

X 512  
1985-1



**ACTA HYGIENICA  
EPIDEMIOLOGICA  
ET MICROBIOLOGICA**

X512 / 1985-1  
1067/84  
62/7 1985

**PŘÍLOHA 1/85**

X 512 1985-1

P ř í l o h a č. 1/1985  
k Acta hygienica, epidemiologica et microbiologica

Standardní metody pro hodnocení dezinfekční účinnosti

chemických látek

Prah

Listopad 1984

Předsedkyně redakční rady : MUDr. V. Strážová, CSc.

Členové: MUDr. V. Bencko, DrSc., MUDr. D. Bittnerová, CSc.,  
PhDr. B. Daňourková, RNDr. K. Gečová, Ing. K. Hanicová,  
MUDr. J. Havlíček, CSc., MUDr. V. Janečková, CSc.,  
MUDr. V. Klener, CSc., Ing. J. Kodl, MUDr. L. Komárek, CSc.,  
MUDr. J. Malík, MUDr. J. Míka, PhDr. E. Rattayová,  
RNDr. F. Rettich, CSc., Doc. MUDr. D. Rolný, CSc.,  
Doc. MUDr. L. Rosival, DrSc., MUDr. V. Schwanzer, CSc.,  
Doc. MUDr. B. Ticháček, DrSc., D. Voleská

Vydává Institut hygieny a epidemiologie v Praze ve spolupráci  
s Výskumným ústavom preventívneho lekárstva v Bratislavě

(JEN PRO VNITŘNÍ POTŘEBU)

ÚVTEI 73 027

84-18713

1.	Úvod .....	1
2.	Faktory ovlivňující dezinfekční proces .....	2
2.1.	Koncentrační koeficient .....	2
2.2.	Teplovní koeficient .....	2
2.3.	Bílkovinný koeficient .....	3
2.4.	Zkoušené látky .....	4
2.4.1.	Ředidla .....	4
2.4.2.	Způsob ředění .....	4
2.5.	Neutralizátory .....	4
2.6.	Exposice .....	6
2.7.	Kultivační půdy .....	6
3.	Interpretace výsledků .....	7
3.1.	Kvalitativní metody .....	7
3.2.	Kvantitativní metody .....	8
4.	Laboratorní metody .....	8
4.1.	Testovací mikroorganismy .....	8
4.1.1.	Přehled kmenů .....	8
4.1.2.	Konservace kmenů .....	11
4.1.3.	Příprava suspense vegetativních forem mikrobů .....	11
4.1.4.	Příprava suspense bakteriálních spor .....	12
4.1.5.	Stanovení počtu zárodků v suspensi .....	12
4.2.	Kvalitativní suspensní metoda .....	14
4.2.1.	Standardní suspensní metoda .....	14
4.2.2.	Modifikovaná suspensní metoda pro terénní kontrolu dezinfekčních roztoků .....	15
4.3.	Kvantitativní suspensní metoda .....	15
4.4.	Metoda stanovení bakteriostatického působení chemických látek .....	16
4.5.	Metoda stanovení baktericidního účinku chemických látek na mikroby zaschlé na nosičích z různých materiálů .....	17
4.5.1.	Výběr nosičů .....	17
4.5.2.	Výběr testovacích organismů a příprava mikrobiální suspense .....	18
4.5.3.	Metoda se skleněnými perličkami .....	18
4.5.4.	Metoda s nosiči z různých materiálů .....	19

4.5.5.	Metoda hodnocení pracích prostředků .....	20
5.	Tabulky, příklady protokolů a výpočtů	
6.	Literatura .....	25



## 1. Úvod.

Standardní metody pro testování dezinfekčních prostředků jsou určeny k stanovení baktericidních a bakteriostatických vlastností těchto látek v laboratorních podmínkách. Jsou určeny těm pracovištím hygienické služby i výzkumným laboratorům jiných institucí a výrobních podniků, které se zabývají hodnocením dezinfekční účinnosti chemických látek. Uvedené metody jsou metodami volby, umožňují zpracování dané problematiky z různých hledisek a podle možností uživatele.

Jednotlivé metody jsou určeny jednak pro hodnocení dezinfekční účinnosti přípravků používaných ve zdravotnických zařízeních ve formě pracovních i originálních roztoků a substancí, jednak pro hodnocení účinnosti nových výrobků, event. experimentálních vzorků dodávaných výrobními podniky.

