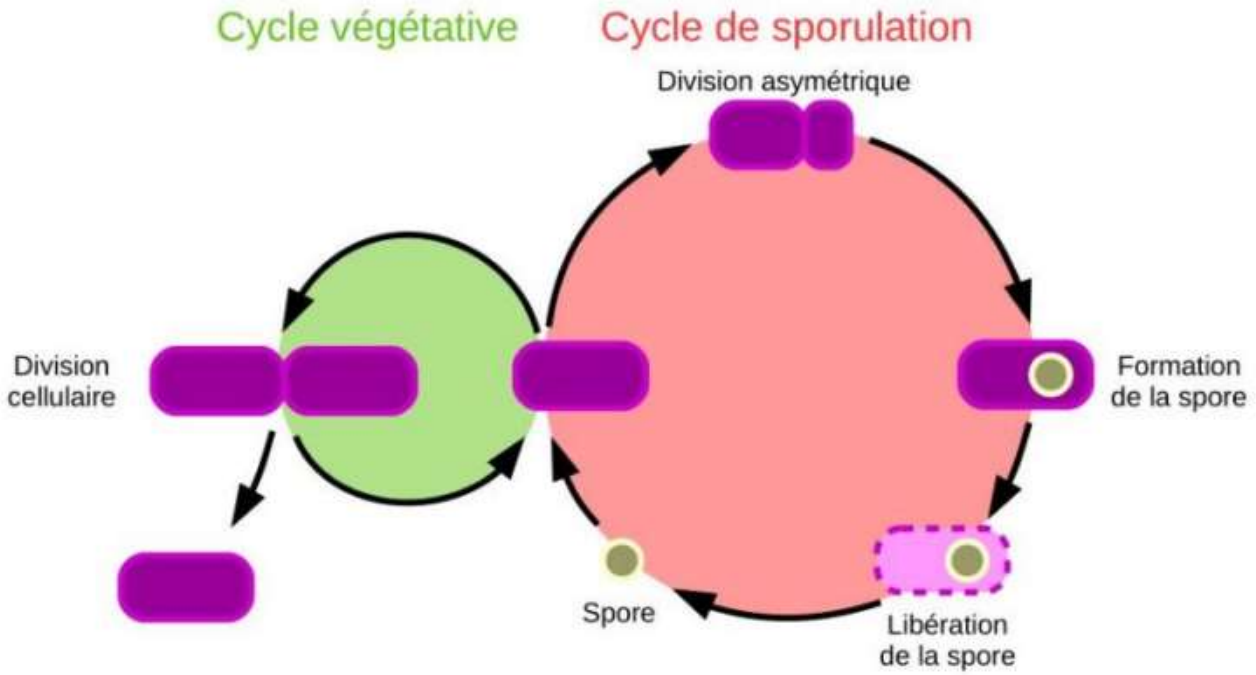
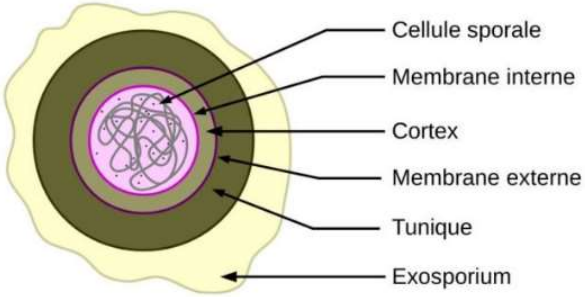
Comprendre les normes de sporicidie
Place de la javel

Laurence Badrikian
CHU Clermont-Ferrand

Les spores bactériennes

- Les spores bactériennes **ont une résistance remarquable aux produits physiques et chimiques**
- Elle ne se multiplient pas (en dormance) mais sont capables de régénérer des bactéries végétatives
- Elles **ont une longévité très grande**





L’activité sporicide des produits désinfectants

Tester l’activité sporicide d’un produit c’est remplir les conditions suivantes :

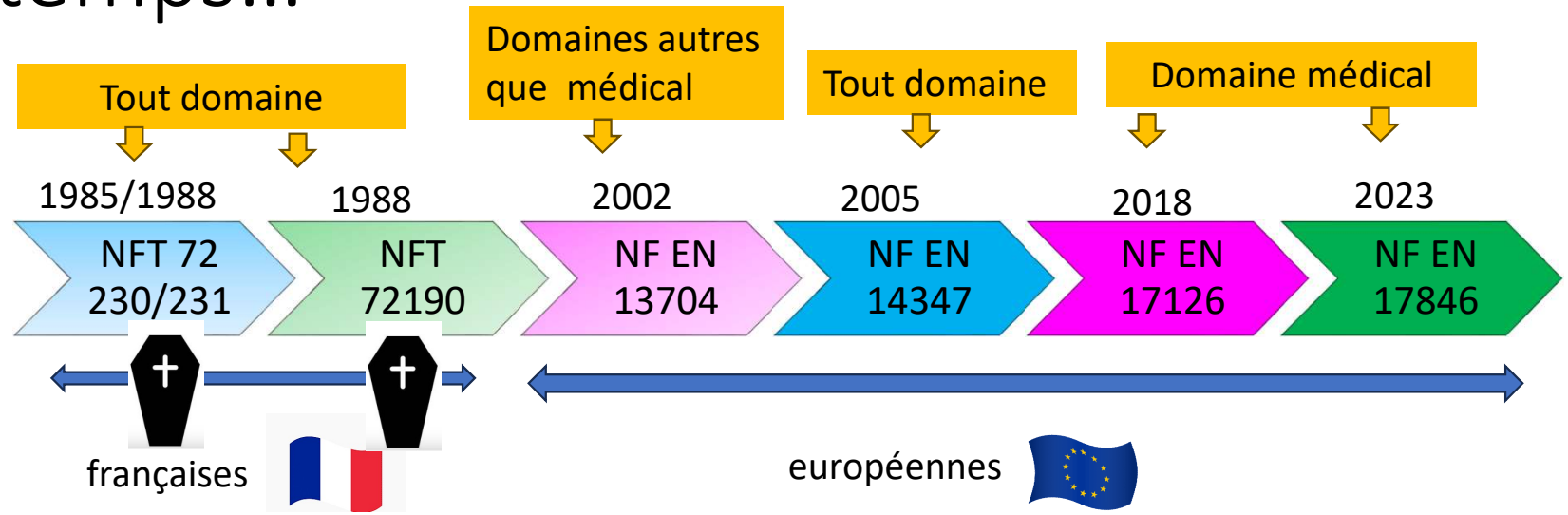
- Inoculum de spores (**pur** = **peu** <20% ou **pas** de bactéries végétatives)
- Après mise en contact avec le produit : **dénombrement de spores survivantes et mise en évidence d’une réduction**

Réduction ? : exprimée en log décimal

- Log (10) = 1 c'est-à-dire réduction d'un facteur 10 soit 90%
- Log (100) = 2 c'est-à-dire réduction de 10^2 soit 99 %
- Log (1000) = **3** c'est-à-dire réduction de $\mathbf{10^3}$ soit 99,9 %
- Log (10000) = **4** c'est-à-dire réduction de $\mathbf{10^4}$ soit 99,99 %
- Log (100 000) = **5** c'est-à-dire réduction de $\mathbf{10^5}$ soit 99,999 %
- Etc !

