



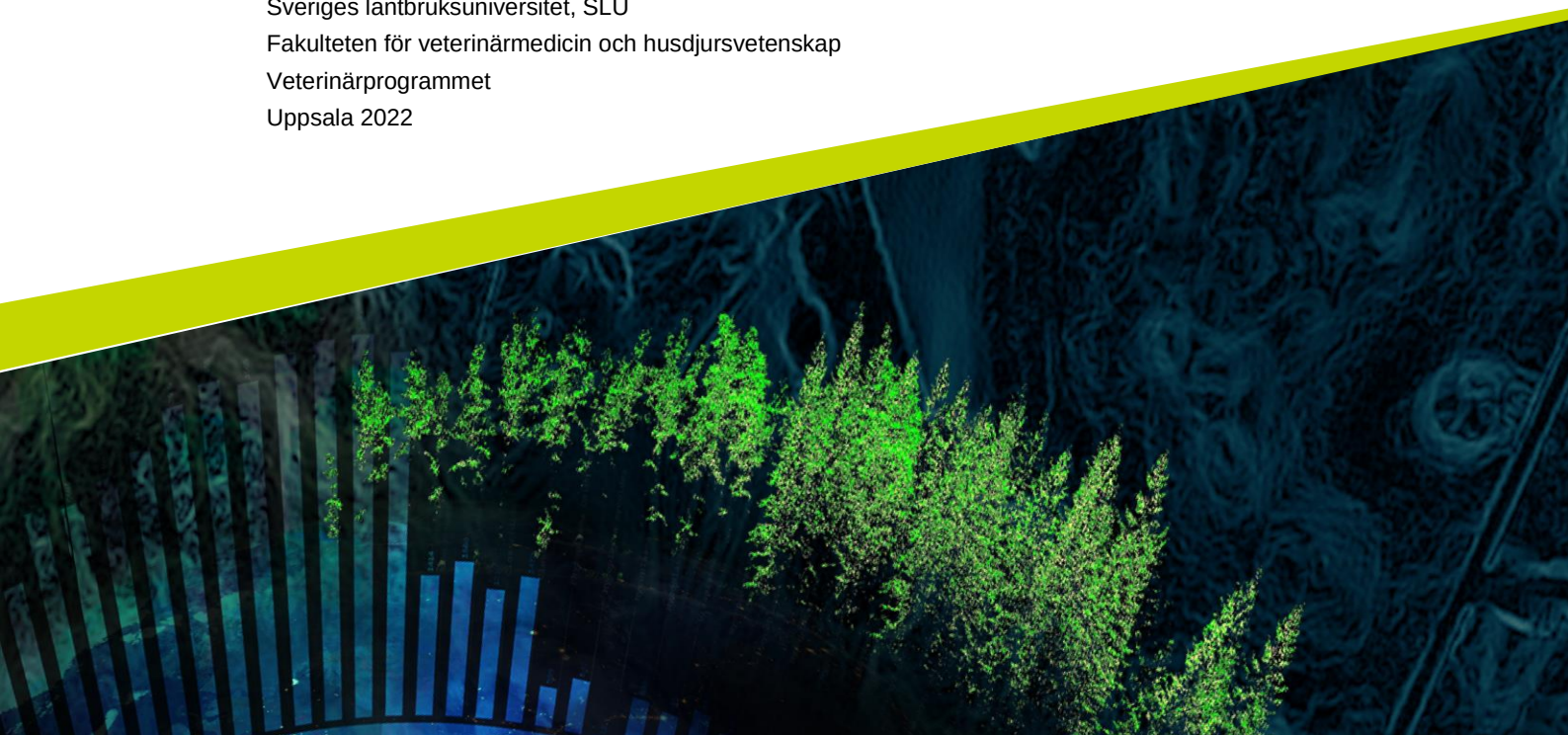
# Produktion av biofilm med MRSA, MRSP eller *Campylobacter jejuni*, samt hur olika desinfektionsmedel påverkar den

---

*The production of biofilm containing MRSA, MRSP or different strains of Campylobacter jejuni, and how various disinfectant substances will disrupt it*

Moa Therése Viklund

Självständigt arbete • 30 hp  
Sveriges lantbruksuniversitet, SLU  
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Veterinärprogrammet  
Uppsala 2022





# Produktion av biofilm med MRSA, MRSP eller *Campylobacter jejuni*, samt hur olika desinfektionsmedel påverkar den

*The production of biofilm containing MRSA, MRSP or different strains of Campylobacter jejuni, and how various disinfectant substances will disrupt it*

Moa Therése Viklund

|                          |                                                                                                                     |
|--------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Handledare:</b>       | <b>Ingrid Hansson, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap</b> |
| <b>Bitr. handledare:</b> | Madeleine Moazzami, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap    |
| <b>Bitr. handledare:</b> | Moa Skarin, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap            |
| <b>Examinator:</b>       | Sofia Boqvist, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap         |

|                              |                                         |
|------------------------------|-----------------------------------------|
| <b>Omfattning:</b>           | 30 hp                                   |
| <b>Nivå och fördjupning:</b> | A2E                                     |
| <b>Kurstitel:</b>            | Självständigt arbete i veterinärmedicin |
| <b>Kurskod:</b>              | EX0869                                  |
| <b>Program/utbildning:</b>   | Veterinärprogrammet                     |
| <b>Kursansvarig inst.:</b>   | Institutionen för kliniska vetenskaper  |

|                       |         |
|-----------------------|---------|
| <b>Utgivningsort:</b> | Uppsala |
| <b>Utgivningsår:</b>  | 2022    |

|                   |                                                                                                                                                                                                     |
|-------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Nyckelord:</b> | Biofilm, destruktion av biofilm, <i>Campylobacter jejuni</i> , stafylokokker, MRSA, MRSP, desinfektion, rengöring, peroxymonosulfat buffrade syror, perättiksyra, väteperoxid, hypoklorsyra, etanol |
|-------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

## Sveriges lantbruksuniversitet

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Institution för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

## Publicering och arkivering

Godkända självständiga arbeten (examensarbeten) vid SLU publiceras elektroniskt. Som student äger du upphovsrätten till ditt arbete och behöver godkänna publiceringen. Om du kryssar i **JA**, så kommer fulltexten (pdf-filen) och metadata bli synliga och sökbara på internet. Om du kryssar i **NEJ**, kommer endast metadata och sammanfattning bli synliga och sökbara. Fulltexten kommer dock i samband med att dokumentet laddas upp arkiveras digitalt.

Om ni är fler än en person som skrivit arbetet så gäller krysset för alla författare, ni behöver alltså vara överens. Läs om SLU:s publiceringsavtal här:

<https://www.slu.se/site/bibliotek/publicera-och-analysera/registrera-och-publicera/avtal-for-publicering/>.

☒ JA, jag/vi ger härmed min/vår tillåtelse till att föreliggande arbete publiceras enligt SLU:s avtal om överlåtelse av rätt att publicera verk.

☐ NEJ, jag/vi ger inte min/vår tillåtelse att publicera fulltexten av föreliggande arbete. Arbetet laddas dock upp för arkivering och metadata och sammanfattning blir synliga och sökbara.

## Sammanfattning

I denna studie ingick såväl produktion av biofilm i en statisk modell med mikrotiterplattor där biofilmen fick växa ostört i 5 dagar i inkubationsskåp i 30 °C, samt en mer dynamisk modell. I den dynamiska modellen ingick vattenledningsrör där buljong och bakterier växte i inkubationsskåp i 30 °C i 5 dagar för att sedan stå i rumstemperatur i ytterligare 5 dagar med daglig skakning i en timme, samt att buljong byttes ut vid dag 5 och nya bakterier tillsattes dag 7. Dessutom undersöktes hur olika desinfektionsmedel (hypoklorsyra, väteperoxid, perättiksyra, 70 % etanol, buffrade syror och peroxymonosulfat) påverkade biofilm som producerades av *Staphylococcus* spp. såväl som *Campylobacter jejuni* i blandflora. Totalt analyserades 3264 mikrotiterbrunnar och 765 vattenledningsrörbitar för att kunna göra en samlad bedömning vilket desinfektionsmedel som hade mest effekt på att avlägsna biofilm in vitro och huruvida Stafylokokker och *C. jejuni* överlevde desinfektionen.

Resultaten indikerar att desinfektionsmedlet måste anpassas efter den specifika miljön och den specifika bakteriefloran som träffas på då effektiviteten skiljer sig mellan olika typer av biofilm. Effekten av mekanisk rengöring visas heller inte kunna ersättas av endast desinfektionsmedel. Denna studie visade att väteperoxid hade störst förmåga att desinficera ytorna som ingick i den här studien, och kan därmed fungera som ett komplement i rengöringsrutiner multidisciplinärt. Vidare forskning med statistiska analyser krävs för att bekräfta eller förkasta resultaten.

*Nyckelord:* Biofilm, destruktion av biofilm, *Campylobacter jejuni*, stafylokokker, MRSA, MRSP, desinfektion, rengöring, peroxymonosulfat buffrade syror, perättiksyra, väteperoxid, hypoklorsyra, etanol

## Abstract

This study included the production of biofilm in a static model as well as a more dynamic model. The static model included microtiter plates on which the biofilm was allowed to grow undisturbed for 5 days in incubation cabinets at 30°C, while the dynamic model included water pipes in which broth and bacteria grew in incubation cabinets at 30°C for 5 days, followed by 5 days in room temperature with daily shaking for one hour a day, and an exchange of broth and bacteria at day 5 and 7. In addition, it was investigated how different disinfectants such as hypochlorous acid, hydrogen peroxide, peracetic acid, 70% ethanol, buffered acids and peroxymonosulphate affected the biofilms produced by *Staphylococcus* spp. as well as *Campylobacter jejuni* in mixed flora. A total of 3264 microtiter wells and 765 water pipe sections were analyzed in order to make an overall assessment of which disinfectant had the most effect on removing biofilm in vitro and whether *Staphylococcus* spp. and *C. jejuni* survived after disinfection.

The results indicate that the disinfectant must be chosen based on the specific environment as well as the bacteria it aims to eliminate, since the effectiveness differs between different types of biofilms and the agents present. It was also shown that the effect of mechanical cleaning cannot be replaced by disinfectants alone. However, hydrogen peroxide has the greatest ability to disinfect several different environments with different types of biofilms and can serve as a complement to multidisciplinary cleaning routines. Further research with statistical analyzes are required to confirm or reject the results.

**Keywords:** Biofilm, destruction of biofilm, *Campylobacter jejuni*, staphylococci, MRSA, MRSP, disinfection, cleaning, peroxymonosulphate, peracetic acid, buffered acids, hydrogenperoxide, hypochloric acid, ethanol

# Förord

Biofilm utgörs av populationer av en eller flera bakterier som producerar en form av skyddande biopolymer. Det kan skapa problem inom många yrkesverksamheter eftersom den skyddar bakterier när de utsätts för läkemedel eller desinfektionsmedel och kan därför driva resistensutvecklingen vidare samtidigt som den förhindrar effektiv desinficering. Trots detta finns det fortfarande väldigt många obesvarade frågor inom ämnet. Kunskap saknas bland annat om hur vi ska avlägsna biofilm i olika miljöer på sätt som både är effektiva men även säkra för djur, människor och miljö.

Avsikten med denna studie var att producera biofilm och undersöka hur biofilmen påverkas av sex olika desinfektionsmedel som ofta används på djursjukhus, djurkliniker, stallar, slakterier och i livsmedelslokaler. Syftet med studien var att bidra till ökad kunskap om biofilm för att minska överlevnaden och spridningen av patogena biofilmsproducerande bakterier, såsom *Campylobacter* spp., meticillinresistenta *Staphylococcus aureus* (MRSA) och meticillinresistenta *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP).





# Innehållsförteckning

|                                                                                 |           |
|---------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Förkortningar .....</b>                                                      | <b>11</b> |
| <b>1. Inledning .....</b>                                                       | <b>13</b> |
| <b>2. Litteraturstudie .....</b>                                                | <b>14</b> |
| 2.1. Biofilm .....                                                              | 14        |
| 2.2. Bakterier som inkluderades i studien .....                                 | 15        |
| 2.2.1. Meticillinresistenta <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> (MRSP) ..... | 15        |
| 2.2.2. Meticillinresistenta <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) .....           | 16        |
| 2.2.3. <i>Campylobacter jejuni</i> .....                                        | 16        |
| 2.3. Desinfektionsmedel i studien .....                                         | 17        |
| 2.3.1. Perättiksyra .....                                                       | 17        |
| 2.3.2. Hypoklorsyra .....                                                       | 18        |
| 2.3.3. Etanol 70 % .....                                                        | 18        |
| 2.3.4. Väteperoxid .....                                                        | 18        |
| 2.3.5. Buffrade och organiska syror med ammoniumsalter .....                    | 19        |
| 2.3.6. Peroxymonosulfat .....                                                   | 19        |
| <b>3. Metod .....</b>                                                           | <b>20</b> |
| 3.1. Studieupplägg .....                                                        | 20        |
| 3.2. Identifiering av bakterier .....                                           | 22        |
| 3.3. Bakteriebuljonger inför biofilmsproduktion .....                           | 22        |
| 3.3.1. Buljong av <i>Campylobacter jejuni</i> .....                             | 22        |
| 3.3.2. Buljong av bakterierna som ingick i blandfloran och MRSA/MRSP ...        | 23        |
| 3.3.3. Viable count .....                                                       | 23        |
| 3.4. Mikrotiterplattor .....                                                    | 24        |
| 3.4.1. Odling av biofilm i mikrotiterplattor .....                              | 24        |
| 3.4.2. Skölja/tvätta/färga in biofilmen på mikrotiterplattorna .....            | 25        |
| 3.4.3. Överlevnad av <i>Campylobacter jejuni</i> .....                          | 26        |
| 3.4.4. Överlevnad av <i>Staphylococcus</i> spp. ....                            | 27        |
| 3.5. Odling av biofilm på vattenledningsrör i falkonrör .....                   | 27        |
| 3.5.1. Tvätt av biofilm på vattenledningsrör .....                              | 28        |
| 3.5.2. ATP mätning av biofilm på vattenledningsrör .....                        | 29        |

|           |                                                                                                               |           |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.5.3.    | Överlevnad av <i>Campylobacter jejuni</i> och <i>Staphylococcus</i> spp. i biofilm på vattenledningsrör ..... | 29        |
| <b>4.</b> | <b>Resultat.....</b>                                                                                          | <b>30</b> |
| 4.1.      | Mikrotiterplattor .....                                                                                       | 30        |
| 4.1.1.    | Biofilm i mikrotiterplattor .....                                                                             | 30        |
| 4.1.2.    | Överlevnad av <i>Campylobacter jejuni</i> i biofilm från mikrotiterplattor ...                                | 32        |
| 4.1.3.    | Överlevnad av MRSA och MRSP i biofilm från mikrotiterplattor .....                                            | 32        |
| 4.2.      | Vattenledningsrör .....                                                                                       | 33        |
| 4.2.1.    | ATP-mätning från vattenledningsrör med biofilm .....                                                          | 33        |
| 4.2.2.    | Överlevnad av <i>Campylobacter jejuni</i> i biofilm på vattenledningsrör ...                                  | 34        |
| 4.2.3.    | Överlevnad av MRSA och MRSP i biofilm på vattenledningsrör .....                                              | 35        |
| <b>5.</b> | <b>Diskussion.....</b>                                                                                        | <b>37</b> |
| <b>6.</b> | <b>Konklusion .....</b>                                                                                       | <b>41</b> |
|           | <b>Referenser.....</b>                                                                                        | <b>42</b> |
|           | <b>Tack .....</b>                                                                                             | <b>48</b> |
|           | <b>Populärvetenskaplig sammanfattning .....</b>                                                               | <b>49</b> |
|           | <b>Bilaga: Pilotstudien.....</b>                                                                              | <b>51</b> |

