ATCC 9763, *A.fumigatus* "Frès", *A.niger* "van Tiechem", *Trichophyton mentagrophytes* (lab. stam) en *Microsporum gypseum* CBS 16169.

3.2. Bereiding van schimmel-sporensuspensies

Aspergillus: 4 dagen oude culturen (32°C) op moutextract agar (MEA) werden afgespoeld met tergitol + glasparels; na wassen met verdunningsvloeistof (20 min. centrifugeren bij 2000 g) werd het sediment opgenomen in verdunningsvloeistof tot een kiemgetal van ca 10^8 cfu/ml.

T.mentagrophytes: 7 dagen oude culturen (32°C) op MEA werden afgespoeld met tergitol + glasparels. Na sedimenteren van de grove delen (o.a. mycelium) werd het supernatant gewassen en opgenomen in verdunningsvloeistof tot een kiemgetal (microconidien) van ca 10^7 cfu/ml.

M.gypseum: Als *T.mentagrophytes*. Op deze wijze werden suspensies van macroconidien verkregen van ca 10^5 cfu/ml.

De sporensuspensies werden bij 4°C bewaard. Gebleken is dat, met uitzondering van M.gypseum, het kiemgetal tijdens de duur van het project (ca 2 maanden) niet of weinig terugliep. Tijdens het gehele onderzoek werd van de schimmels tweemaal een suspensie bereid. De suspensies van de gisten werden volgens voorschrift steeds vers bereid.

3.3. Desinfectantia

Het onderzoek is gedaan met de volgende handelspreparaten:

<u>Handelsnaam</u>	<u>Stofklasse</u>
Mikro-klene DFS	jodofoor
Bromosept 50	quaternaire ammonium verbinding
Sumax 56	Na-dichloorisocyanuraat
D39	fenolen
Tego diocto	quaternaire ammonium verbinding + amfotenside
formaline	formaldehyde

De toetsconcentraties van deze middelen werden zodanig gekozen (op basis van vooronderzoek met *C.albicans*) dat een traject van niet werkzame naar werkzame verdunningen werd verkregen. Alleen op deze wijze kan per middel vergelijking van de fungicide werking naar toetsorganisme plaatsvinden. Per sessie (toetsdag) werden steeds alle toetsorganismen onderzocht t.o.v. één desinfectans. Een uitzondering vormt de 2e serie testen met *M.gypseum*: hierbij zijn in één sessie alle middelen t.o.v. dit toetsorganisme getoetst.

4. Resultaten

De resultaten, d.w.z. de M.E.-waarden, zijn berekend met de formule:

$M.E. (microbicidal\ effect) = \log N_C - \log N_D$
waarin N_C = het aantal kolonievormende eenheden per ml van de vloeistof van de waardebepaling, zonder inwerking van het preparaat;
 N_D = het aantal kolonievormende eenheden per ml van de vloeistof van de waardebepaling, na inwerking van het preparaat.

De M.E.-waarden zijn samengevat in tabel 1. Bij elk desinfectants is aangegeven welke concentratie voor toepassing in de praktijk wordt aanbevolen en onder het hoofdje "concentratie" de door ons getoetste concentraties. Uit de tabel blijkt dat sommige experimenten tweemaal zijn verricht. Dit geldt met name voor de experimenten met *M.gypseum*; het aanvangskiemgetal en de afname hiervan bij bewaren van de suspensie waren zodanig dat de meeste testen zijn herhaald met een nieuwe suspensie.

Preparaat A (jodofoor)

Voor alle onderzochte fungi ligt het breekpunt tussen geen of geringe werkzaamheid en duidelijke fungicide tussen 0,04 en 0,08%. M.a.w. alle toetsorganismen zijn ongeveer even gevoelig voor dit middel.

Preparaat B (quaternaire ammonium verbinding)

De twee gisten, maar vooral *S.cerevisiae*, zijn gevoeliger dan de schimmels en dermatofieten; vooral de laatsten zijn relatief ongevoelig.

Preparaat C (chloor)

Opvallend is hier de relatieve resistentie van *Aspergillus* sporen: Bij 300 ppm actief chloor treedt nog vrijwel geen reductie op. Pas bij 500 ppm (niet in de tabel weergegeven) werd t.o.v. *A.fumigatus* sporen een significante reductie (M.E. = 2,8) bereikt. Van de gisten is ook hier *S.cerevisiae* het meest gevoelig.

Preparaat D (fenolen)

Evenals voor preparaat C blijkt ook voor dit desinfectans *S.cerevisiae* de meest gevoelige en *Aspergillus* de minst gevoelige fungus.

Preparaat E (quaternaire ammonium verbinding + amfotenside)

Met de hoogst geteste concentratie (0,8%) werd t.o.v. beide *Aspergillus* soorten en *T.mentagrophytes* slechts een marginale microbicide werking verkregen. De overige organismen zijn duidelijk gevoeliger.

Preparaat F (formaldehyde)

Aangezien bekend is dat aldehyden vrij traag werkende desinfectantia zijn, zijn twee concentraties (0,5 en 1%) getest bij drie inwerkingstijden (5, 15 en 30 min.). Het is duidelijk dat alle toetsorganismen optimaal worden afgedood, al is hiervoor met 0,5% wel 30 min. nodig.

5. Discussie

Het doel van dit onderzoek was niet om bepaalde desinfectie middelen te evalueren op fungicide activiteit maar om na te gaan of de gisten *S.cerevisiae* en *C.albicans*, die resp. in de L(evensmiddelen)- en Z(iekenhuis)- variant van de Standaard Suspensie Test zijn opgenomen als representant van de fungi wel voldoende representatief zijn. Daartoe zijn vergelijkende testen gedaan met middelen die de belangrijkste stofklassen van desinfectantia vertegenwoordigen.