100% des germes n'existe pas dans les norm

Les différentes normes de sporicidie au cours du temps…



- Normes de base ? D'application? Domaines ?

Qu’est-ce qu’une norme de base ? (= Phase 1 pour les normes européennes)

- C’est une norme **commune à plusieurs domaines**

- **Qui ne tient pas compte des spécificités** rencontrées de chaque domaine

- Ce sont des essais dits de **suspension**

Norme	NFT 72230/231 (1985-1988)	NFT 72190 (1988)	NF EN 14347 (2005)	NF EN 13704 (2002, 2018)	NF EN 17126 (2018)	NF EN 17846 (2023)
Phase/ Etape	Norme de **base** ATS et DSF	Norme **d'application** DSF surfaces	**Phase 1 norme de base** ATS et DSF	**Phase 2, étape 1** DSF	**Phase 2 étape 1** DSF (surfaces, DM, textiles)	**Phase 2 étape 2** : surfaces
Domaine	Tout domaine	Tout domaine	Tout domaine	**Domaine non médical**	**Domaine médical**	**Domaine médical**
Spores	*Bacillus cereus* *Bacillus subtilis var. niger* *Clostridium sporogenes*	Bactéricidie fongicidie et **sporicidie (mêmes souches que NFT 72 230)**	*Bacillus cereus* *Bacillus subtilis subsp. Spizizenii*	***Bacillus subtilis*** Souches additionnelles : *Bacillus cereus, Clostridium sporogenes*	*Bacillus cereus* *Bacillus subtilis subsp. Spizizenii* *Clostridium difficile* R 027	*Clostridioides difficile*
Conditions	1 heure à 20°C Ou 5 minutes à 75 ° C	**Porte germes** **Ajout de lait** Temps à préciser Température 20° ou à préciser	20 °C 30 ou 60 min ou 120 min	**De propreté (2002) et saleté (2018)** Entre 1 min et 60 min Entre 4 et 75 ° C	**De propreté ou de saleté** Surfaces : 15 ou 60 min, entre 4 et 30° C DM : ≤ 60 min entre 20 ° et 70 ° C	Max 30 min pour surfaces fréquemment touchées
Objectif	Réduction de **5 lg soit de 10^5** fois	**3 lg** soit de 10^3 pour les spores	**4 lg** soit **10^4**	**3 lg** soit **10^3**	**4 lg** soit **10^4**	4 lg
Commentaire	Norme annulée	Norme annulée	**Norme insuffisante**	Note SF2H 2012	Sporicidie : les 2 Bacillus **ou** limitée à *Clostridium difficile*	

Phase 1 : NF EN 14347

N1
1 ml spores
$3x10^8$ à 10^9 UFC/ml

1 ml Eau

8 ml produit

Différentes concentrations sont testées

À 20 ° C, 30 min ou 60 min ou 120 min

0,1 ml du mélange d'essai «Na»

20 °C
30 min

Neutralisant et TSB

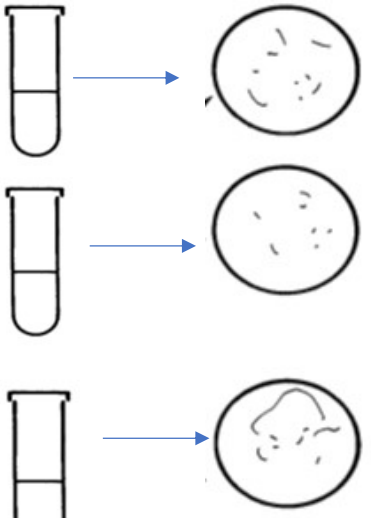
Dénombrement

Dilution 10^{-1}

Dilution 10^{-2}

Dilution 10^{-3}

Ensemencement et Incubation des boites **4 à 7 jours** à 36° C °/-1



Dénombrement Na

Témoin : eau : Nw

$$R = \frac{Nw}{Na} \text{ ou } R\,lg = lg\,Nw - lg\,Na$$

Réduction de 4 lg

Les normes de Phase 1 ou normes de base

- Permettent d'établir qu'un produit en cours de développement a une activité bactéricide, fongicide, levuricide ou sporicide,
- Sont indépendantes de tout domaine d'application spécifique

MAIS … **N'ont pas de conditions pratiques simulées (pas de substances interférentes ajoutées)**

Les essais de phase 1 ne peuvent être utilisés pour justifier une quelconque revendication d'un produit

Les normes d’application : Phase 2

Pour la sporicidie

Les normes de phase 2 européennes

Dépendent du domaine d'application

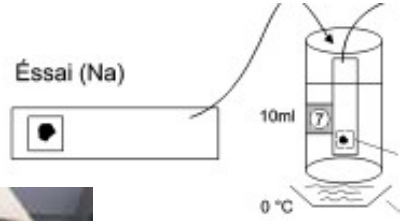
2 étapes :

- **Phase 2 étape 1** : conditions pratiques simulées correspondant à l'usage prévu

(= ajout de substances interférentes) : mais c'est toujours un test de suspension

- **Phase 2 étape 2** : lorsque le produit est appliqué sur une **surface** (ou sur la peau) **dans des conditions pratiques simulées :**
- **- par immersion ou par recouvrement d'un « porte-germes »**
- **- ou par essuyage d'une surface**

et avec ajout de substances interférentes



Substances interférentes dans le domaine de la médecine humaine ?

- Ce sont des **substances supplémentaires** simulant les conditions du niveau de souillures de l'essai
- **Deux niveaux de souillures sont utilisés dans les normes** :

1. conditions de propreté → 0,3 g/ L d'albumine bovine

Q : Recommandé pour ?