## Förkortningar

|                               |                                                            |
|-------------------------------|------------------------------------------------------------|
| ATP                           | Adenosin tri-fosfat                                        |
| BB                            | Boltonbuljong                                              |
| BHI                           | <i>Brain-heart infusion</i> -buljong                       |
| RLU                           | <i>Relative Light Units</i>                                |
| mCCDA                         | Modified-charcoal-cefoperazone-deoxycholate-agar           |
| MH                            | Müller-Hinton-buljong                                      |
| MRSA                          | Meticillinresistent <i>Staphylococcus aureus</i>           |
| MRSP                          | Meticillinresistent <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> |
| OD                            | Optisk densitet                                            |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Väteperoxid                                                |
| HOCl                          | Hypoklorsyra                                               |



# 1. Inledning

Biofilm skapas av bakterier som ett skyddande slemlager, en process vars utveckling har beskrivits av O'Toole (2003). Det är ett densitetsberoende och strategiskt sätt att uttrycka virulens som skyddar dem mot bland annat desinfektionsmedel och antibiotika (Kasimanickam *et al.* 2013). Biofilm kan bildas såväl i organsystem som i urinblåsan eller lungorna vid vissa infektioner och kan vara orsaken till svårläkta infektioner. Den kan även förekomma i miljön där den till exempel kan kontaminera medicinsk utrustning eller förorena köksverktyg exempelvis skärbrädor (Walker *et al.* 2017). Dessutom kan biofilm bildas i ledningarna som förser djur och människor med vatten (Furukawa *et al.* 2010) och kan på det sättet leda till sjukdomsutbrott. Ett exempel är att människor kan drabbas av magsjuka orsakad av *Campylobacter jejuni* som är en allmänfarlig zoonos samt den vanligaste rapporterade orsaken till gastroenterit hos människa inom EU (EFSA&ECDC 2021). Ett annat exempel är MRSA och MRSP som kan överleva i biofilm i miljön på djursjukhus och orsaka nosokomial smitta hos både djur och människor (Grönthal *et al.* 2014; Bergström *et al.* 2012). MRSP och MRSA orsakar ett ökat djurlidande bland annat i form av svårläkta sår. Biofilm kan i dessa fall leda till en ökad antibiotikaanvändning då dosen kraftigt måste höjas för att bli verksamt då biofilmen gör att läkemedlen inte kan tränga igenom slemlagret för att destruera de skadliga bakterierna. Biofilm bidrar därav till en ökad resistensutveckling (Ceri *et al.* 1999) och kan tvinga både djur och människor till längre sjukhusvistelser.

Att grundläggande hygien och städrutiner är avgörande för att minska sjukdomsutbrott är sedan länge känt (Dancer 2011; Bergström *et al.* 2012; Boyce 2016). När det gäller biofilm bör dock en anpassning av rengöring- och desinfektionsmedel efter typ av biofilm och yta som ska rengöras ske, då biofilmer blir unika i sin struktur för varje plats och man kan därför inte garantera att samma medel är verksamt i olika miljöer (Jones *et al.* 2011; Furukawa *et al.* 2010). Det krävs således olika åtgärder för olika miljöer för att desinficera en yta eller ett redskap så effektivt som möjligt.

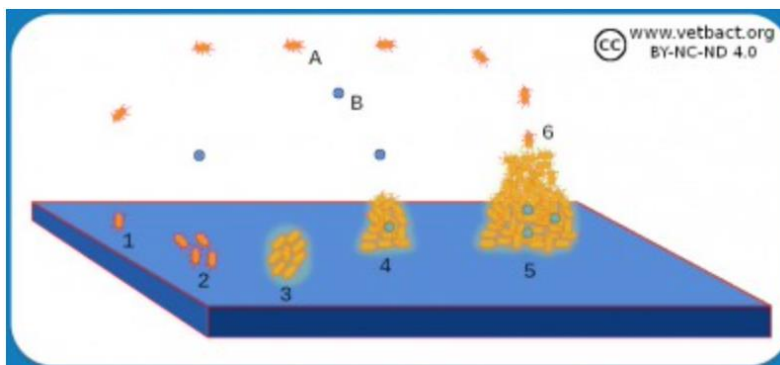
Avsikten med denna studie var att bidra till ökad kunskap om hur rengöringsrutiner kan optimeras inom djursjukvård och livsmedelsproduktion för att på längre sikt minska överlevnad och överföring av sjukdomsframkallande bakterier.

## 2. Litteraturstudie

### 2.1. Biofilm

Biofilmsproduktion är en skyddsmekanism som sker via *quorum sensing*. Det innebär att bakterierna ”kommunicerar” inom bakteriearten med hjälp av signalmolekyler som kallas för autoinducerare. Autoinducerarna är olika för gram-negativa och grampositiva bakterier och används av bakterierna för att känna av hur många bakterier det är på ett visst avstånd, och därmed kunna veta när det är mest gynnsamt att öka sin motilitet, adherera till en yta för att orsaka infektion eller bilda biofilm för att inte destrueras (sammanfattat av Viklund 2019). I regel påträffas många olika bakteriearter samtidigt i en biofilm, vilket möjliggörs genom kommunikation mellan bakteriearter där andra signalmolekyler används som kan läsas av flera olika bakterier. Tillsammans bildar bakterierna biofilm av extracellulär polymetrisk substans (EPS) vilket fungerar som en 3D arkitektur/matrix som består av polysackarider, proteiner, nukleinsyra och fetter. Bakterier står för 10 % av massan i biofilmen medan 90 % motsvaras av EPS. Det gör att bakterierna är skyddade från rengöringsmedel, desinfektionsmedel, antibiotika och även världens eget immunförsvar (Flemming & Wingender 2010).

Biofilm bildas i faser med hjälp av olika gener för produktion och tillväxt och startar när en aktiv obunden bakterie (planktonisk bakterie) känner av signalmolekyler för adhesion till en yta (Figur 1). På ett par timmar produceras matrix av polysackarider som genererar ett monolager av en omogen biofilm (Bahamondez-Canas *et al.* 2019). Fler bakterier fastnar på den klibbiga ytan och bildar mikrokolonier som resulterar i lager av biofilm. På två till fyra dagar mognar biofilmen och blir så porös att den knoppar av delar av sig själv för att frisätta nya planktoniska celler för att spridas (Vasudevan 2014; Bahamondez-Canas *et al.* 2019). Detta kan exempelvis ske i ett hundöra vid extern otit orsakad av infektion med *Pseudomonas aeruginosa* eller på en skärbräda vid undermålig rengöring inom livsmedelsproduktionen.



Figur 1. Schematisk bild av hur en biofilm bildas. (1) En planktonisk bakterie fäster till en yta. (2) Ett klibbigt monolager av polysackarider bildas. (3) En mikrokoloni byggs upp. (4) Biofilmen mognar och innehåller flera bakteriearter, jäst och mögel. (5) Biofilmen knoppar av delar av sig själv för att ytterligare spridas vidare (Bild ur VetBact "biofilm och quorum sensing", godkänd att användas).

Enligt Flemmings och Wingenders review om biofilm kan dess matrix och innehåll skilja sig beroende på närvarande mikroorganismer, miljö och vad den utsätts för, vilket kan ge den ett utseende som är allt från platt och kompakt till fluffig och porös. Biofilm med *P. aeruginosa* är ett exempel på en platt och len biofilm (Flemming & Wingender 2010).

## 2.2. Bakterier som inkluderades i studien

### 2.2.1. Meticillinresistent *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP)

*Staphylococcus pseudintermedius* är en grampositiv bakterie som ingår i normalfloran hos framför allt hund och katt men den kan även förekomma hos människa som en transient bakterie (tillfällig förorening). Ofta är bakterien en opportunist i hudsår eller urogenitalia och orsakar framför allt infektion vid nedsatt immunförsvar. I en studie av hundar med klinisk infektion var 96 % av de undersökta isolaten biofilmsproducerare (Singh *et al.* 2013) vilket kan bidra till sporadiska nosokomiala (vårdrelaterade) utbrott (Grönthal *et al.* 2014; Osland *et al.* 2012).

På senare år har man sett att genen som kodar för meticillinresistens blivit vanligare, troligen orsakas detta av en ökad antibiotikaanvändning (Hensel *et al.* 2016). Det innebär att bakterierna utvecklat en förmåga att motstå flera typer av penicillin. En dansk studie visade att upp till 69 % av 119 friska hundar var bärare av MRSP (Paul *et al.* 2012) medan en norsk screeningstudie av 189 friska hundar gav resultatet att 2.9 % var tysta bärare av MRSP (Kjellman *et al.* 2015). Då antibiotikaresistens är

ett av nutidens största hot mot att kunna bota sjukdom framgår det i Jordbruksverkets föreskrifter att MRSP redan vid misstanke ska anmälas till länsstyrelsen och för MRSP gäller kontaktisolering fram till avläkt infektion (SJVFS 2021:5).

### 2.2.2. Meticillinresistent *Staphylococcus aureus* (MRSA)

*Staphylococcus aureus* är en grampositiv bakterie som förekommer i normalfloran hos de flesta djurarterna, inklusive hos människor. De kan påvisas i infekterade sår i huden som inte läker, vara orsak till mastiter hos får och nöt, orsaka fotbölder hos fjäderfä och ge upphov till matförgiftning hos människa (VetBact 2021).

Vissa stammar av *S. aureus* bär *mecA* genen som genomgått en förändring som möjliggör produktion av pencillinas. Pencillinas bryter ner pencillin vilket gör att bakterien blir resistent mot flera typer av antibiotika (Deurenberg & Stobberingh 2008). Misstänkta fall av MRSA ska anmälas till länsstyrelsen då de regleras av lagar för att styrka biosäkerhet och kräver kontaktisolering till 20 dagar efter avläkt infektion (Jordbruksverket 2021; SJVFS 2021:5)

I Sverige såväl som i många andra länder har det på klinik- och sjukhusnivå förekommit sporadiska nosokomiala utbrott (Bergström *et al* 2012; French *et al.* 2004), och i en nyligen publicerad studie inom veterinärmedicin påvisas även brister vad gäller desinfektion av tandenheter (Alsing-Johansson *et al.* 2021). Studien visade att även till synes friska hästar kunde vara bärare av bland annat MRSA varvid desinfektion efter varje patient alltid är nödvändigt.

### 2.2.3. *Campylobacter jejuni*

*Campylobacter jejuni* är en gramnegativ mikroaerofil bakterie som oftast förekommer i tarmen hos många olika djurarter. Främst är den kopplad till fjäderfä som också är den främsta smittorsaken till campylobacterios hos människa, med gastroenterit som följd. De flesta djur som är bärare av bakterien är symptomfria, men sporadiska aborter kan ses hos nötkreatur. Bakterien sprids i djurstallar och på slakterier bland annat via förorenat vatten eller transportburar om optimala hygienrutiner inte upprätthålls. I Sverige finns ett övervakningsprogram hos kyckling med (SVA 2020) målsättningen att minska prevalensen av *Campylobacter* spp. hos fjäderfä i såväl primärproduktionen som konsumentled. Varje kycklingflock som slaktas i Sverige provtas och analyseras avseende förekomst av *Campylobacter* i blindtarmar (Kommissionens förordning (EG) nr 2073/2005; Ferrari *et al.* 2019) hos Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA). Anmälningsplikt för laboratoriet föreligger om *Campylobacter* spp. påvisas i prov från kyckling. *Campylobacter jejuni* överlever inte i temperaturer över 70 °C, och är känslig för frysning varvid infektion i



hemmet främst sker från färskt kycklingkött som ej tillagats korrekt eller från kors-kontamination till exempel genom att samma skärbrädor används för otillagat kött och grönsaker (Tang *et al.* 2011).

## 2.3. Desinfektionsmedel i studien

Desinfektion kan beskrivas som ”processen som förstör de flesta patogena mikro-organismerna, i deras vegetativa stadie” (Traverse & Aceto 2015). Inom miljöer där djur och livsmedel hanteras är det särskilt viktigt att kunna desinficera ytor regelbundet och på ett effektivt sätt för att undvika sjukdomsutbrott och spridning av sjukdomar. När det gäller städ och desinfektion visar en studie av Hunter *et al.* att städ- och desinfektionschecklistor på djurkliniker är av stor betydelse för att minska förekomst av patogener, då den visade att ytor som inte var med på checklistan hade 2,3 gånger högre risk att vara kontaminerade med *Staphylococcus* spp. än ytor som checkas av på listan (Hunter *et al.* 2021).

I Sverige finns det kontrollprogram för bakterier som kräver speciella åtgärder, såsom förekomst av termotoleranta *Campylobacter* hos kyckling (SJVFS 2021:10). Annars finns det föreskrifter för till exempel MRSA och MRSP som kan förekomma på djursjukhus och kliniker, där framgår det hur de ska hanteras praktiskt för att minska risken för utbrott och spridning av zoonoser (SJVFS 2021:5, SJVFS 2013:14). Det framgår dock inte hur desinfektionen ska utföras även om det är en stor del av biosäkerheten. Att kunna desinficera miljöer är av största vikt för att minska spridning av patogena bakterier, oavsett om det gäller att desinficera tandenheter för hästar, klippmaskiner som använts vid behandling av sår, rengöring av en stallplats, rengöra en mjölk tank på en mjölk kobesättning, tvätta produktionsbanden på ett slakteri, eller steril tvätt av ett rum efter operation.

I en review artikel av Boyce nämns att hypoklorsyra, väteperoxid och perättiksyra är effektiva medel för desinfektion av ytor på sjukhus (Boyce 2016). Samtliga av dessa, samt 70 % etanol, buffrade syror och peroxymonosulfat ingår i den här jämförande studien om biofilm och desinfektionsmedel.