De gevonden M.E.-waarden tonen aan dat *S.cerevisiae* als regel gevoeliger is dan *C.albicans*, *Aspergillus* en de dermatofieten *T.mentagrophytes* en *M.gypseum*. De beide *Aspergillus* soorten zijn t.o.v. 3 van de 6 geteste preparaten minder gevoelig dan de gisten en de dermatofieten en t.o.v. geen enkel product gevoeliger dan *C.albicans*. De gevoeligheid van de dermatofieten komt als regel overeen met die van *C.albicans*. Een uitzondering is de relatieve ongevoeligheid van *T.mentagrophytes* microconidiën voor quaternaire ammonium verbindingen (zie preparaat B en E).

Ten aanzien van de matige afsterving onder invloed van chloor zij opgemerkt dat de EST voor chloormiddelen een zwaardere test is dan de SST o.a. vanwege het tijdstip van toevoegen van de organische belasting (zie sub 3).

Hoewel dit onderzoek van beperkte omvang is kan o.i. worden geconcludeerd, dat de giststammen die zijn opgenomen in de standaard suspensie test, resp. de Europese variant hiervan, ten aanzien van hun gevoeligheid voor desinfectantia niet voldoende representatief zijn voor die van fungi in het algemeen. Dit impliceert dat een algemene aanprijzing voor een fungicide werking op basis van de resultaten met de SST of EST niet verantwoord is.

Tabel 1 Fungicide werking (M.E.-waarden) van desinfectantia in EST

desinfectans	concentratie	C.albicans TCC 10231	S.cerevisiae ATCC 9763	Asp.niger v.Tiechem	Asp.fumigatus fres 13-11-'70	M.gypseum CBS 16169	T.mentagrophytes
A. Mikro-klene DFS gebr.conc.: 0,5% (ca 100 ppm)	0,02 %	0,0	0,0	0,7	0,5	0,1 ; 0,0	0,4
	0,04 %	0,1	0,5	0,6	0,6	0,1 ; 0,3	3,0
	0,08 %	> 6,1	> 5,5	4,3	> 5,4	> 3,1 ; > 3,4	> 5,6
B Bromosept 50 gebr.conc.: 0,5%	0,005 %	0,5	> 5,7	0,5	0,1	0,0 ; 0,1	0,0
	0,01 %	5,7	> 5,7	3,0	0,6	0,6 ; 0,6	0,5
	0,02 %	> 6,1	> 5,7	> 5,3	5,3	> 2,2 ; 2,9	2,2 ; 1,0
	0,04 %						2,8
C. Sumax 56 gebr.conc.: 3 g/l (ca 375 ppm) 4 g/l (ca 500 ppm)	100 ppm ¹⁾	0,0	0,3	0,1	0,1	0,2	1,2
	150 ppm	0,5	4,5	0,2	0,0	1,2	3,9
	200 ppm	1,5 ; 0,9	> 5,4	0,2 ; 0,2	0,1	1,4 ; > 3,4	4,8
	250 ppm	2,6		0,3		> 3,4	
	300 ppm	4,0		0,3	0,0 0,1	> 3,4	
D. D 39 gebr.conc.: 0,4%	0,05 %	1,2	> 5,8	0,1	0,2	1,4 ; 1,2	0,6
	0,1 %	2,5	> 5,8	0,3	0,7	> 2,2 ; 3,4	1,7
	0,2 %	> 5,7	> 5,8	1,7	3,5	> 2,2 ; > 3,4	> 5,3
E. Tego-dicto gebr.conc.: 1%	0,05 %	0,2	0,7	0,1	0,1	> 1,7 ; 0,8	0,2
	0,1 %	0,3	2,9	0,2	0,1	> 1,7 ; 2,1	0,5
	0,2 %	1,8 ; 2,4	> 5,8	0,9 ; 1,0	0,3 ; 0,5	> 1,7 ; > 3,4	1,2 ; 0,5
	0,4 %	5,0		1,8	0,7		0,8
	0,8 %	> 6,3		1,9	0,9		0,9
F. Formaldehyde 0,5%	5 min.	0,1	0,3	0,1	0,2	0,6	0,3
	15 min.	0,4	1,1	1,0	2,8	> 2,4	> 4,5
	30 min.	5,4	> 5,9	> 4,0	> 4,2	> 2,4	> 4,5
Formaldehyde 1%	5 min.	0,4	0,6	1,3	> 4,5	*)	> 3,3
	15 min.	> 6,0	> 4,7	> 4,3	> 4,5	*)	> 3,3
	30 min.	> 6,0	> 4,7	> 4,3	> 4,5	*)	> 3,3

¹⁾ actief chloor

*) inactivering onvoldoende

Rapport-Toelichtingskaart A

gebeld, overleg	oud rapport nummer	nieuw rapport nummer	retour kleine correc- ties	retour kleine correc- ties	door naar Dir: r.i.f. ontv.	datum ontv. rapp.
		001	3/ corr versiekt 17 A. v. O.		C O	3/1/84

Met de administratie (Hr.Ursem): datum: Andere interpretatie:.....

- gecontroleerd

- nog te controleren

- geen controle nodig

-

Opmerkingen:
met 001 a.

IF 358303001
ER697 IR 122395938 - 000005 RT ID: IE

ERARINBOUNDA N/A

ER-AR-03-A-17-0011-3-03-07

SKP:382803529 - 00002 CUST:R0102
PUT

rd?

Srv: 05/02 5:00pm GMT For: ILAMB
IRMA LAMBREGTST

R



NEXT