- conditions représentatives de surfaces qui ont fait l'objet d'un nettoyage satisfaisant
- et/ou présentant des niveaux faibles de résidus organiques et/ou inorganiques

2. conditions de saleté → 3 g/ L d'albumine bovine
3mL/L érythrocytes de mouton

- conditions représentatives de surfaces qui présentent, ou présentent éventuellement, des résidus organiques et/ou inorganiques

Q : Recommandé pour ?

Norme	NFT 72230/231 (1985-1988)	NFT 72190 (1988)	NF EN 14347 (2005)	NF EN 13704 (2002, 2018)	NF EN 17126 (2018)	NF EN 17846(2023)
Phase/ Etape	Norme de **base** ATS et DSF	Norme **d'application** DSF surfaces	**Phase 1 norme de base** ATS et DSF	**Phase 2, étape 1** DSF	**Phase 2 étape 1** DSF (surfaces, DM, textiles)	**Phase 2 étape 2** : surfaces
Domaine	Tout domaine	Tout domaine	Tout domaine	**Domaine non médical**	**Domaine médical**	**Domaine médical**
Spores	*Bacillus cereus* *Bacillus subtilis var. niger* *Clostridium sporogenes*	Bactéricidie fongicidie et **sporicidie (mêmes souches que NFT 72 230)**	*Bacillus cereus* *Bacillus subtilis subsp. Spizizenii*	***Bacillus subtilis*** Souches additionnelles **:** *Bacillus cereus, Clostridium sporogenes*	*Bacillus cereus* *Bacillus subtilis subsp. Spizizenii* *Clostridium difficile* R 027	*Clostridioides difficile*
Conditions	1 heure à 20°C Ou 5 minutes à 75 ° C	**Porte germes** **Ajout de lait** Temps à préciser Température 20° ou à préciser	20 °C 30 ou 60 min ou 120 min	**De propreté (2002) et propreté/saleté (2018)** Entre 1 min et 60 min/entre 4 et 75° C	**De propreté ou de saleté** Surfaces : 15 ou 60 min, entre 4 et 30° C DM : ≤ 60 min entre 20 ° et 70 ° C	Max **30 min** pour surfaces fréquemment touchées
Objectif	Réduction de **5 log 10 soit de 10^5** fois	**3 log** soit de **10^3** pour les spores	**4 log** soit 10^4	**3 log** soit **10^3**	**4 log** soit **10^4**	**4 log**
Commentaire	Norme annulée	Norme annulée	**Norme insuffisante**	Note SF2H 2012	Sporicidie : les 2 Bacillus, **ou** sporicidie *Clostridium difficile*	

Norme Phase 2 étape 1 pour la sporicidie : EN 17126

- Norme relativement récente : **décembre 2018**
- Essai de **suspension**

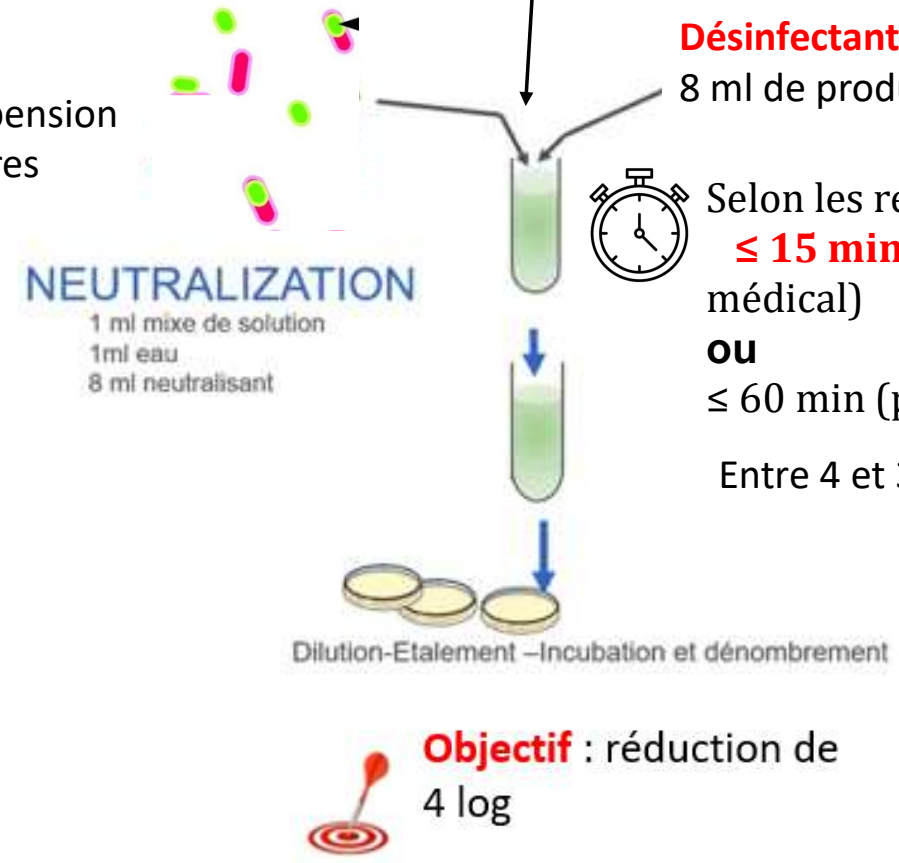
- **Domaine médical**
- Pour :
  - la désinfection des **instruments par immersion**,
  - la désinfection des **surfaces** par essuyage, pulvérisation
  - la désinfection des textiles
- **2 activités :**
  - Activité sporicide vis-à-vis de Clostridium difficile
  - Activité sporicide (*B. subtilis et B. cereus*)

NF EN 17126

1 ml
Substance interférente

1ml suspension spores

Désinfectant à tester
8 ml de produit



Selon les recommandations du fabricant mais :
≤ 15 min pour les **surfaces** en contact avec le patient ou le personnel médical)
ou
≤ 60 min (pour les autres **surfaces**)

Entre 4 et 30°

Instruments et textiles :
≤ 60 min
Entre 20 et 70° ou 80°

Incubation 5 jours pour *Clostridium* et 48 heures pour *Bacillus*

Objectif : réduction de 4 log

…Jusqu'en 2018..la norme 17126 n'existait pas !