### 2.3.1. Perättiksyra

Perättiksyra används som desinfektionsmedel med bakteriedödande effekt och ska enligt tillverkare förhindra biofilmbildning i vattenledningar till bland annat djurstallar och slakterier. Perättiksyra definieras som icke toxiskt men kan erodera vissa metaller såsom stål (Rutala *et al.* 2008). Användning av perättiksyra kan minska bakteriebördan av *P. aeruginosa* och *E. coli* upp till 0,7 log CFU/mL (Thomas *et*

*al.* 2020). Studier har visat att perättiksyra är verksamt mot färsk biofilm, men biofilmer äldre än 72 timmar är mer robusta och är därmed svårare att avlägsna med perättiksyra (Meyer *et al.* 2020).

### 2.3.2. Hypoklorsyra

Hypoklorsyra (HOCl) bildas när klorsalt löses i vatten med hjälp av elektricitet. Det är ett medel som inte är skadligt för människor och marknadsförs som helt miljövänligt och kan enligt tillverkarna avdöda 99,9 % av bakterier på en minut. Hypoklorsyra kommer efter aktivering omvandlas till hypoklorit (ClO<sup>-</sup>). Hypoklorsyra bildas även i kroppens egna neutrofiler där reaktiva syremolekyler omvandlas till väteperoxid och bildar hypoklorsyra genom myeloperoxidas och klorid för att bekämpa infektion (Winterbourn *et al.* 2006).

Genom mätning av ATP har det visats att hypoklorsyra kan ge en tydlig reduktion av kontaminering på ytor före och efter desinfektion vilket bekräftar att det är effektivt som komplement i städrutiner (Overholt *et al.* 2018).

### 2.3.3. Etanol 70 %

Enligt en omfattande review av Rutala *et al.* beskrivs att daglig användning av alkohol anses vara effektivt vid snabb rengöring av lättare kontaminerade ytor såsom stetoskop och bänkytor. Det är dock inte verksamt mot sporer vilket innebär att det inte rekommenderas för desinfektion av medicinska verktyg, då kvarvarande bakteriesporer kan sporulera och ge upphov till infektioner (Rutala *et al.* 2008). Medlet har en negativ påverkan på vissa material som exempelvis genomskinlig plast/glas som tappar transparensen, och dessutom kan alkoholen göra att gummi hårdnar. För att alkohol ska vara effektivt som desinfektionsmedel krävs koncentrationer >50 % för att denaturera proteiner och dekontaminera ytan. Anslagstiden varierar från 10 sekunder (*Staphylococcus* spp. och *E. coli*) till 60 minuter (*M. tuberculosis*) beroende på vilket agens man avser oskadliggöra (Rutala *et al.* 2008). I kombination med EDTA kan 10 % etanol motverka biofilm på katetrar in vitro (Sarker *et al.* 2021)

### 2.3.4. Väteperoxid

Väteperoxid har många användningsområden. Det används som desinfektion i sjukhusmiljö för att bli av med bakterier, sporer, jäst och virus (French *et al.* 2004; Rutala *et al.* 2008) men kan också användas för att bleka tänder, tvätta sår, desinficera ögonlinser (Rutala *et al.* 2008) eller för äggdesinfektion vid fiskodling (Rach *et al.* 1998). Leukocyter kan även producera varianter av väteperoxid i kroppen som försvar mot patogener (Nauseef 2001). Väteperoxidvarianter har visat sig effektiva mot bland annat MRSA och har en tydligt bakteriedödande effekt (French *et al.*

2004; Lederer *et al.* 2014; Mitchell *et al.* 2014; Yang *et al.* 2019). I en studie från Kina framgår att väteperoxid är verksamt mot både biofilm och anaeroba bakterier (Nie *et al.* 2021). Väteperoxid blir verksamt genom att bilda fria radikaler vilka skadar cellkomponenter. Medlet kan ge ögonskador och kan bleka svarta material (Rutala *et al.* 2008).

### 2.3.5. Buffrade och organiska syror med ammoniumsalter

Kombinationer av buffrade och organiska syror, är till exempel lösningar av myrsyra, propionsyra, ättiksyra, och ammoniumsalter såsom zinkacetat och kopparsulfat. Enligt återförsäljare sänker det pH i kycklingars tarmflora vilket minskar risken för sjukdomsutbrott i kycklingbesättningar. Det kan enligt tillverkare dessutom rena dricksvatten i vattenledningar vilket minskar risken för att smitta andra kycklingar, och fungerar således förebyggande då det indirekt förhindrar bildning av biofilm genom att sänka pH-värdet. Det kan därmed fungera som ett komplement till hygienbarriär för att minska risken att fjäderfä blir koloniserade av *Campylobacter* spp. i tarmarna (Naseri *et al.* 2012). Dock saknas vetenskapliga studier som styrker att just denna acidifikation är verksamt mot biofilm.

### 2.3.6. Peroxymonosulfat

På de flesta svenska djursjukhus finns rengöringsrutiner där peroxymonosulfat används för grundligare desinfektion/rengöring av stallar, operationsrum och andra ytor. Medlet tränger in i mikroorganismerna och skadar deras DNA varvid det enligt återförsäljare omöjliggör resistensutveckling. Det fungerar enligt syrabaserad kemi med organiska syror och oorganiska salter som denaturerar proteiner och därmed oskadliggör patogener. Vid en studie utförd i grisstallar såg man en reduktion av bakterier på betong, men inte en signifikant minskning av bakterier på metall efter samma desinfektionsmetod (Hancox *et al.* 2013). Medlet kan enligt tillverkare bleka och göra mörka ytor prickiga och det kan även erodera metaller varvid det ska torkas av efter anslagstiden. Det är skadligt för hud i utspädd form, men försök har gjorts på Irland där man har undersökt om man kan minska bakterieförekomst av bland annat salmonella genom att spraya slaktgrisar inför slakt med en utspädd variant, resultaten av den studien var dock svårbedömda (Walia *et al.* 2017). Peroxymonosulfat är främst verksamt på färsk biofilm det vill säga <2 dagar. Vid behandling av biofilm äldre än 5 dagar kunde inte samma reduktion av CFU påvisas (Osland *et al.* 2020).

## 3. Metod

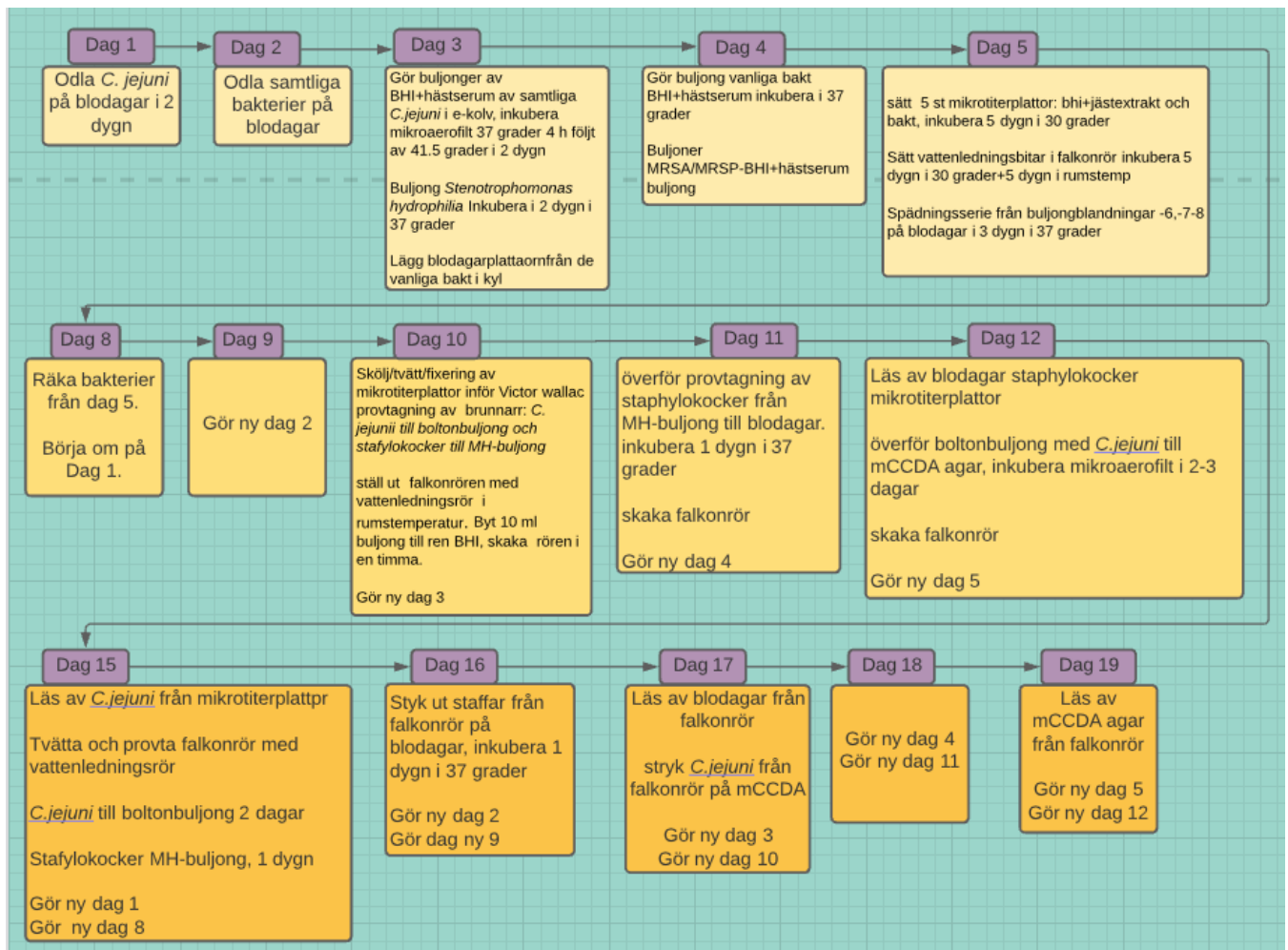
### 3.1. Studieupplägg

Metoden baserades på en pilotstudie som utfördes under tre veckor innan den slutgiltiga studien genomfördes. Detta för att standardisera modell och metod (se bilaga från sida 49). Pilotstudien ledde till att producera och studera biofilm genom en statisk och en dynamisk modell. I den statiska modellen användes mikrotiterplattor i vilka biofilm tilläts utvecklas utan att bakterier eller buljong tillsattes efter att inkubationen hade startat. I den dynamiska modellen användes vattenledningsrörbitar i falkonrör som inkuberades i fem dagar följt av 5 dagar i rumstemperatur där buljong och bakterier byttes ut i tillägg till daglig skakning, se sida 23–28 för detaljerad information.

Bakterier som är vanligt förekommande i djurmiljöer såsom stall, djurkliniker, djursjukhus, slakterier, dricksvattenledningar och i livsmedelslokaler valdes ut för att bygga den generella blandfloran i studien, se sida 21–22, där vidare MRSA, MRSP och *C. jejuni* studerades ytterligare.

Biofilmen som bildats bestämdes med adhesionsmätning genom optisk densitet efter fixering och färgning med kristallviolett, som ger ett indirekt svar på hur hårt en substans är bunden till en yta. Biofilm undersöktes även genom ATP-mätning som fastställer grad av kontamination av en yta baserat på referensvärden av Relative Light Units (RLU), vilket vanligen används på slakterier. Dessutom bekräftades biofilm okulärt och provtogs för *Staphylococcus* spp. och *Campylobacter* spp. efter desinfektion för att svara på hur de olika biofilmerna påverkats av de olika desinfektionsmedlen som ingick i studien.

Varje cykel av de två metoderna tog 19 dagar att utföra, och genomfördes med hjälp ett matrischema där en ny cykel dessutom påbörjades var 7 dag (Figur 2). Totalt gjordes 11 cykler av den statiska modellen med mikrotiterplattor inklusive pilotstudien (se bilaga) och 16 cykler av den dynamiska modellen som fortgick ca i 15 veckor.



Figur 2. Schema över hur labbstudien genomfördes över 11 veckor för den statiska modellen och 15 veckor för den dynamiska modellen.

Vid produktion av biofilmen i den här studien inkluderades nedanstående blandflora. Det är bakterier som både är kända för att bilda biofilm och som påvisats i biofilmsmiljö.

- *Pseudomonas aeruginosa*, från dricksvatten (kyckling)
- *Escherichia coli*, från hjärtsäck (kyckling)
- *Enterococcus faecalis*, från styckningslokal (kyckling)
- *Stenotrophomonas maltophilia*, från dricksvatten (kyckling)
- *Aeromonas hydrophilia*, från dricksvatten (kyckling)
- *Citrobacter freundii*, från styckningslokal

Nedanstående bakterier valdes ut baserat på deras koppling till sjukdomsutbrott och/eller var de påvisats, och är studiens fokus;

- *Staphylococcus aureus* MRSA, från djursjukhus (häst)
- *Staphylococcus pseudointermedius* MRSP, från djursjukhus (hund)
- *Campylobacter jejuni* ST-275, från dricksvatten (kyckling)
- *Campylobacter jejuni* ST-918, från transportlåda till slakt (kyckling)
- *Campylobacter jejuni* ST-21, från sockprov stall (kyckling)
- *Campylobacter jejuni* ST-148, från sockprov stall (kyckling)

Samtliga bakterier renodlades på 5 % nötblodagar som inkuberades i försluten plastpåse i 37 °C i ett dygn, bortsett från *C. jejuni* som inkuberades mik aerofilt i 41,5 °C i 2 dygn. Renodlade bakteriekolonier identifierades med MALDI-TOF MS för att säkerställa bakterieart.

## 3.2. Identifiering av bakterier

Identifiering av de inkluderade bakterierna skedde med hjälp av Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). Det går ut på att bakterieisolatet bestrålas med laser, vilket innebär att molekylerna i bakterien slås sönder till fragment. Tiden det tar för fragmentet att nå detektor beror på fragmentets storlek och laddning (time of flight). Denna tid mäts och ger upphov till ett masspektrum, vilken jämförs med en databas i maskinens mjukvara. Vid typning av en bakteriestam räknas sannolikheten ut att bakterien tillhör en viss bakterieart/stam (Wieser *et al.* 2012). Ett poängvärde på 0,000–1,698 betyder att typning inte var möjlig. 1,700–2,000 betyder att typning av bakterien är trolig för släkte men inte tillförlitligt på speciesnivå, och ett värde på 2,000–3,000 betyder att bakterien till stor sannolikhet har identifierats (VetBact 2020 ; Wieser *et al.* 2012).

Samtliga utvalda bakterier i studien identifierades med stor säkerhet.

## 3.3. Bakteriebuljonger inför biofilmsproduktion

### 3.3.1. Buljong av *Campylobacter jejuni*

Eftersom buljong av *C. jejuni* krävde två dagars inkubering påbörjades odlingen ett dygn innan övriga bakterier i studien.

En renodlad och typad koloni från samtliga utvalda *C. jejuni* stammar nämnda ovan, inokulerades separat i 10 ml BHI-buljong med 5 droppar filtrerat hästserum i en E-

kolv som blandades väl. Buljongerna inkuberades mikroaerofilt med hjälp av kommersiella gasgenererade kuvert (CampyGen, Oxoid) i lufttäta odlingsklockor i 37 °C i 4 timmar följt av 41,5 °C i 2 dygn (ISO 10272–1).

### 3.3.2. Buljong av bakterierna som ingick i blandfloran och MRSA/MRSP

Blandfloran skapades genom att först odla de utvalda bakterierna i separata buljonger. Eftersom *Stenotrophomonas acidiminiphilia* enligt tidigare erfarenhet från pilotstudien växte långsamt odlades denna i 10 ml BHI med 5 droppar filtrerat hästserum och inkuberades i 2 dygn i 37 °C. Resterande bakterier (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Aeromonas hydrophilia*, *Citrobacter freundii*, MRSA och MRSP) odlades i 100 ml BHI med 1 ml filtrerat hästserum vilken blandades i en steril bägare. 10 ml av lösningen placerades sedan i sju olika sterila glaströr. Sedan tillsattes en renodlad koloni av vardera bakteriestam i de olika glasen följt av blandning med hjälp av vortex i ca 20 sekunder. Därefter inkuberades rören i 37 °C i ett dygn. Efter inkubering i ett dygn blandades alla bakteriebuljongerna (på 10 ml av varje) utom MRSA/MRSP ihop i en steril bägare vilka motsvarade den gemensamma blandfloran som användas i studien. MRSA och MRSP behölls i sina separata glaströr.

En spädningsserie med peptonvatten gjordes på blandfloran, MRSA, MRSP och de olika stammarna av *C. jejuni* separat för att kunna beräkna koncentrationen av bakterier i CFU/ml.

### 3.3.3. Viable count

Spädningsserie från buljongerna gjordes för att bestämma det totala antalet bakterier som tillsattes vid varje biofilmsproduktion. Spädningar av: blandflora, MRSA, MRSP, och de olika sekvenstyperna av *C. jejuni* ST-21, ST-148 ST-275 och ST-918 gjordes med hjälp av en 10-stegs spädningsserie i 0,1% (v/v) peptonvatten (Dilucups, LabRobot products AB, Stenungsund, Sverige). 100 mikroliter från spädning -6, -7, -8 från samtliga bakteriebuljonger racklades ut på 5 % nötblodagar. Blandfloran, MRSA och MRSP inkuberades i plastpåse i 37 °C i 3 dygn medan agarplattorna med *C. jejuni* inkuberades mikroaerofilt i 37 °C i 3 dygn. Därefter beräknades antalet bakteriekolonier på respektive platta (Tabell 1). De olika bakterierna och blandfloran överfördes sedan till mikrotiterplattor och falkonrör för att påbörja bildningen av biofilm.

Tabell 1. Viable count (log CFU/ml) av bakteriebuljongerna som ingick i studien.

|                 | Bland-flora | MRSA | MRSP | <i>C.jejuni</i> ST-21 | <i>C.jejuni</i> ST-148 | <i>C.jejuni</i> ST-275 | <i>C.jejuni</i> ST-918 |
|-----------------|-------------|------|------|-----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Antal buljonger | 13          | 14   | 14   | 15                    | 15                     | 15                     | 15                     |
| Medelvärde      | 8,52        | 8,54 | 8,48 | 8,30                  | 8,19                   | 8,19                   | 8,31                   |
| Min             | 7,85        | 7,26 | 7,61 | 7,42                  | 7,60                   | 7,13                   | 7,30                   |
| Max             | 9,10        | 8,54 | 9,44 | 9,10                  | 8,19                   | 9,30                   | 9,31                   |

## 3.4. Mikrotiterplattor

### 3.4.1. Odling av biofilm i mikrotiterplattor

Plattbottnade polystyrene mikrotiterplattor med 96 brunnar, märkta med A-H vertikalt samt 1–12 horisontellt med utrymme för 300 µL i varje brunn användes (Figur 3).

- 250 µl BHI med 1 % jästextrakt (för att simulera smuts) tillsattes i samtliga brunnar.
- I rad A tillsattes 10 mikroliter blandflora. I rad B-C och E-F tillsattes 5 µl blandflora. Rad B tillsattes ytterligare 5 µl av MRSA. Rad C tillsattes ytterligare 5 µl MRSP och rad E-F tillsattes ytterligare 5 µl av olika stammar av *C. jejuni*. Samtliga brunnar fick en total mängd av 260 µl/brunn. Samtliga brunnar på rad D lämnades som negativ kontroll med 10 µl BHI (Figur 3).
- Mikrotiterplattorna förseglades med klisterplast för att minska risken för kontamination och avdunstning. Kanterna av klisterplasten tejpades ner med frystejp och locket till mikrotiterplattan placerades sedan över plattorna och förslutningen. Vidare användes ytterligare en plastpåse utanpå dessa för att omsluta mikrotiterplattorna i det 30 °C inkubationsskåpet där biofilmen fick växa i 5 dagar.

A. Blandflora 10µl  
 B. Blandflora 5µl + MRSA 5 µl  
 C. Blandflora 5µl +MRSP 5 µl  
 D. Negativ kontroll/BHI 10µl  
 E. Blandflora 5 µl +*C. jejuni* ST-257 5 µl  
 F. Blandflora 5 µl +*C. jejuni* ST-918 5µl  
 G. Blandflora 5 µl + *C. jejuni*, ST-21 5 µl  
 H. Blandflora 5 µl + *C. jejuni*, ST-148 5 µl



Figur 3. Mikrotiterplattornas bakteriekombinationer och mängder. Samt dess utseende med biofilm efter 5 dagars inkubation i 30 °C. Observera den genomskinliga negativa kontrollen på rad D. Plattan är fotograferad underifrån för att tydligare se färgskillnaderna. Bild: M. T. Viklund.

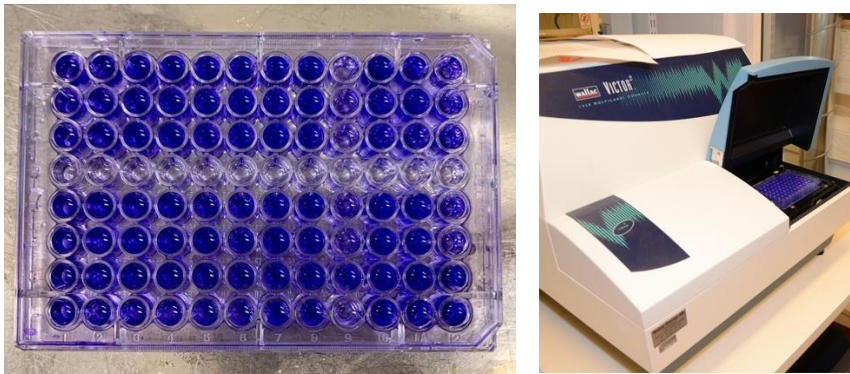


### 3.4.2. Skölja/tvätta/färga biofilmen på mikrotiterplattorna

Desinfektionsmedlen som ingick i studien tillreddes inför varje försök, applikationstiden bestämdes till 60 minuter oavsett återförsäljarnas rekommenderade anslagstid för att standardisera metoden. En okulär bedömning gjordes först av samtliga brunnar i mikrotiterplattorna för att kontrollera att kontamination inte skett i den negativa kontrollen och för att se uppenbara färgskillnader.

Grundläggande tvätt och fixering som användes, skedde enligt tidigare studier av mikrotiterplattor (Yang *et al.* 2019; Sternberg Lewerin & Fernström, 2017).

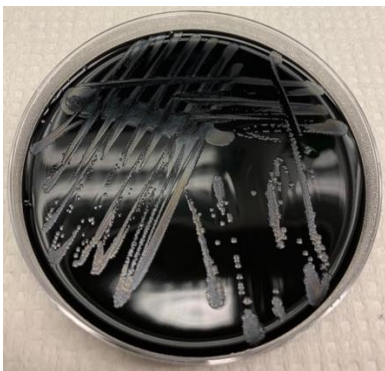
- Mikrotiterplattorna innehållande bakterier/biofilm tömdes efter fem dagars inkubering genom att vändas upp och ned och skakas försiktigt åtta gånger ner i en behållare för farligt avfall med uppsamlade papper runt för att inte kontaminera miljön.
- 300 µl sterilt vatten pipetterades i varje brunn för att skölja bort de planktoniska bakterierna vilka hölls ut i avfallsbehållaren.
- Vattensköljningen följdes av tvätt med de olika desinfektionsmedlen (70 % etanol, hypoklorsyra, väteperoxid, peroxymonosulfat, buffrade organiska syror med ammoniumsalt eller perättiksyra). En hel mikrotiterplatta användes för ett desinfektionsmedel i taget. Samtliga desinfektionsmedel verkade i 60 minuter där 300 µl desinfektionsmedel tillsattes i kolumn 1–9. Medan kolumn 10–12 användes som negativ kontroll och tvättades endast med sterilt vatten i 60 minuter.
- Tvätten följdes av en ytterligare sköljning med 300 µl sterilt vatten för att avlägsna rester av desinfektionsmedel.
- Därefter följdes provtagning med steril tops av kolumn 9 som hade utsatts för desinfektionsmedel och kolumn 12 som tvättats med sterilt vatten för att vidare undersöka överlevnaden/förekomsten av *C. jejuni*, MRSA och MRSP i biofilm.
- Det som fanns kvar av biofilmen i brunnarna efter tvätt och sköljning fixerades med 300 µl metanol som fick verka i 15 minuter följt av lufttorkning.
- Biofilmen färgades efter lufttorkning med 300 µl kristallviolett i 5 minuter (Pitts *et al.* 2003), vilken därefter sköljdes ur med rinnande vatten följt av ytterligare lufttorkning.
- Sist tillsattes 300 µl, 3 % ättika till varje brunn. Ättikan lämnades kvar i kärlet för att resa biofilmen i vätska inför analys av ljusabsorbansen (Figur 4; Pitts *et al.* 2003). Ljusabsorbansen mättes i optisk densitet (OD) genom 520 nm med maskinen 1420 Wallac VICTOR 2 multilable counter mikrotiter plate reader (Stepanović *et al.* 2007). Maskinen mäter en substans adhesion till en yta som i detta fall indirekt svarar på hur mycket biofilm som finns i mikrotiterbrunnarna. På så sätt kunde en bedömning göras hur de olika desinfektionsmedlen destruerar och avlägsnar biofilm.



Figur 4. Mikrotiterplatta med biofilm infärgad med kristallviolett, inför adhesionsmätning med Victor wallac plate reader. Rad D påvisar tydligt den negativa kontrollen. Kolumn 9 och 12 visar ljusare lila färgskillnad som tyder på att biofilm avlägsnats mekanisk efter svabbingen med tops för undersökningen av förekomst av MRSA, MRSP eller *C. jejuni*. Bild: M. T. Viklund

### 3.4.3. Överlevnad av *Campylobacter jejuni*

Överlevnaden av *C. jejuni* i biofilmen i mikrotiterplattorna analyserades med hjälp av svabbprov från kolumn 9, rad A och E-H efter påverkan av rengöringsmedel, och kolumn nr 12 rad A och E-H som negativ kontroll där endast sterilt vatten används. Brunnarna svabbades med en steril tops som placerades i Bolton-buljong (Oxoid) med blodtillsats. Boltonbuljongen med topsen inkuberades mikroaerofilt i 37 °C i 4 timmar följt av 2 dygn i 41,5 °C. Temperaturhöjningen användes för att hämma växt av blandflora som endast växer i 37 °C. Efter 2 dygns anrikning överfördes två fulla loopar (2x10 µl) till modifierad blodfri mCCDA agar (Oxoid) vilket är en selektiv agarplatta för analys av *C. jejuni* (Figur 5). mCCDA inkuberades mikroaerofilt i 2 dygn, därefter gjordes en bedömning om förekomst eller inte av *C. jejuni*.



Figur 5. *Campylobacter jejuni* på mCCDA-agar. Bild: M. T. Viklund.

#### 3.4.4. Överlevnad av *Staphylococcus* spp.

Överlevnaden av *Staphylococcus* spp. i biofilm i mikrotiterplattorna analyserades med hjälp av svabbprov från kolumn 9, rad B-D efter påverkan av desinfektionsmedlen, och kolumn nr 12 rad B-D som negativ kontroll där endast sterilt vatten använts. Brunnarna svabbades med steril tops vilka därefter placerades i sterilt rör med 6,5 % Müller-Hinton saltbuljong (MH-buljong) och inkuberades i ett dygn i 37 °C. Därefter spreds två droppar med en blå inokulationsögla (2x10 µl) på 5 % nötblodagar, vilken inkuberades i 37 °C i ett dygn. Därefter gjordes en bedömning om förekomst eller inte av hemolyserande *Staphylococcus* spp.. Misstänka kolonier typades med MALDI-TOF MS.

### 3.5. Odling av biofilm på vattenledningsrör

Falkonrör av plast som rymmer 50 ml (Figur 6) med tillhörande skruvkork användes i den dynamiska modellen där byte av buljong, bakterier och daglig skakning tillämpades.

- Använda, uppkapade (3 cm långa) vattenledningsrörbitar från en kycklinganläggning lades i sterila falkonrör (Figur 6). Det tillsattes ytterligare 25 ml BHI med 1 % jästextrakt, för att simulera smuts.
- 1 ml blandflora (se punkt 3.3.2) tillsattes samtliga falkonrör.
- 1 ml av de olika campylobacterstammarna (se punkt 3.3.1), 1 ml MRSA eller MRSP tillsattes i varsitt rör (blandflora med *C. jejuni* ST-21, blandflora med *C. jejuni*, ST-148, blandflora med *C. jejuni* ST-257, blandflora med *C. jejuni* ST-918, blandflora med MRSA, samt blandflora med MRSP).
- Rören inkuberades i 30 °C i 5 dagar. På den 5:e dagen skedde ett vätskebyte där 10 ml av blandningen byttes ut mot ny BHI med 1 % jästextrakt. På den 7:e dagen tillsattes 1 ml nyodlade stammar av *C. jejuni*, MRSA eller MRSP till rätt falkonrör.
- Dag 5–10 skakas rören maskinellt i 60 minuter om dagen måndag-fredag, samt de helgdagar när det fanns personal på labbet.
- Dag 10 lades rörbitara i desinfektionsmedel, se punkt 3.5.1: Tvätt av biofilm på vattenledningsrör.



Figur 6. Biofilmsodling på plaströrsbitar i falkonrör. Bild: M. T. Viklund

### 3.5.1. Tvätt av biofilm på vattenledningsrör

- Samtliga vattenledningsrörbitar från varje bakteriekombination (blandflora med *C. jejuni* ST-21, blandflora med *C. jejuni*, ST-148, blandflora med *C. jejuni* ST-257, blandflora med *C. jejuni* ST-918, blandflora med MRSA, samt blandflora med MRSP) i falkonrören, sköljdes först i ett kranvattenbad i separata petriskålar, för att avlägsna de planktoniska bakterierna.
- Vissa av rörbitarna användes sedan som positiv kontroll och lades i ett bad av rumstempererat sterilt vatten i en timme medan de resterande bitarna lades i rengöringsbad med de olika desinfektionsmedlen (väteperoxid, perättiksyra, hypoklorsyra, peroxymonosulfat, 70 % etanol, buffrade organiska syror) i separata petriskålar i en timme (Figur 7).
- Alla bitarna sköljdes sedan på nytt med sterilt vatten för att tvätta av rester av desinfektionsmedlet.
- Mätning av ATP gjordes på hälften av bitarna. Resterande bitar svabbades med steril bomullstopps vilken anrikades antingen för detektion av antingen *C. jejuni* eller MRSA/MRSP.