- Il n'y avait que la norme de base **EN 13704** = Norme pour les domaines agroalimentaire, domestique, collectivités, industriel

- En 2012 : avis SF2H : **NON !** car une seule souche obligatoire (*Bacillus subtilis*) et diminution de **3 log**

- Or certains fabricants de produit « avaient aménagé » cette norme et revendiquaient une activité sporicide, avec réduction de 4 ou 5 log , en conditions d'utilisation (saleté pour les surfaces, propreté pour les DM)et avec des temps courts

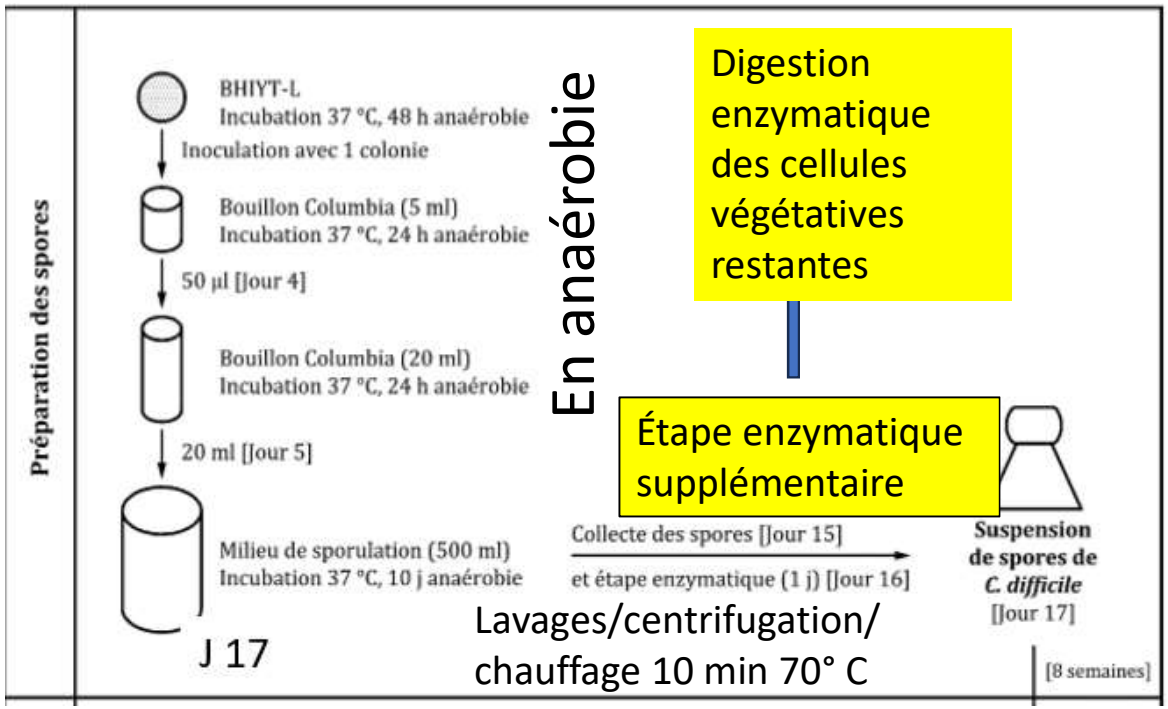
- Quand la norme EN 17126 est sortie, **ces mêmes produits** n'étaient plus sporicides aux mêmes concentrations et/ ou aux mêmes temps . Pourquoi ?

Préparation des spores de *Clostridium* différente

EN 13704

- On prend 10^6 spores et on ensemence un milieu (48 h) 10^7/ml
- 8 à 10 jours d'incubation dans une fiole avec gélose **en anaérobie** 37 ° c
- Lavage /centrifugation dans l'eau
- **Chauffage 10 min à 75° C**
- Incuber les boites 48 h

EN 17126



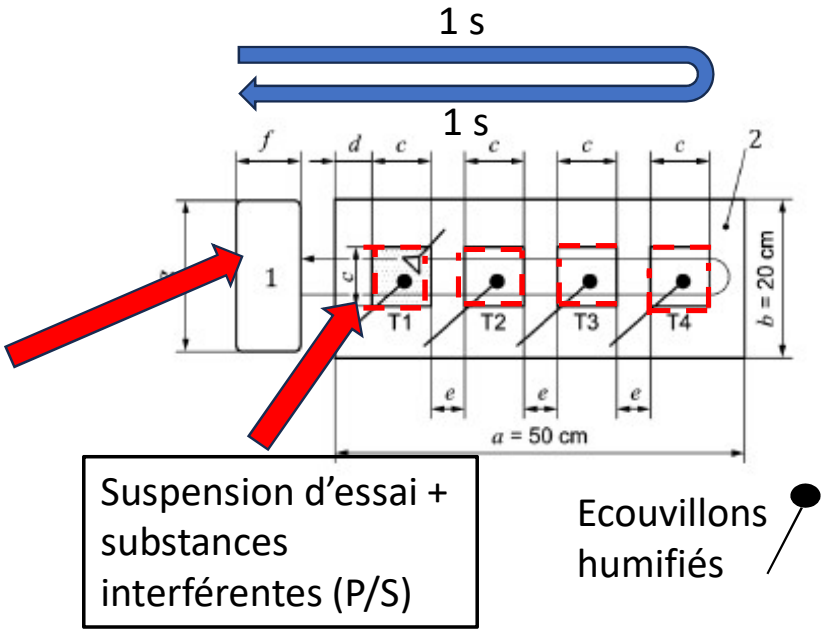
Puis 8 semaines au réfrigérateur : spores matures

Norme Phase 2 étape 2 sporicidie sur *Clostridioides difficile* novembre 2023

EN 17846 : test de surface, action mécanique avec lingettes

- Bloc de granit avec lingette dessous

- lingettes préimprégnées PAL, ou lingette + ajout de produit (16ml)



Suspension d'essai + substances interférentes (P/S)

Ecouvillons humifiés

Surface d'essai : PVC

4 carrés 5cms x 5cms

Réduction sur la **zone 1** de **10^4**

Moins de 50 UFC sur zones 2,3,4

Témoin eau en //

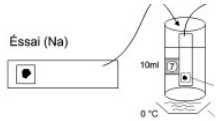
Pourquoi un test de Phase 2 étape 2 est important pour juger l'activité en pratique ?