Figur 7. Rengöring av biofilm som växt på vattenledningsrör. På rad ett sköljs vattenledningsbitarna i sterilt vatten, rad två består av olika desinfektionsmedel och en positiv kontroll, rad tre är den sista sköljningen för att avlägsna rester av desinfektionsmedlet och rad 4 är petriskålar för lufttorkning innan provtagning. Bild: M. T. Viklund

### 3.5.2. ATP mätning av biofilm på vattenledningsrör

Adenosin tri-fosfat (ATP)-svabb för ytor, användes för att undersöka hur kontaminerad en yta var genom relative light units (RLU) vilket gjordes med hjälp av en luminometer. Det fungerar genom luciferin-luciferas systemet där ATP reagerar med syre och luciferin som skapar ett sken av bioluminescence vars styrka korrelerar med mängden ATP och därmed indirekt hur mycket kontaminering som förekommer (Kyriakides & Patel 1995).

Två vattenledningsbitar som legat i desinfektionsmedlet och två bitar från den positiva kontrollen (sterilt vatten) ställdes på högkant i en petriskål för att lufttorka helt innan den rumstempererade ATP-svabben användes.

Med 360° av en steril ATP-svabb svabbades en torr yta av 2,5 cm<sup>2</sup> på rörbitarnas insida i ca 15 sekunder, svabben trycktes sedan ner i den rumstempererade aktiva substansen bestående av enzymer och skakades för hand i 10 sekunder för att homogenisera lösningen följt av mätning med luminometern som gav ett mått på kontamineringsgrad.

Gränsvärden är specifika för den enskilda maskinen, maskinen som användes i detta försök har RLU-värden för 10\*10 cm yta och är enligt tillverkaren: Godkänt=<1000, ej godkänt=1000–10000. Ytan anpassades efter 2,5 cm till: Godkänt <400, >400=ej godkänt.

### 3.5.3. Överlevnad av *Campylobacter jejuni* och *Staphylococcus* spp. i biofilm på vattenledningsrör

Med en steril tops svabbades insidan av en bit vattenledningsrör som legat i desinfektionsmedel, och en annan steril tops på den kontrollbiten som sköljts i vatten för att undersöka överlevnad av *C. jejuni*. Topsen placerades i anrikande boltonbuljong, vilken först vortexades i 10 sekunder på hög effekt för att sedan inkuberas mikroaerofilt i 4 timmar i 37 °C, följt av 2 dygn i 41,5 °C. Därefter överfördes ca 20 µl av anrikningsbuljongen med en blå inokulationsögla som doppats precis under ytan av buljongen till mCCDA agarplattor som inkuberades mikroaerofilt i 41,5 °C i 2 dygn inför manuell avläsning (ISO 10272–1 och 10272–2).

För att analysera överlevnad av *Staphylococcus* spp. svabbades vattenledningsrören på samma sätt som ovan, och därefter anrikades topsen i 6,5 % MH-buljong, vilken inkuberades i 37 °C i ett dygn, följt av inokulering av två droppar (2x10 µl) vilka ströks ut på 5 % nötblodagar och inkuberades i ytterligare ett dygn i 37 °C för manuell avläsning.

## 4. Resultat

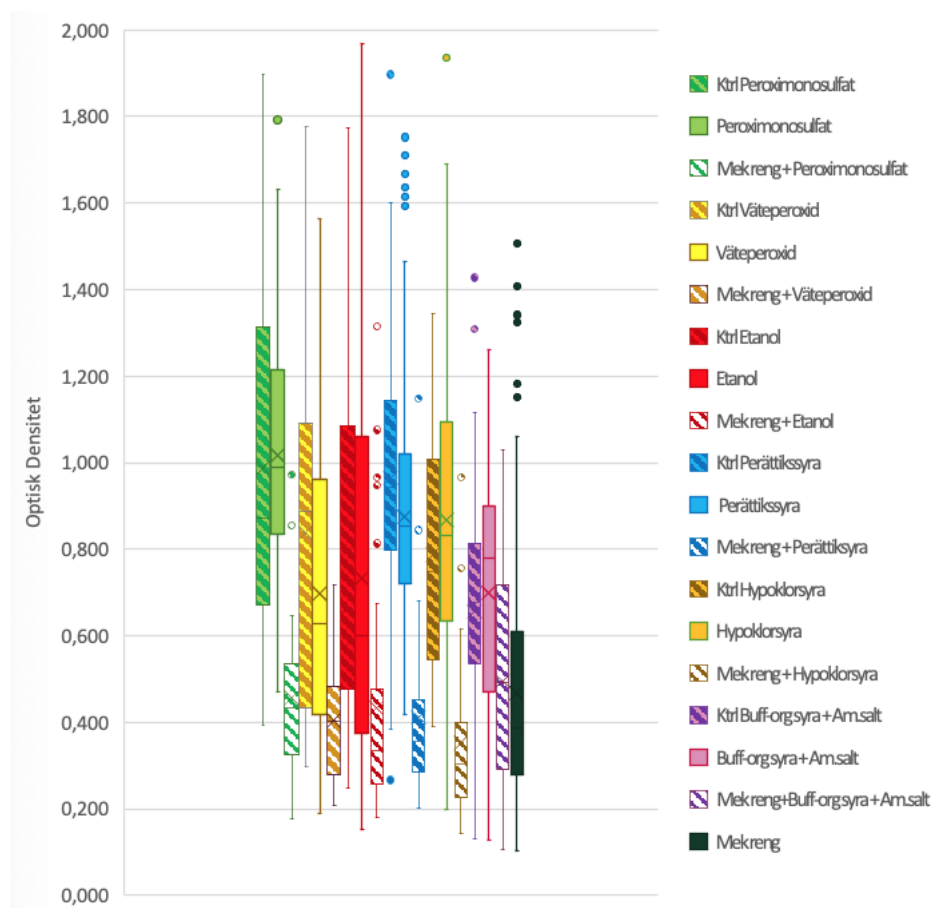
### 4.1. Mikrotiterplattor

Totalt analyserades 3264 mikrotiterbrunnar från 34 mikrotiterplattor med de olika bakteriekombinationerna och dess påverkan av sex olika desinfektionsmedlen. Varje desinfektionsmedel analyserades på 480–672 mikrotiterbrunnar, där varje bakteriekombination/bakteriestam med respektive desinfektionsmedel motsvarade ca 40–80 avläsningar eller analyser.

#### 4.1.1. Biofilm i mikrotiterplattor

Avläsning av den optiska densiteten, indikerade att väteperoxid var mest effektiv att avlägsna biofilm med en genomsnittlig reduktion på 0,141 följt av etanol och perättiksyra med en reduktion på 0,090 resp 0,063 (Figur 8; Tabell 2). Mest spridning av den optiska densiteten påvisades efter rengöring med 70 % etanol (Figur 8), det innebär att tolkningen av dess effekt är svårbedömd. Enligt denna modell med mikrotiterplattor där optisk densitet mättes, var det genomsnittliga värdet av desinfektion med peroxymonosulfat och hypoklorsyra högre (0,028 resp 0,080) än den positiva kontrollen där endast sterilt vatten använts för att avlägsna biofilm (Tabell 2). Buffrade syror hade tvetydliga resultat där den generella bilden är att det har viss effekt, dock bedöms det som slumpartat.

Den mekaniska rengöringen tillsammans med desinfektion visar i samtliga försök, bättre resultat än när endast desinfektionsmedel användes (Tabell 2; Figur 8). Hypoklorsyra och väteperoxid var mer effektivt jämfört med resterande desinfektionsmedel. En intressant observation var att mekanisk rengöring utan desinfektion var mer effektivt än endast användning av desinfektionsmedel (Figur 8).



Figur 8. Fördelning av den optiska densiteten i mikrotiterplattor efter en timmes verkningstid av de olika desinfektionsmedlen och positiv kontroll (ktrl) med sköljning av sterilt vatten samt med och utan föregående mekanisk rengöring (mek reng). En högre optisk densitet desto större mängd adhesion har uppmätts och därmed mer kvarvarande biofilm. Ett lägre värde motsvarar således mindre biofilm.

Tabell 2. Jämförelse av medelvärde ( $\mu$ ) av optisk densitet från avläsning av; positiv kontroll utan desinfektionsmedel, och efter en timmes verkningstid för de olika desinfektionsmedlen samt med och utan föregående mekanisk rengöring (mek reng), samt reduktionen (Red) beräknad för respektive desinfektionsmedel med och utan mekanisk rengöring

|                                            | Peroxymono-sulfat | Väte-peroxid | 70% Eta-nol | Perättik-syra | Hypoklor-syra- | Buffrade sy-ror |
|--------------------------------------------|-------------------|--------------|-------------|---------------|----------------|-----------------|
| <b>Pos kontroll <math>\mu</math></b>       | 0,988             | 0,838        | 0,796       | 0,965         | 0,787          | 0,656           |
| <b>Desinf. <math>\mu</math></b>            | 1,016             | 0,697        | 0,733       | 0,875         | 0,867          | 0,698           |
| <b>Mek reng.+ desinf. <math>\mu</math></b> | 0,495             | 0,404        | 0,434       | 0,411         | 0,351          | 0,495           |
| <b>Red; ktrl-des inf</b>                   | -0,028            | 0,141        | 0,063       | 0,09          | -0,08          | -0,042          |
| <b>Red; ktrl-des inf+mek reng</b>          | 0,493             | 0,434        | 0,362       | 0,554         | 0,436          | 0,161           |

#### 4.1.2. Överlevnad av *Campylobacter jejuni* i biofilm från mikrotiterplattor

Överlevanden av *C. jejuni* bedömdes genom avläsningen av 300 svabbar tagna från mikrotiterplattor, varav 150 prov från brunnarna efter rengöring med desinfektionsmedel och 150 prover från motsvarande positiv kontroll efter sköljning med sterilt vatten. Av proverna tagna efter rengöring med desinfektionsmedel kunde *C. jejuni* påvisas i 8 av 150 prover. I den positiva kontrollen kunde *C. jejuni* påvisas från endast 24 av 150 prover.

Generellt var det således svårt att få *C. jejuni* att överleva i mikrotiterplattor även i de positiva kontrollerna som ej utsatts för desinfektionsmedel. Endast sparsam växt kunde ses vid användning efter desinfektion med buffrade syror och perättiksyra. Vid desinfektion av övriga desinfektionsmedel kunde ingen växt av *C. jejuni* påvisas. Baserat på den låga överlevnadsfrekvensen kunde ingen bedömning göras avseende desinfektionsmedlens påverkan på *C. jejuni* i biofilm i mikrotiterplattor som ingick i studien.

#### 4.1.3. Överlevnad av MRSA och MRSP i biofilm från mikrotiterplattor

Överlevanden av MRSA och MRSP analyserades genom svabbprov från 160 brunnar från mikrotiterplattor, 80 prov togs efter behandling av olika desinfektionsmedel och 80 prover från motsvarande positiv kontroll med sterilt vatten. I proverna tagna efter desinfektionsmedel kunde MRSA och MRSP påvisas från 7 av 70 prover (10 prover från perättiksyra fick uteslutas pga metodfel), varav buffrade syror stod för 4/10 av de positiva resultaten (där varje desinfektionsmedel utgjorde 10–20 analyser). I den positiva kontrollen med sterilt vatten kunde MRSA och MRSP påvisas från 24 av 70 prover. Resultaten indikerar att även MRSA och MRSP hade varierande grad av överlevnadsförmåga både efter desinfektion och i den positiva kontrollen med sköljning av sterilt vatten i mikrotiterplattor.

Peroxymonosulfat var effektivast på att avlägsna bakterier i biofilm av blandflora i mikrotiterplattor som var fem dagar gammal med 100 % negativa provsvar för *Staphylococcus* spp. med endast växt av enterokocker i 15 % av brunnarna. Etanol och hypoklorsyra hade också 100 % negativa provsvar för *Staphylococcus* spp., men båda hade istället riklig växt av *Enterococcus fecalis* i samtliga av deras provtagna brunnar.

Generellt visade buffrade syror den sämsta förmågan att avlägsna MRSA och MRSP i biofilm i mikrotiterplattor (40 % positiva provsvar). Även väteperoxid gav tvetydliga resultat vad gäller avlägsnandet av MRSA och MRSP som var fem dagar gammal i mikrotiterplattor med sporadiskt positiva prov, mer data är nödvändigt



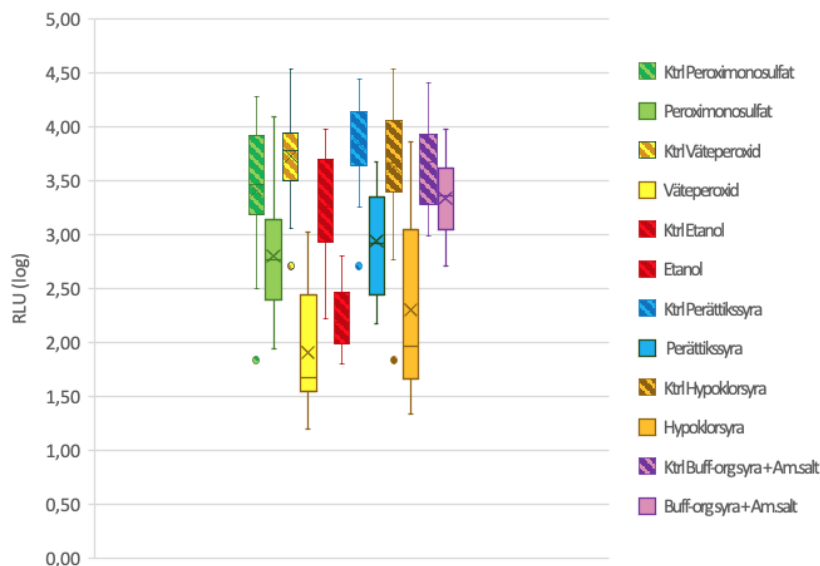
för att kunna dra några säkra slutsatser. Överlevnaden av MRSA och MRSP efter behandling med perättiksyra kunde inte bedömas då ingen överlevnad kunde påvisas varken efter desinfektion (10 prover) eller den positiva kontrollen med sterilt vatten (10 prover), vilket bedöms som metodfel av oklar grund.

## 4.2. Vattenledningsrör

Totalt analyserades 765 bitar av vattenledningsrör med antingen ATP-mätare (288 rörbitar) eller överlevnad av *C. jejuni* (300 rörbitar) eller överlevnad av *Staphylococcus* spp. (177 rörbitar) efter behandling med väteperoxid, hypoklorsyra, perättiksyra, 70 % etanol, buffrade syror eller peroxymonosulfat.

### 4.2.1. ATP-mätning från vattenledningsrör med biofilm

Samtliga desinfektionsmedel reducerade mängden bakterier och RLU var lägre efter behandling av desinfektionsmedlet jämfört med dess positiva kontroller med tvätt av sterilt vatten. De desinfektionsmedel som gav störst genomsnittlig reduktion mellan den positiva kontrollen och desinfektionsmedel var väteperoxid och hypoklorsyra (log 1,82 resp 1,33) (Figur 9 och Tabell 3). Minst effekt sågs vid användning av buffrade syror, med en reduktion av log 0,31 följt av peroxymonosulfat, log 0,61 vad gäller att avlägsna biofilm på vattenledningsrör (Figur 9 och Tabell 3).



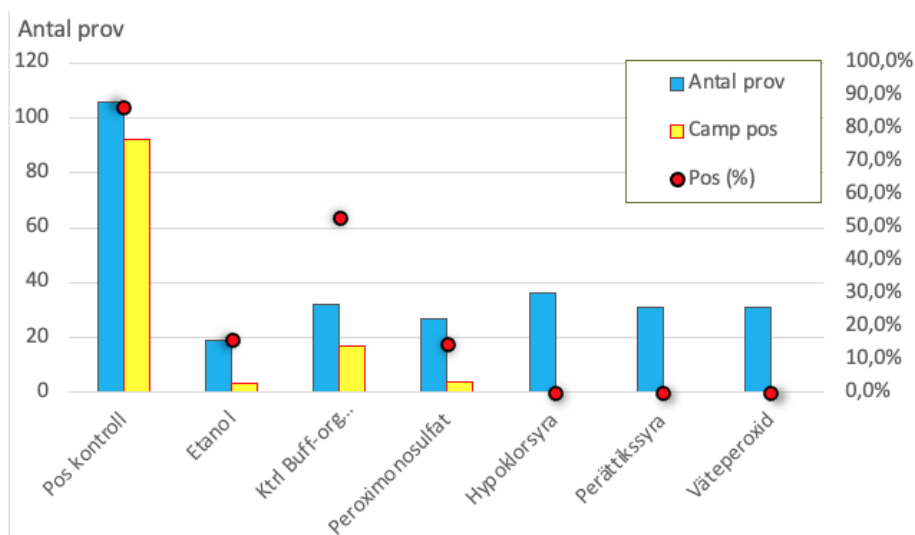
Figur 9. Fördelningen av logaritmerade ATP-värden (RLU) från vattenledningsrör med biofilm av blandflora med MRSA, MRSP eller *C. jejuni*, efter desinfektion med peroxymonosulfat, väteperoxid, 70 % etanol, perättiksyra och hypoklorsyra, samt en jämförelse med deras positiva kontroll (Ktrl) med sterilt vatten.

Tabell 3. Medelvärden( $\mu$ ) (log 10) av ATP-mätningar (RLU) från vattenledningsrör med biofilm efter desinfektion med peroxymonosulfat, väteperoxid, 70 % etanol, perättiksyra, hypoklorsyra och buffrade syror samt en jämförelse med deras positiva kontroll av sterilt vatten i tabellform.

|                                            | Peroxy-<br>mono-sulfat | Väte-<br>peroxid | 70%<br>Etanol | Perättik<br>syra | Hypo-<br>klorsyra | Buffrade<br>syror |
|--------------------------------------------|------------------------|------------------|---------------|------------------|-------------------|-------------------|
| <b>Kontroll <math>\mu</math><br/>log10</b> | 3,41                   | 3,73             | 3,25          | 3,83             | 3,63              | 3,65              |
| <b>Desinf <math>\mu</math><br/>log10</b>   | 2,80                   | 1,91             | 2,24          | 2,94             | 2,30              | 3,34              |
| <b>Reduktion<br/>(log)</b>                 | 0,61                   | 1,82             | 1,01          | 0,89             | 1,33              | 0,31              |

#### 4.2.2. Överlevnad av *Campylobacter jejuni* i biofilm på vattenledningsrör

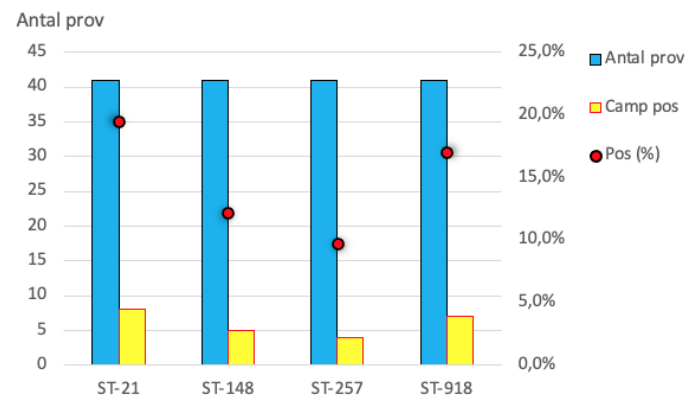
Inga *C. jejuni* kunde påvisas i prov från vattenledningarna efter behandling med väteperoxid, hypoklorsyra, och perättiksyra (Figur 10). Mindre effektiva att avdöda *C. jejuni* i biofilm var buffrade syror där *C. jejuni* kunde påvisas i 53 % av vattenledningarna efter behandlingen. *C. jejuni* kunde isoleras ifrån 15 % respektive 16 % av vattenledningsbitarna som behandlades med peroxymonosulfat respektive 70 % etanol (Figur 10).



Figur 10. Förekomst av *Campylobacter jejuni* i biofilm i vattenledningsrör efter behandling med sex olika desinfektionsmedel.

Vissa sekvenstyper av *C. jejuni* var mer motståndskraftiga mot desinfektionsmedel än andra sekvenstyper (Figur 11). Den sekvenstyp som var mest motståndskraftig

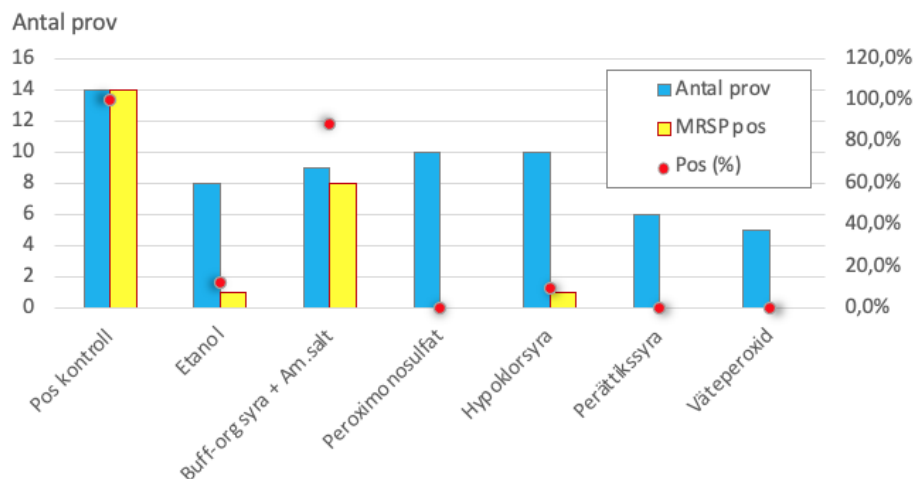
var ST-21 som ursprungligen isolerats från sockprov i kycklingstall. I den här studien hade den dubbelt så hög överlevnadsfrekvens än ST-257 som är isolerat från dricksvattenledningar i kycklingstall.



Figur 11. Överlevnad av de olika sekvenstyperna av *Campylobacter jejuni* i biofilm från vattenledningsrör efter behandling av sex olika desinfektionsmedel. Staplarna visar sammanlagda resultatet för samtliga desinfektionsmedel.

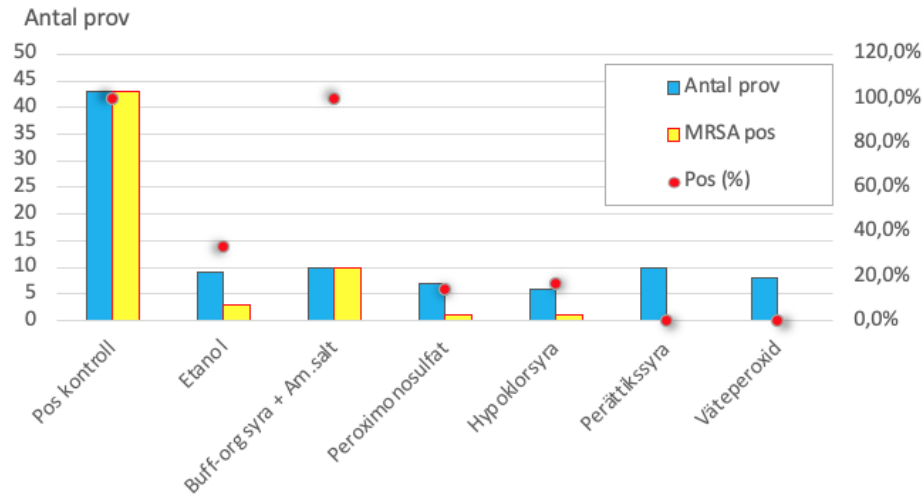
#### 4.2.3. Överlevnad av MRSA och MRSP i biofilm på vattenledningsrör

Inga MRSP kunde påvisas i prov från vattenledningarna efter behandling med väteperoxid, peroxymonosulfat, och perättiksyra. Buffrade syror visade i den här studien på minst effekt att avlägsna MRSP i blandflora i biofilm i vattenledningsrör då MRSP kunde påvisas från 89% av vattenledningsrören (Figur 12).



Figur 12. Förekomst av MRSP i vattenledningsrör efter behandling med sex olika desinfektionsmedel, samt positiv kontroll vid rengöring med vatten.

Inga MRSA kunde påvisas i prov från vattenledningarna efter behandling med väteperoxid och perättiksyra. Buffrade syror visade ingen effekt alls, då MRSA kunde påvisas från samtliga (100 %) av vattenledningsrören efter behandling (Figur 13).



Figur 13. Förekomst av MRSA i vattenledningsrör efter desinfektion med sex olika desinfektionsmedel, samt positiv kontroll vid rengöring med vatten.

## 5. Diskussion

Framställningen av biofilm delas oftast upp i statiska och dynamiska modeller (Kanematsu & Barry 2020). Statische modeller inkluderar olika mikrotiterplattor, vilket är effektivt då kvantiteten brunnar som testas samtidigt blir hög. Några exempel på användning av mikrotiterplattor, utöver metoden i denna studie, är ”Biofilm ring test” där magnetiska kulor blandas i bakteriebuljongen som placeras i mikrotiterplattor som eventuellt möjliggör mindre tvättning och färgning (Olivares *et al.* 2016), eller ”calagary biofilm device” där små pluggar förs ner i mikrotiterplattorna som tillåter tillväxt på pluggen utan risk för kontaminering och används främst inom resistens och tolerans tester (Ceri *et al.* 1999). Bland de dynamiska metoderna finns flödessystem som försöker efterlikna verkligheten mer t ex Drip flow biofilms reaktorer, eller rotations disk reaktorer (Kanematsu & Barry 2020). För att sedan analysera biofilmen används färg eller genanalys samt proteinanalys där resultaten tyder på viss svårighet att extrapolera värdet direkt till biofilm. Olika länder har olika sätt som sin standard att mäta biofilm där USA ofta skrapar av ytan och odlar för CFU/kvadratcentimeter (Kanematsu & Barry 2020) vilket uteslöts i denna studie efter test i pilotstudien. I Europa tittar man ofta på viabla bakterier före och efter ett medel har applicerats genom att ta ytprover (Kanematsu & Barry 2020) som vi gjort i den här studien. Enligt standarden SS- krävs en reduktion på 5 log för säga att ett medel är verksamt (SS-EN 14349:2012), dock innebär den europeiska metoden att man inte enbart kan bedöma biofilm då det alltid testas i relation till en substans som förväntas avlägsna eller påverka biofilmen.

I denna studie gjordes en kombination av många tidigare studier för att analysera biofilm och vidare undersöka hur en adhesion genom optisk densitet kan komplettera informationen. En sammanslagen bedömning från den statiska modellen med mikrotiterplattor och den något mer dynamiska delen med vattenledningsrören gjordes huruvida biofilm av blandflora med MRSA, MRSP eller *C. jejuni* påverkas av hypoklorsyra, perättiksyra, väteperoxid, buffrade syror, peroxymonosulfat eller 70 % etanol. Resultaten tyder på att överlevnad av *C. jejuni* i biofilm påverkades mest av väteperoxid, perättiksyra och hypoklorsyra, vilka därmed borde vara effektiva vid desinfektion av kycklingstallar och slakterier både vid förebyggande desinfektion och rengöring. Vid rengöring av biofilm innehållande MRSA och MRSP var det dock väteperoxid och perättiksyra som var mest effektiva. Vidare forskning

krävs dock för att hitta effektiva metoder för att bedöma biofilm för att sedan korrekt kunna uttala sig om vilket medel som är mest funktionellt i olika lägen. Det behövs också en mer realistisk modell för att de ska kunna appliceras *in vivo*.

Data från denna studie visade att rengöringsmedel och desinfektionsmedel bör anpassas till de mikroorganismer som förväntas i miljön och hur smutsig miljön är som ska desinficeras. De bioelastiska egenskaperna blir olika beroende på både miljön och de bakterier som förekommer i biofilmen som således avgör biofilmens 3D struktur. Därför kommer biofilmer således påverkas olika av olika desinfektionsmedel (Jones *et al.* 2011).

Resultaten visade även att de mikrotiterbrunnar som svabbats med tops samt behandlats med desinfektionsmedel hade markant mindre biofilm med ett lägre värde på den optiska densiteten hos samtliga desinfektionsmedel. Dessutom sågs att mekanisk rengöring ibland kunde vara mer effektivt på att avlägsna biofilm än att endast använda desinfektion utan mekanisk rengöring. Studien var dock begränsad och ingen statistisk analys har utförts, varvid ytterligare undersökningar krävs för att med säkerhet bekräfta eller avkasta slutsatsen från den här deskriptiva studien.