- **Le test par essuyage** = **avec action mécanique,** est important pour la désinfection de surfaces **d'autant que la suspension est en contact avec la lingette pendant un temps très court (dit temps de passage)**

… Après, il s'agit d'un temps d'action « d'attente » et le liquide sèche

Existe pour les spores : EN 17846

- **Le test par immersion** convient pour les instruments : temps d'immersion = temps d'action



- **Les tests sans action mécanique pour les désinfectants de surface** : les ensemencements sont entièrement recouverts par le produit

N'existent pas pour les spores

EN 14885 juillet 2022

- **Norme d'un autre domaine** ? : oui si n'existe pas dans le domaine et les conditions d'essai peuvent être modifiées pour correspondre au domaine d'application spécifique. **Mais ce n'est plus valable actuellement pour EN 13704 !**

- **Les essais de phase 2, étape 1 et de phase 2, étape 2 doivent être réalisés pour toutes les revendications si des normes existent.**

Si révision de norme : *délai de 18 mois pour se mettre en conformité si modification technique*

- De la même façon : « *il convient que les modifications de l'EN 14885 et l'EN 12353 soient adoptées le plus tôt possible, mais jamais plus de 18 mois après publication ».*

4.3.2.6 Désinfection des surfaces sans action mécanique

Normes européennes obligatoires	
Activité bactéricide	EN 13727 (2/1)
Activité levuricide	EN 13624 (2/1)
Activité bactéricide/levuricide	EN 17387 (2/2)
Normes européennes additionnelles	
Activité fongicide	EN 13624 (2/1), EN 17387 (2/2)
Activité tuberculocide/mycobactéricide	EN 14348 (2/1)
Activité virucide contre les virus enveloppés / Activité virucide à spectre limité / Activité virucide	EN 14476 (2/1), EN 16777 (2/2)
Activité sporicide contre *C. diff.* / Activité sporicide	EN 17126 (2/1)

4.3.2.7 Désinfection des surfaces avec action mécanique

Normes européennes obligatoires	
Activité bactéricide	EN 13727 (2/1), EN 16615 (2/2)
Activité levuricide	EN 13624 (2/1), EN 16615 (2/2)
Normes européennes additionnelles	
Activité fongicide	EN 13624 (2/1)
Activité tuberculocide/mycobactéricide	EN 14348 (2/1)
Activité virucide contre les virus enveloppés / Activité virucide à spectre limité / Activité virucide	EN 14476 (2/1)
Activité sporicide contre *C. diff.* / Activité sporicide	EN 17126 (2/1)

4.3.2.5 Désinfection des instruments

Normes européennes obligatoires	
Activité bactéricide	EN 13727 (2/1), EN 14561 (2/
Activité levuricide	EN 13624 (2/1), EN 14562 (2/
Normes européennes additionnelles	
Activité fongicide	EN 13624 (2/1), EN 14562 (2/
Activité tuberculocide/mycobactéricide	EN 14348 (2/1), EN 14563 (2/
Activité virucide contre les virus enveloppés / Activité virucide	EN 14476 (2/1), EN 17111 (2/
Activité sporicide contre *C. diff.* / Activité sporicide	EN 17126 (2/1)

EN 14885 2022 : toujours en vigueur.

La norme EN 14846 n'y figure pas !

Que dit le guide de l'ECHA/biocides ?

- **Pour le groupe 1 désinfectants TP 1,2,3,4,5** l'activité est au moins une activité "cide" démontrée dans un test de suspension et contre un ou plusieurs microorganismes pour l'activité revendiquée (e.g. bactericide, levuricide), **de préférence selon les normes CEN (tests phase 1 et tests phase 2 étape 1)**. Les micro organismes d'essais doivent être ceux spécifiés dans la norme. Les essais de Phase 1 sont suffisants pour la substance active **si les essais de Phase 2 étape 1 sont disponibles pour le produit.**

L'utilisation des méthodes d'essai CEN est fortement recommandée

TP 2

Product type / micro-organism	Requirements[1]	Test required[2]	Contact time[3]	Temp (°C)[4]	Soiling conditions[5]	Required lg reduction
PT 2 Hard surface disinfection and other uses where EN tests are applicable, use in healthcare[16]						
bacteria	Basic requirement - 2,1 test	EN 13727 / EN 1276[7]	5 min/ 60 min	20	clean / dirty	5
bacteria	Basic requirement - 2,2 test	EN 17387 / EN 13697[7] / EN 16615[19]	5 min/ 60 min	20	clean / dirty	5/4/5
yeasts	Basic requirement - 2,1 test	EN 13624 / EN 1650[7]	5 min/ 60 min	20	clean / dirty	4
yeasts	Basic requirement - 2,2 test	EN 17387 / EN 13697[7] / EN 16615[19]	5 min / 60 min	20	clean / dirty	4/3/4
fungal spores	If claimed - 2,1 test	EN 13624 / EN 1650[7]	15 min/ 60 min	20	clean / dirty	4
fungal spores	If claimed - 2,2 test	EN 17387 / EN 13697[7]	15 min/ 60 min	20	clean / dirty	4/3
mycobacteria/tuberculosis bacteria	If claimed - 2,1 test	EN 14348	15 min/ 60 min	20	clean / dirty	4
bacterial spores	If claimed – 2,1 test	EN 17126 / EN 13704[7]	15 min/ 60 min	20	clean / dirty	4/3
viruses[10]	If claimed - 2,1 test	EN 14476	15 min/ 60 min	20	clean / dirty	4
viruses[10]	If claimed – 2,2 test	EN 16777	15 min/ 60 min	20	clean / dirty	4

7 The first test is for medical applications and the second for non-medical applications.

PT 2 (Instrument) disinfection by immersion or filling, other use areas						
bacteria	Basic requirement - 2,1 test	EN 13727 / EN 1276	as claimed	as claimed	clean / dirty	5
bacteria	Basic requirement - 2,2 test	EN 14561 adapted / EN 13697	as claimed	as claimed	clean / dirty	4¤
yeasts	If claimed - 2,1 test	EN 13624 / EN 1650	as claimed	as claimed	clean / dirty	4
yeasts	If claimed - 2,2 test	EN 14562 adapted / EN 13697	as claimed	as claimed	clean / dirty	3
fungal spores	If claimed - 2,1 test	EN 13624 / EN 1650	as claimed	as claimed	clean / dirty	4
fungal spores	If claimed - 2,2 test	EN 14562 adapted / EN 13697	as claimed	as claimed	clean / dirty	3
bacterial spores	If claimed – 2,1 test	EN 17126 / EN 13704	as claimed	as claimed	clean / dirty	4
mycobacteria/tuberculosis bacteria	If claimed - 2,1 test	EN 14348	as claimed	as claimed	clean / dirty	4
mycobacteria/tuberculosis bacteria	If claimed - 2,2 test	EN 14563	as claimed	as claimed	clean / dirty	4
viruses	If claimed - 2,1 test	EN 14476	as claimed	as claimed	clean / dirty	4
viruses	If claimed – 2,2 test	EN 17111	as claimed	as claimed	clean / dirty	4

Javel et sporicidie

Eau de javel

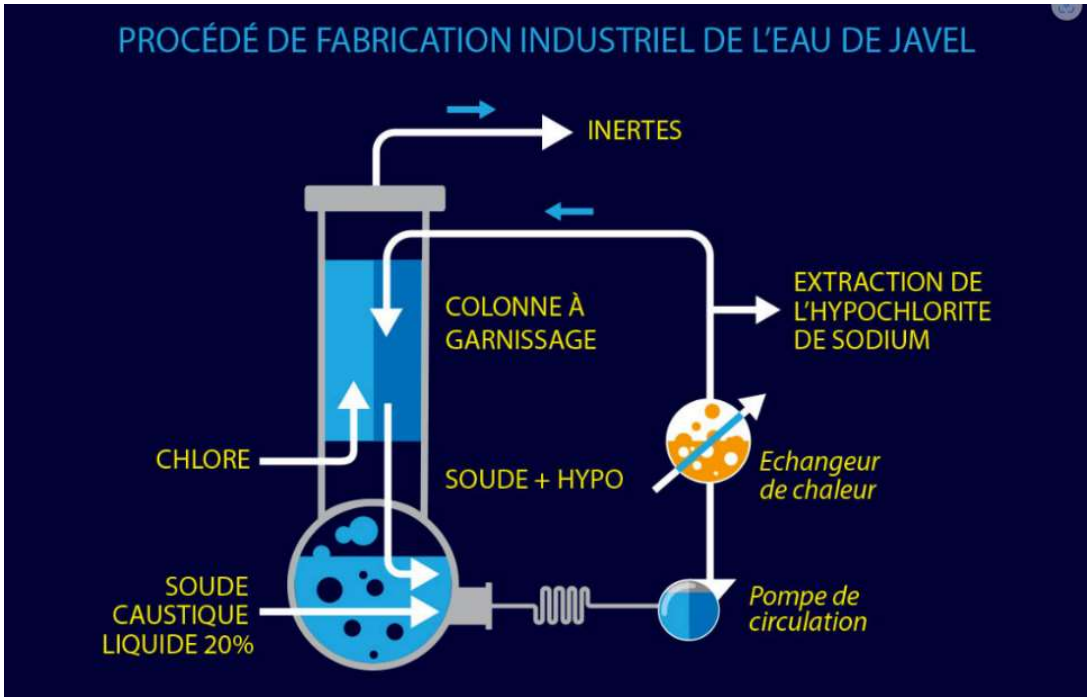
- 13 % : fabrication industrielle
- 9,6% : concentré
- 2,6%

- **TP2**, TP3 (vétérinaire), **TP4**, TP 5 (eau) …

- https://biocid-anses.fr/biocid#

Comprendre l'action de l'eau de javel (hypochlorite de sodium) : NaOCl

- Fabrication industrielle : barbotage de chlore (gaz) sur soude caustique



$$Cl_2 + 2\,NaOH \longrightarrow NaOCl + NaCl + H_2O$$

- 13 à 15% de chlore actif (ex : 48°)
- **Chlore actif ?** = pouvoir oxydant : 2 formes chimiques :

- ion **hypochlorite** ClO-

- **acide hypochloreux** : OHCl (100x+actif)

Rôle du pH sur ces ces équilibres

$$NaOCl + H_2O \rightleftharpoons NaOH + OHCl$$

$$HOCl \rightleftharpoons H^+ + ClO^-$$

Action de l'eau de javel sur les spores (Young and Setlow 2003).

- Oxydation des acides gras et des protéines
- Endommage la membrane interne
- Lésion des parois sporales, puis l'enveloppe se sépare du cortex : lyse sporale
- Inhibe le processus de germination (détruit récepteurs germinatifs et enzymes lytiques du cortex)

L'eau de javel et les normes de sporicidie…

- Sur beaucoup de documents (fournisseurs ou ex CSNEJ) : on retrouve seulement : **EN 13704… et « se référer à la CSNEJ »**
- …en conditions de propreté, 10^3 de réduction et sur *Bacillus subtilis*

Q ?

EST-CE SUFFISANT POUR JUGER EFFICACITE ?

ACTIVITÉ SPORICIDE				
EN 13704	(avril 2002)	60 minutes 15 minutes 20°C	0,039 % 1,04 %	15 ml / litre 400 ml / litre

Chambre Syndicale Nationale de l'Eau de Javel

ACTIVITÉ SPORICIDE			
NF T 72-231	5 minutes 75°C	0,018 %	7 ml / litre
(août 1988)			

2 fois la concentration préconisée pour le *Clostridium difficile*….

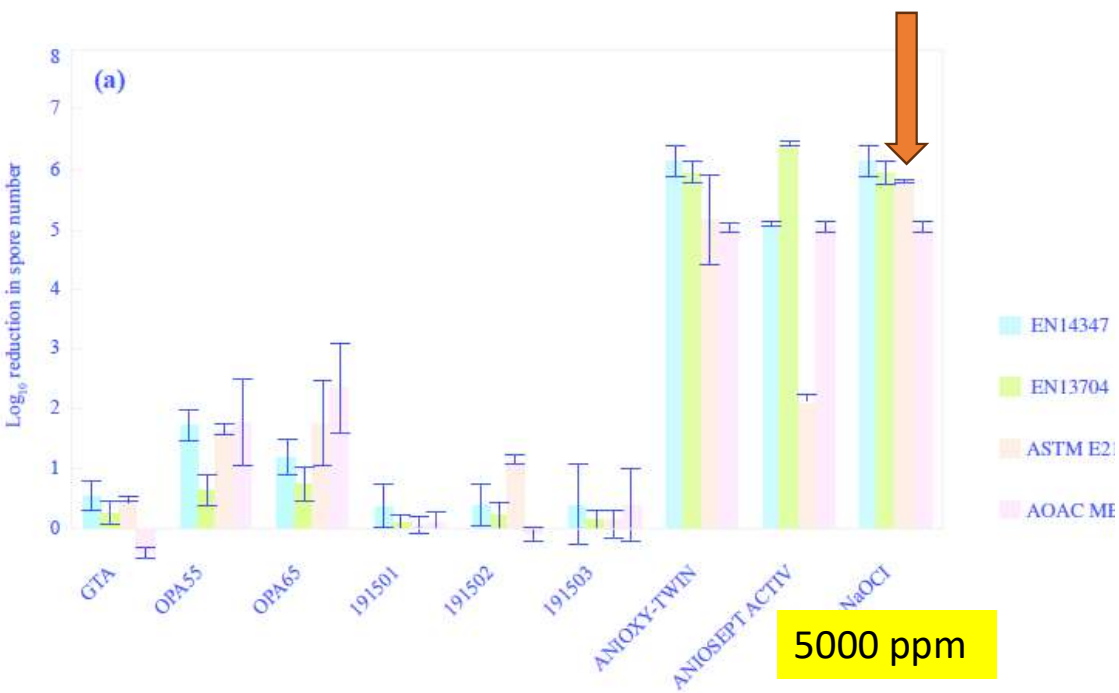
Javel et *Clostridium* ?