Den statiska modellen med mikrotiterplattor är svår att extrapolera till *in vivo* då brunnarna i mikrotiterplattorna är små och verkligheten heller inte är oföränderlig. Att endast undersöka den metoden ger en orealistisk bild och resultaten blir svåra att analysera ensamt, även om tendenser kan ses om ett medel fungerar eller ej. Den mer dynamiska modellen med vattenledningsrör (med simulering av verkligheten genom att skapa ett flöde med hjälp av en timmas daglig skakning) är troligen mer lik vad som händer i vattenledningar, men det är svårt att göra en optimal modell. Alternativet skulle möjligen vara ett droppsystem med vatten för att efterlikna vattenflödet i vattenledningarna men det skulle ta för lång tid och vara för svårt att standardisera. Syftet var dock att undersöka hur effektiva dessa sex desinfektionsmedel var, varvid metoden och den gemensamma bedömningen över de två sätten bedömdes som rimlig för ändamålet. I försöken har vi optimerat tillväxten av biofilm genom anrikningsbuljong och inkubatorer. Det skulle vara intressant att i stället använda vatten och låta biofilmen bildas naturligt i rumstemperatur från början, dock skulle det kräva mer tid då processen skulle gå mycket långsammare.

För samtliga desinfektionsmedel som användes i studien har resultat från tidigare forskning visat på varierande effektivitet. Resultaten från denna studie tyder på att det är lite skillnad i effektivitet mellan flera av de använda medlen, även om väteperoxiden visar sig lämplig för biofilmer som är mer robusta (äldre). I en studie från USA påvisas att hypoklorsyra kan vara lika effektivt som väteperoxid (Raval *et al.* 2021). Väteperoxid och hypoklorsyra har liknande verkningsmekanism då väteperoxid omvandlas till hypoklorsyra genom enzymreaktioner. Deras effekt har också

visat sig vara samstämmiga i en biofilmsstudie *in vitro* (Winterbourn *et al.* 2006), dock var den effekten inte självklar i den här studien.

För att bedöma hur mycket biofilm som fanns kvar efter påverkan av desinfektionsmedel, användes optisk densitet för att mäta adhesion av substansen i mikrotiterbrunnarna, vilket extrapolerats som likvärdigt med biofilm. Denna metod kan möjligen ifrågasättas då det i nuläget inte finns standardiserade metoder för att mäta biofilm. Ett alternativ hade kunnat vara att använda rheometri för att mäta hur stabil biofilmen är, detta skulle eventuellt ge en bättre uppfattning om hur viabel en biofilm är efter desinfektion. I en engelsk studie (Jones *et al.* 2011) och en review från Texas (Bahamondez-Canas *et al.* 2019) användes rheometri för att bedöma biofilmens mekaniska egenskaper. Metoden hjälper forskare att förstå hur olika substanser påverkar biofilmen där till exempel glutaraldehyd försvagade biofilm av *P. auriginosa*, medan multivalenta katjoner som järn, aluminium och magnesium istället gjorde biofilmen stelare och därmed svårare att avlägsna. Det är oklart vart exakt i mikrotiterbrunnarna den optiska densiteten mäts med Victor wallac. En möjlighet är Victor wallac främst läser botten av brunnarna trots att biofilmen oklart var tjockast på kanterna, vilket skulle kunna ge en skev bild av hur mycket adhesion som faktiskt existerar, där rheometri möjligen ger en säkrare analys.

Optimalt hade varit om det var möjligt att mäta den optiska densiteten i mikrotiterplattornas brunnar både före och efter tvätt och desinfektion, för att kunna jämföra samma brunnars förväntade förändrade adhesionsvärden. Det var dock praktiskt omöjligt då metoden krävde att man fixerade och färgade inför mätning av den optiska densiteten. Den positiva kontrollen med sterilt vatten som utfördes i egna brunnar fick ge ett motsvarande medelvärde. En annan aspekt i huruvida VICTOR2 wallac mäter biofilm skulle kunna vara att mogen och omogen biofilm skiljer sig åt. Mogen biofilm knoppar av och släpper lättare än ny biofilm. Vid användning av VICTOR2 wallac finns en risk att det möjligen ger högre värden för en omogen biofilm där adhesionsvärdet skulle kunna vara högre än hos en porös mogen biofilm. I den här studien ges därför den samlade bilden genom att dra slutsatser från två metoder, där ATP-mätning används för att undersöka kontaminationsgraden och då indirekt ge svar på hur mycket biofilm som är kvar efter desinfektion. ATP-mätning påvisade tydliga skillnader mellan användning av desinfektionsmedel och kontrollen där sterilt vatten användes, varvid det bedömdes som en metod som kunde komplettera adhesionsmätningarna.

Det unika med denna studie var att studera många parametrar samtidigt vad gäller biofilm och desinfektion. Många studier (Stepanov *et al.*, 2007; Graziano *et al.*, 2013; Pitts *et al.*, 2003) fokuserar på få bakteriearter och ett färre antal rengörings- och/eller desinfektionsmedel för att avgöra om det är effektivt eller inte. En mer

komprimerad studie med fler analyser per parameter kan vara fördelaktigt då det ökar chansen att påvisa signifikanta skillnader. Att undersöka en blandflora av sex olika bakterier där tre andra bakterier (MRSA, MRSP och *C. jejuni*) undersöks specifikt och hur dessa påverkas av sex olika desinfektionsmedel i två olika metoder försvårar möjligheten att hitta signifikanta skillnader.

Det finns som sagt lite forskning på denna komplexitet av bakterier i blandflora i samma studie. Även om denna studie inte är optimal är det ändå ett steg närmre en modell som efter vidare modifikationer skulle kunna användas i jämförande studier av många parametrar



## 6. Konklusion

Konklusionen av studien var att väteperoxid i kombination med mekanisk rengöring var den metod som fungerade bäst avseende att avlägsna biofilm av blandflora med MRSA, MRSP eller *C. jejuni*. Detta gäller framförallt om biofilmen är äldre och mer robust. Vilket innebär att det skulle kunna fungera som ett komplement i rengöringsrutiner för olika yrkeskategorier, men vidare forskning krävs med statistiska analyser för att bekräfta eller förkasta resultatet.

## Referenser

- Abdullahi, U.F., Igwenagu, E., Mu'azu, A., Aliyu, S. & Umar, M.I. (2016). Intrigues of biofilm: A perspective in veterinary medicine. *Veterinary World*, 9 (1), 12–18. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.12-18>
- Alsing-Johansson, T., Pedersen, A., Bergström, K., Sternberg-Lewerin, S., Penell, J. & Bergh, A. (2021). Bacterial contamination of equine dentistry equipment - effect of cleaning and disinfection. *Animals*, 11 (8), 2320. <https://doi.org/10.3390/ani11082320>
- Bahamondez-Canas, T.F., Heersema, L.A. & Smyth, H.D.C. (2019). Current status of in vitro models and assays for susceptibility testing for wound biofilm infections. *Biomedicines*, 7 (2), 34. <https://doi.org/10.3390/biomedicines7020034>
- Battersby, T., Walsh, D., Whyte, P. & Bolton, D.J. (2016). Campylobacter growth rates in four different matrices: broiler caecal material, live birds, Bolton broth, and brain heart infusion broth. *Infection Ecology & Epidemiology*, 6, 31217. <https://doi.org/10.3402/iee.v6.31217>
- Bergström, K., Nyman, G., Widgren, S., Johnston, C., Grönlund-Andersson, U. & Ransjö, U. (2012). Infection prevention and control interventions in the first outbreak of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections in an equine hospital in Sweden. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 54, 14. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-54-14>
- Boyce, J.M. (2016). Modern technologies for improving cleaning and disinfection of environmental surfaces in hospitals. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 5 (1), 10. <https://doi.org/10.1186/s13756-016-0111-x>
- Burfoot, D., Limburn, R. & Busby, R. (2017). Assessing the effects of incorporating bubbles into the water used for cleaning operations relevant to the food industry. *International Journal of Food Science & Technology*, 52 (8), 1894–1903. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13465>
- Ceri, H., Olson, M.E., Stremick, C., Read, R.R., Morck, D. & Buret, A. (1999). The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *Journal of Clinical Microbiology*, 37 (6), 1771–1776. <https://doi.org/10.1128/JCM.37.6.1771-1776.1999>
- Costerton, J.W., Stewart, P.S. & Greenberg, E.P. (1999). Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science*, 284 (5418), 1318–1322. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318>

- Craveiro, S., Alves-Barroco, C., Crespo, M.T.B., Barreto, A.S. & Semedo-Lemsaddek, T. (2015). Aeromonas biofilm on stainless steel: efficiency of commonly used disinfectants. *International Journal of Food Science & Technology*, 50 (4), 851–856. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12731>
- Dancer, S.J. (2011). Hospital cleaning in the 21st century. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 30 (12), 1473–1481. <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1250-x>
- Ferrari, S., Frosth, S., Svensson, L., Fernström, L.L., Skarin, H. & Hansson, I. (2019). Detection of Campylobacter spp. in water by dead-end ultrafiltration and application at farm level. *Journal of Applied Microbiology*, 127 (4), 1270–1279. doi: 10.1111/jam.14379.
- Flemming, H.-C. & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8 (9), 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
- French, G.L., Otter, J.A., Shannon, K.P., Adams, N.M.T., Watling, D. & Parks, M.J. (2004). Tackling contamination of the hospital environment by methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA): a comparison between conventional terminal cleaning and hydrogen peroxide vapour decontamination. *The Journal of Hospital Infection*, 57 (1), 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2004.03.006>
- Furukawa, S., Akiyoshi, Y., Komoriya, M., Ogihara, H. & Morinaga, Y. (2010). Removing Staphylococcus aureus and Escherichia coli biofilms on stainless steel by cleaning-in-place (CIP) cleaning agents. *Food Control*, 21 (5), 669–672. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.10.005>
- Graziano, M.U., Graziano, K.U., Pinto, F.M., Bruna, C.Q., de Souza, R.Q. & Lascala C.A. (2013). Effectiveness of disinfection with alcohol 70% (w/v) of contaminated surfaces not previously cleaned. *Revista Latino-Americana De Enfermagem*, 21(2), pp. 618–623. doi:10.1590/s0104-11692013000200020.
- Hancox, L.R., Le Bon, M., Dodd, C.E.R. & Mellits, K.H. (2013). Inclusion of detergent in a cleaning regime and effect on microbial load in livestock housing. *The Veterinary Record*, 173 (7), 167. <https://doi.org/10.1136/vr.101392>
- Hensel, N., Zabel, S. & Hensel, P. (2016). Prior antibacterial drug exposure in dogs with methicillin-resistant Staphylococcus pseudintermedius (MRSP) pyoderma. *Veterinary Dermatology*, 27 (2), 72-78e20. <https://doi.org/10.1111/vde.12292>
- Hunter, N.D., Hoet, A.E., van Balen, J. & Stull, J.W. (2021). Longitudinal environmental Staphylococcus contamination in a new small animal veterinary hospital and utility of cleaning checklists. *Zoonoses and Public Health*, 68 (8), 947–954. <https://doi.org/10.1111/zph.12887>
- Jones, W.L., Sutton, M.P., McKittrick, L. & Stewart, P.S. (2011). Chemical and antimicrobial treatments change the viscoelastic properties of bacterial biofilms. *Biofouling*, 27 (2), 207–215. <https://doi.org/10.1080/08927014.2011.554977>

- Jordbruksverket (2021) *Krav på veterinärer vid MRSA och MRSP*.  
<http://djur.jordbruksverket.se/amnesomraden/djurhalsopersonal/kravpaveterinarerommrsaochmrsp/skyldighetavse-endemrsaochmrsp.4.5bc6627d140113bd54724ab.html> [2021-10-12]
- Kanematsu, H. & Barry, D.M. (2020). *Formation and Control of Biofilm in Various Environments*. Singapore: Springer Singapore.  
<https://doi.org/10.1007/978-981-15-2240-6>
- Kasimanickam, R.K., Ranjan, A., Asokan, G., Kasimanickam, V.R. & Kastelic, J.P. (2013). Prevention and treatment of biofilms by hybrid- and nanotechnologies. *International Journal of Nanomedicine*, 8, 2809–2819.  
<https://doi.org/10.2147/IJN.S44100>
- Kjellman, E.E., Slettemeås, J.S., Small, H. & Sunde, M. (2015). Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) from healthy dogs in Norway – occurrence, genotypes and comparison to clinical MRSP. *MicrobiologyOpen*, 4 (6), 857–866. <https://doi.org/10.1002/mbo3.258>
- Kommissionens förordning (EG) nr 2073/2005 av den 15 november 2005 om mikrobiologiska kriterier för livsmedel. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/SV/TXT/?qid=1565264354690&uri=CELEX:32005R2073>
- Lederer, J.W., Jarvis, W.R., Thomas, L. & Ritter, J. (2014). Multicenter cohort study to assess the impact of a silver-alloy and hydrogel-coated urinary catheter on symptomatic catheter-associated urinary tract infections. *Journal of Wound, Ostomy, and Continence Nursing*, 41 (5), 473–480.  
<https://doi.org/10.1097/WON.0000000000000056>
- Meyer, B., Eschborn, S., Schmidt, M., Gabriel, H. & Brill, F.H.H. (2020). Advantage of pH-neutral peracetic acid over peracetic acid in reduction of viable count of biofilms. *Journal of Hospital Infection*, 104 (4), 603–604.  
<https://doi.org/10.1016/j.jhin.2019.12.015>
- Mitchell, B.G., Digney, W., Locket, P. & Dancer, S.J. (2014). Controlling methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a hospital and the role of hydrogen peroxide decontamination: an interrupted time series analysis. *BMJ Open*, 4 (4), e004522. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2013-004522>
- Naseri, K.G., Rahimi, S. & Khaki, P. (2012). Comparison of the effects of probiotic, organic acid and medicinal plant on campylobacter jejuni challenged broiler chickens. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 14 (7), 1485–1496.
- Nie, M., Silva, R.C.E., de Oliveira, K.T., Bagnato, V.S., de Souza Rastelli, A.N., Crielgaard, W., Yang, J. & Deng D.M. (2021) Synergetic antimicrobial effect of chlorin e6 and hydrogen peroxide on multi-species biofilms, *Biofouling*, 37 (6), 656–665, <https://doi.org/10.1080/08927014.2021.1954169>
- Olivares, E., Badel-Berchoux, S., Provot, C., Jaulhac, B., Prévost, G., Bernardi, T. & Jehl, F. (2016). The BioFilm Ring Test: a rapid method for routine analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation kinetics. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(3), pp. 657–661. doi:10.1128/JCM.02938-15.

- Osland, A.M., Vestby, L.K., Fanuelson, H., Slette-meås, J.S. & Sunde, M. (2012). Clonal diversity and biofilm-forming ability of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67 (4), 841–848. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr576>
- Osland, A.M., Vestby, L.K. & Nesse, L.L. (2020). The effect of disinfectants on quinolone resistant *E. coli* (QREC) in biofilm. *Microorganisms*, 8 (11), E1831. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111831>
- O'Toole, G.A. (2003). To build a biofilm. *Journal of Bacteriology*, 185 (9). <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/JB.185.9.2687-2689.2003> [2021-09-01]
- Overholt, B., Reynolds, K. & Wheeler, D. (2018). 1151. A safer, more effective method for cleaning and disinfecting GI endoscopic procedure rooms. *Open Forum Infectious Diseases*, 5 (Suppl 1), S346. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofy210.984>
- Pitts, B., Hamilton, M.A., Zelter, N. & Stewart, P.S. (2003). A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. *Journal of Microbiological Methods*, 54 (2), 269–276. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(03\)00034-4](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(03)00034-4)
- Rach, J.J., Gaikowski, M.P., Howe, G.E. & Schreier, T.M. (1998). Evaluation of the toxicity and efficacy of hydrogen peroxide treatments on eggs of warm- and coolwater fishes. *Aquaculture*, 165 (1), 11–25. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00248-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00248-8)
- Raval, Y.S., Flurin, L., Mohamed, A., Greenwood-Quaintance, K.E., Beyenal, H. & Patel, R. (2021). In vitro antibacterial activity of hydrogen peroxide and hypochlorous acid, including that generated by electrochemical scaffolds. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 65 (5), e01966-20. <https://doi.org/10.1128/AAC.01966-20>
- Rutala, W.A. Weber, D.J. & the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC) (2008). *Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities*. Centers for Disease Control and Prevention. Update 2019. Available: <https://www.cdc.gov/infectioncontrol/pdf/guidelines/disinfection-guidelines-H.pdf>
- Räisänen, K., Sarvikivi, E., Arifulla, D., Pietikäinen, R., Forsblom-Helander, B., Tarkka, E., Anttila, V.-J., Grönroos, J.O., Rintala, E., Kauranen, J., Ahlsved, M., Broas, M., Mikkola, J., Sieberns, J., Jalava, J. & Lyytikäinen, O. (2021). Three clusters of carbapenemase-producing *Citrobacter freundii* in Finland, 2016–20. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 76 (10), 2697–2701. <https://doi.org/10.1093/jac/dkab209>
- da Silva Fernandes, M., Kabuki, D.Y. & Kuaye, A.Y. (2015). Biofilms of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from the processing of ricotta and the control of these pathogens through cleaning and sanitization procedures. *International Journal of Food Microbiology*, 200, 97–103. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.02.004>

- Singh, A., Walker, M., Rousseau, J. & Weese, J.S. (2013). Characterization of the biofilm forming ability of *Staphylococcus pseudintermedius* from dogs. *BMC Veterinary Research*, 9, 93. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-93>
- SJVFS 2013:14. *Statens jordbruksverks föreskrifter och allmänna råd om förebyggande och särskilda åtgärder avseende hygien m.m. för att förhindra spridning av zoonoser och andra smittämnen*. Jönköping: Statens jordbruksverk. <https://lagen.nu/sjvfs/2013:14> [2021-10-16]
- SJVFS 2021:5. *Föreskrifter om ändring i Statens jordbruksverks föreskrifter och allmänna råd (SJVFS 2013:14) om förebyggande och särskilda åtgärder avseende hygien m.m. för att förhindra spridning av zoonoser och andra smittämnen*. Jönköping: Statens jordbruksverk. <https://lagen.nu/sjvfs/2021:5> [2021-10-16]
- SJVFS 2021:10. *Statens jordbruksverks föreskrifter och allmänna råd om biosäkerhetsåtgärder samt anmälan och övervakning av djursjukdomar och smittämnen*. Jönköping: Statens jordbruksverk. <https://lagen.nu/sjvfs/2021:10> [2021-10-16]
- Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Bonaventura, G.D., Djukić, S., Ćirković, I. & Ruzicka, F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*, 115 (8), 891–899. [https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm\\_630.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x)
- Sternberg Lewerin S. & Fernström, L. (2016). Biofilm hos salmonellaisolat från svenska djurbesättningar. *Svensk Veterinärtidning*, 11, 11-14. [2021-09-18]
- SVA (2020). *Campylobacterprogrammet hos kyckling i Sverige*. Statens veterinärmedicinska anstalt. <https://www.sva.se/produktionsdjur/fjaderfa/smittskydd-for-fjaderfa/kontrollprogram-hos-fjaderfa/campylobacterprogrammet-hos-kyckling-i-sverige/> [2021-10-26]
- Thomas, C., Schönknecht, A., Püning, C., Alter, T., Martin, A. & Bandick, N. (2020). Effect of peracetic acid solutions and lactic acid on microorganisms in on-line reprocessing systems for chicken slaughter plants. *Journal of Food Protection*, 83 (4), 615–620. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-19-350>
- Traverse, M. & Aceto, H. (2015). Environmental cleaning and disinfection. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 45 (2), 299–330. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2014.11.011>
- Vasudevan, R. (2014). Biofilms: Microbial cities of scientific significance. *Journal of Microbiology & Experimentation*, 1 (3). <https://doi.org/10.15406/jmen.2014.01.00014>
- VetBact (2020). *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)*. Veterinärmedicinsk bakteriologi: information om betydelsefulla arter. <https://www.vetbact.org/index.php?displayextinfo=102&vbsearchstring=MALDI-TOF%20MS> [2021-09-13]

- VetBact (2021). *Staphylococcus aureus subsp. aureus*. Veterinärmedicinsk bakteriologi: information om betydelsefulla arter. <http://www.vetbact.org/index.php?artid=20&vbsearchstring=Staphylococcus%20aureus> [2021-09-13]
- Viklund, M.T. (2019). *Quorum sensing och quorum quenching : bakteriers förmåga att kommunicera med varandra, och vägar att störa denna mekanism för att hämma infektion*. (Grundnivå, G2E) Sveriges lantbruksuniversitet. Veterinärprogrammet. <http://urn.kb.se/resolve?urn=urn:nbn:se:slu:epsilon-s-10416>
- Walia, K., Lynch, H., Grant, J., Duffy, G., Leonard, F.C., Lawlor, P.G. & Gardiner, G.E. (2017). The efficacy of disinfectant misting in the lairage of a pig abattoir to reduce *Salmonella* and *Enterobacteriaceae* on pigs prior to slaughter. *Food Control*, 75, 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.12.028>
- Walker, M., Singh, A. & Weese, J.S. (2017). Bacterial biofilms. *Clinicians Brief*. April 2017. <https://www.cliniciansbrief.com/article/bacterial-biofilms> [2021-08-25]
- Wieser, A., Schneider, L., Jung, J. & Schubert, S. (2012). MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics - identification of microorganisms and beyond (mini review). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93 (3), 965–974. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3783-4>
- Yang, S.M., Lee, D.W., Park, H.J., Kwak, M.H., Park, J.M. & Choi, M.-G. (2019). Hydrogen peroxide enhances the antibacterial effect of methylene blue-based photodynamic therapy on biofilm-forming bacteria. *Photochemistry and Photobiology*, 95 (3), 833–838. <https://doi.org/10.1111/php.13056>

# Tack

Tack till handledare och biträdande handledare som möjliggjorde detta arbete. Både i upplärning kring metoder och alla återkopplingar längs vägen. Ingrids fantastiskt positiva attityd och Maddes alla peptalks! Även tack till Marina, Moa och Liselott som fortsatte med den dynamiska studien när min tid rann ut.

Slutligen tack till min storebror som gav värdefull feedback inför presentationen, tack min särbo med sitt eviga tålamod under hela utbildningen och genom livet, och tack till Miroogle som alltid styr upp när jag inte vet vad jag håller på med.



## Populärvetenskaplig sammanfattning

Biofilm är ett skyddande slemlager som bakterier kan bilda när de känner sig hotade av till exempel miljön, läkemedel, rengöring- eller desinfektionsmedel. Biofilm produceras av bakterierna när bakterieantalet är stort nog, vilket de känner av genom att skicka ut små molekyler som gör att bakterierna kan ”prata med varandra”.

Vissa av bakterierna som bildar biofilm, eller som kan finnas i biofilm är bakterier som kan smitta både djur och människor och orsaka sjukdom som till exempel mag-sjuka orsakat av *Campylobacter*, vilket kan ske efter att en skärbräda används både till att skära rå kyckling och sedan till grönsaker som serveras utan att upphettats. Ett annat exempel är när ett djur eller en människa smittas under sitt sjukhusbesök av till exempel Stafylokocker såsom MRSA (framför allt människor) och MRSP (framför allt hundar) som gör att sår inte läker för att antibiotikan som läkaren/vereterinären skrivit ut inte längre fungerar då dessa bakterier har en förmåga att oskadliggöra läkemedlet för sin egen överlevnad.

För att minska dessa risker är hygien av stor vikt. Syftet med studien var att testa hur sex desinfektionsmedel fungerar på biofilm i förhoppning om att öka kunskapen om vad som bör väljas för att nå bäst resultat. För att undersöka detta användes en blandning av sex olika biofilmsproducerande bakterier. Till denna bakterieblandning tillsattes ytterligare stafylokocker (MRSA och MRSP) eller *Campylobacter jejuni*. Biofilmen producerades i buljong i 5–10 dagar i värmeskåp. Försöken gjordes både i en statisk modell där biofilmen fick mogna i separata plastbrunnar, och i en dynamisk modell där begagnade vattenledningsrör användes, som dessutom ”matades med mer buljong och bakterier” och daglig skakning för att kunna närma sig verkligheten där miljön är rörlig. Den statiska modellens biofilm analyserades med en maskin som mäter adhesion vilket är ett indirekt mått på hur hårt en substans är bunden till en yta, och därmed ger ett mått på biofilm. Den dynamiska modellen analyserades genom att mäta kontaminationsgrad med en ATP-mätare, vilken använder sig av en naturligt förekommande ljusreaktion kallad ATP-bioluminiscens för att detektera cellorganisk kontaminering innehållande ATP. ATP-mätare används ofta för att bedöma hur rena ytor är på till exempel slakterier. Det togs även prover från de olika försöken för att undersöka om stafylokocker och *Campylobacter* hade överlevt rengöring med de olika desinfektionsmedlen.

Resultat från studien tyder på att väteperoxid var mest effektivt för att avdöda olika bakterier. Samtidigt visar studien vikten av att desinfektionsmedlet anpassas till miljön och de bakterier man misstänker för att kunna ha optimal effekt. Studien visar även relevansen av mekanisk rengöring, som inte kan bytas ut genom att endast desinficera miljön. Konklusionen från denna studie är att använda väteperoxid i kombination med mekanisk rengöring för avlägsnande av biofilm. Men ytterligare studier som bland annat efterliknar verkligheten ännu mer och som kombineras med en statistisk analys av resultaten är nog nödvändig för att bekräfta detta.

## Bilaga: Pilotstudien

Det finns ingen standardiserad metod för att mäta och bedöma biofilm. En pilotstudie genomfördes därför under tre veckor för att utveckla en metod. De metoder som bedömdes tillförlitliga var en ATP-mätare (luminometer) som mäter mängden av energimolekylen ATP, samt Wallac Victor2 som mäter adhesion till en yta med hjälp av optisk densitet. Dessutom testades detektion av överlevande bakterier efter desinfektion genom anrikningsbuljong och odling på blodagar och/eller mCCDA agar. I pilotstudien gjordes också försök med skrapning av vattenledningar med odling via djupspridning på plate count agar för att beräkna totalt antal aeroba bakterier. Denna metod bedömdes som tids- och arbetskrävande samt hade tveksam tillförlitlighet varvid den inte användes i studien. Dessutom gjordes nedanstående observationer:

**Mikrotiterplattor:** Brunnarna i mikrotiterplattorna skulle inte fyllas mer än 260 mikroliter då större volym bidrar till en ökad risk för kontaminering av närliggande brunnar. I de första undersökningarna i pilotstudien noterades att det skedde en avdunstning i mikrotiterplattorna vid inkubering. För att minska effekten av avdunstning på grund av fläktar i inkubatorn, testades försegling V mikrotiterplattorna med självhäftande plast som racklades över plattorna och fästas med frystejp i kanterna, och ytterligare försegling med lock och en plastpåse, vilket hade önskvärd effekt. Dessutom noterades att ett par brunnar i den negativa kontrollen lättare blev kontaminerade när de placerades i rad H vilket medförde att rad D senare användes som negativ kontroll.

**Odlingsdagar:** Jämförande biofilmsodlingar skedde med inkubering under 3, 4 respektive 5 dagar för att bedöma hur länge biofilmen skulle växa i mikrotiterplattor i 30 °C. En högre optisk densitet uppmättes efter dag fem jämfört med dag tre och fyra.

**ATP-mätare:** Protokollat för ATP-mätaren föreslår att ytan som ska provtas bör vara ca 5x5 cm och torr (en fuktig yta kan medföra att mer material tas upp och ger således ett svårtolkat resultat). Ytan i vår studie var dock bara ca 2.5x2.5 cm då detta var storleken på av rörbitarna. ATP gjordes inte av mikrotiterbrunnarna på grund av att ytan bedömdes som för lite men däremot gjordes ATP-mätning av vattenledningsrören där ytan bedöms tillräcklig.

**Odling av bakterier:** I huvudstudien vortexades svabbarna efter provtagning för anrikning av *Campylobacter jejuni* då *C. jejuni* inte påvisats lika ofta som i proven som inte hade vortexats efter provtagning under pilotstudien.

**Desinfektionsmedel:** Endast väteperoxid testades under pilotstudien. Resultaten indikerade att den kan vara effektiv mot biofilm som växt i 5–10 dagar (statisk och dynamisk modell). ATP-mätning av vattenledningsrören gav ett medelvärde på 52,4 RLU som anses vara tillfredställande rengöring vad gäller kontaminationsgrad.

**Övrigt:** I pilotstudien undersöktes ytterligare en kombination av bakterier där 36 brunnar innehållande endast en blandning av olika campylobacterstammar utan blandflora. Resultatet visade på en generellt lägre optisk densitet än övriga bakteriekompositioner, vilket skulle kunna tyda på att *Campylobacter jejuni* har en sämre förmåga att producera biofilm ensamma, och behöver eventuellt utnyttja andra bakteriers förmåga att bilda biofilm för sin egen överlevnadsförmåga. Denna kombination utesluts dock efter pilotstudien och ersätts av rader med MRSA och MRSP för att göra studien mer multidisciplinär.

Försök gjordes även där rörbitarna skrapades av med sterila gummiskrapor som placerades i peptonvatten för spädningsserier, för vidare bakterieräkning. Viss tendens var högre värden CFU efter desinfektion varvid frågan uppkom huruvida desinfektionsmedlen lyckades rugga upp ytan för att blotta viabla bakterier djupare i biofilmen. Detta fick dock uteslutas då det blev för tidskrävande men skulle vara intressant i en framtida studie.

Bakteriemässigt kunde man se tendenser att *Enterococcus fecalis* var den bakterie som hade högst grad av överlevnad trots selektiv anriknings buljong. *Enterococcus* spp. är oftast resistent mot rengöringsmedel vilket även visats i en brasiliansk studie (da Silva Fernandes *et al.* 2015).

Redan under pilotstudien sågs en tendens att mekanisk rengöring är det främsta sättet att avlägsna biofilm, vilket bedöms med hjälp av den optiska densiteten i brunnar som svabbats med tops för provtagning jämfört med brunnar som endast tvättats med desinfektionsmedel.