- CTIN 2006,
- INVS 2006,
- Note DHOS/DGS/335 du 1er septembre 2006
- SF2H avis javel 2006

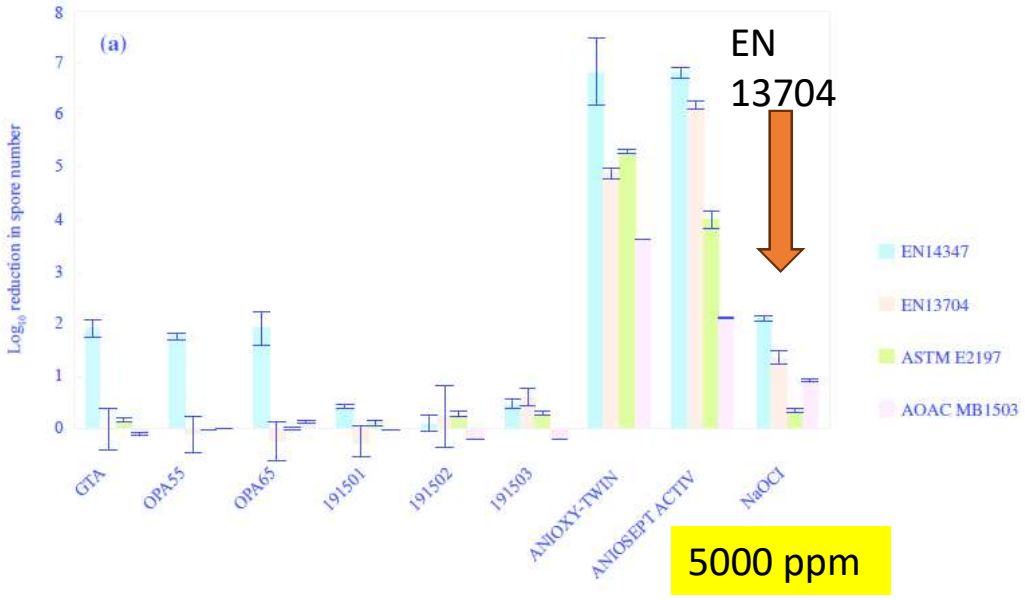
Après nettoyage et rinçage : javel 2,6 % ca diluée au **1/5ème : 0,5% de c.a = 5000 ppm 10 minutes**

- Quelques études comparatives
- Etude avec EN 17126 mais sur formes différentes de produits chlorés ≠javel

Clostridium difficile plus sensible à la javel que *Bacillus subtilis*



5 minutes sur ***Clostridium difficile*** *:*
réduction ***5 log***



5 minutes sur ***Bacillus subtilis :***
Réduction 1 log !
(Pour avoir réduction de 4 log : 60 min)

R. Wesgate et al. / Journal of Hospital Infection 93 (2016) 256-

Etude canadienne

Perez et al. : Activity of selected oxidizing microbicides against the spores of Clostridium difficile: Relevance to environmental control - American Journal of Infection Control Volume 33, Issue 6 p320-325August 2005

- Méthode porte germes (acier) et substances interférentes **différentes** (Sérum albumine et mucine bovine, tryptone)

- **Objectif de réduction** : **10^6**
  - 3000 ppm : 15 min
  - **5000 ppm : 10 min**
  - 1000 ppm : 15 à 25 min

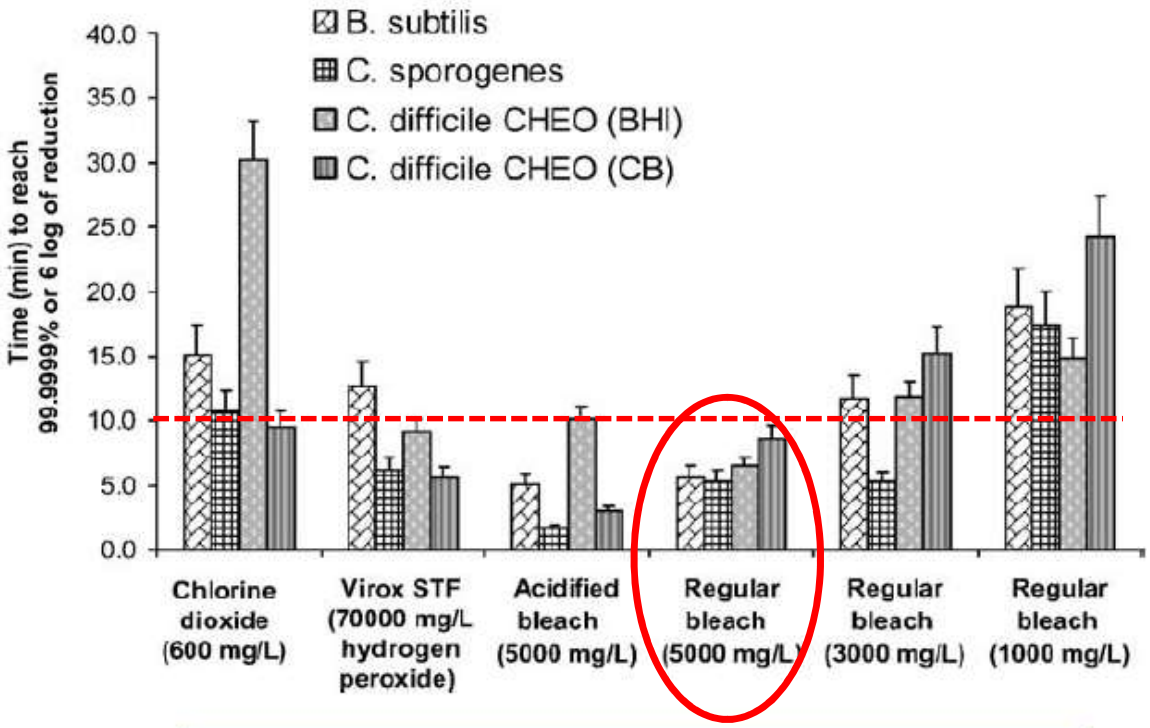
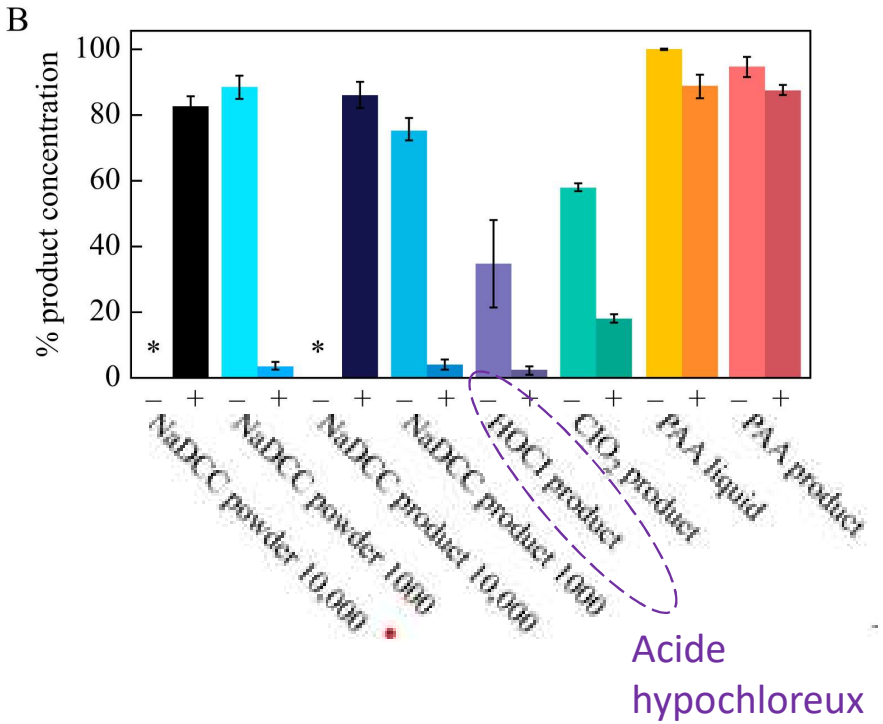


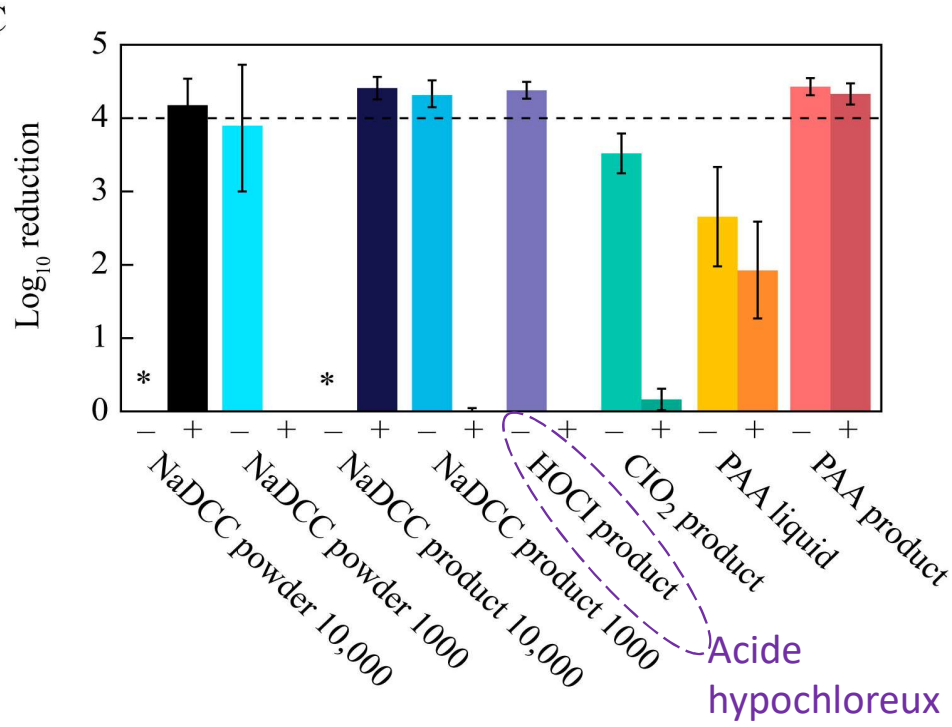
Fig 1. Times required for the microbicides to inactivate ≥6 $\log_{10}$ (99.9999%) of the spores tested.

EN 17126 sur dérivés chlorés : effet des souillures

Dégradation des dérivés chlorés lorsqu'il y a des souillures (conditions de propreté (-) ou saleté (+) après 5 minutes de contact



Efficacité selon EN 17126 sur *Clostridium difficile* dans les conditions de propreté (-) ou de saleté (+) après 5 min de contact



Brown Marshall Assessing the stability and sporicidal efficacy of oxidizing disinfectants. J Hosp infect 2024 Jul:149:22-

Problèmes utilisation /javel

- **L'eau de javel agit sur des surfaces nettoyées** : si matières azotées (protéines) le chlore actif est consommé –chloration des fonctions amines = formation de chloramines
- **Risque de toxicité si associée** avec acides ou ammoniaque
- **Problème de stabilité** (concentré)
- **Action du pH et de la température**
- Ecotoxicité ? (sous produits de dégradation)
- Corrosif métaux
- … Par contre, produit peu onéreux

En conclusion

- J'ai besoin d'un produit sporicide pour ?
  - Surfaces et DM non critiques ? Pour quel problème : *Clostridioides difficile* ou *Bacillus* ?
  - DM critiques non stérilisables : 17126 sporicide (*Bacillus cereus et subtilis*)

- Javel ?
  - pas pour les DM
  - difficile à manipuler, après nettoyage etc.
  - n'a pas de norme du domaine médical,
  - conditions EN 13704 ?

- Se méfier des Détergents Désinfectants chlorés sporicides ?
  (préférer deux applications)

- Norme **EN 17126** : à exiger et dans le futur : **EN 17846**

Merci beaucoup pour votre attention