Laboratoře hygienické služby potřebují pro rutinní kontrolu kvality dezinfekčních roztoků používaných ve zdravotnických zařízeních jednoduchou metodu. Tomu požadavku vyhovuje modifikovaná kvalitativní suspensní metoda ve zjednodušeném provedení, která dovoluje redukovat výběr testovacích mikrobů i počet koncentrací a exposic na množství únosné pro práci v terénu (4.2.2.). Základní požadavky na standardní přípravu mikrobiální suspence, kultivaci i živné půdy zůstávají nezměněny.

Zvláštní postupy pro hodnocení dezinfekční účinnosti látek existují v mnoha zemích v různém rozsahu. Často jsou různě specifikované, na př. určené jen pro některé typy přípravků nebo některé způsoby použití. Velmi podrobně jsou zpracovány na př. metody Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) které jsou vždy po několika letech novelizovány v souladu s výsledky výzkumu.

Centrální vědecko-výzkumný ústav dezinfekce a sterilizace (VNIIDIS) v Moskvě připravuje ve spolupráci s ostatními státy RVHP soubor metodik, který obsáhne danou problematiku zcela vyčerpávajícím způsobem. Kromě jednoduchých screeningových metod hodnocení dezinfekční účinnosti bude obsahovat také toxikologická kritéria pro zavádění přípravků a testy pro všechny způsoby použití v praxi. Metodiky budou v jádru vycházet z postupů používaných v SSSR a budou doplněny vhodnými metodami jednotlivých zemí RVHP. Jejich používání bude závazné pro získávání údajů o nových dezinfekčních přípravcích, u kterých bude předpoklad pro společné používání v zemích RVHP. Zveřejnění tohoto souboru metodik se předpokládá po r. 1985, pak bude aplikován pro naše podmínky. Do té doby je možno používat zde předložené standardní metody. Při jejich sestavení jsme vycházeli z metod používaných v laboratoři dezinfekce v IHE, které jsme zpracovali a modifikovali na základě metod DGHM a připomínek, které vplynuly z opakovaných recenzí provedených předními odborníky CSR v tomto oboru. Předpokládáme, že se nebudou podstatně lišit od konečného znění metod RVHP. Soubor metodik zpracovala RNDr. Jana Kneiflová, CSc.

## 2. Faktory ovlivňující dezinfekční proces.

Dezinfekční proces ovlivňuje řada fyzikálních a chemických faktorů: teplota, vlhkost, koncentrace dezinfekční látky a doba jejího působení, prostředí, ve kterém dezinfekce probíhá, hustota mikrobů, antimikrobní spektrum přípravků.

Vliv těchto faktorů na průběh dezinfekce je charakterizován t.zv. koeficienty. Nejčastěji jsou používány koncentrační, teplotní a bílkovinný koeficient.

Tyto koeficienty je třeba stanovit zejména u nových přípravků, protože jejich znalost je pro praktické hodnocení dezinfekčních vlastností velmi významná. K jejich stanovení se používá suspensní metoda (4.2.).

2.1. Koncentrační koeficient (n) vyjadřuje závislost účinnosti látky na její koncentraci a udává změny rychlosti účinku dezinfekční látky v souvislosti se změnou koncentrace. Je-li koncentrační koeficient vysoký, mohou mít i malé změny v koncentraci za následek velké výkyvy v účinnosti látek. Poměr mezi koncentrací a časem potřebným k dezinfekci se vyjadřuje logaritmicky:

$$n_1 = \frac{\log t_2 - \log t_1}{\log C_1 - \log C_2} \qquad n_2 = \frac{\log t_3 - \log t_2}{\log C_2 - \log C_3}$$

atd. pro každou dvojici koncentrací v serií pokusů. Z výsledků se stanoví průměrná hodnota n. Vztah mezi koncentrací a expoziční dobou je pak dán obecně vztahem

$$\text{konst.} = C^n \cdot t$$

(příklad:  $n=1$ , zdvojnásobením koncentrace se účinek látky zvýší 2x ( $C^1 = 2^1$ ) a expozici je možno snížit na polovinu.

2.2. Teplotní koeficient: Základním faktorem ovlivňujícím průběh hynutí mikrobů je teplota. Zvyšováním teploty se urychlují chemické reakce, které ovlivňují dynamiku dezinfekce. Urychlení dezinfekčního procesu se stoupající teplotou kolísá podle druhu dezinfekčního prostředku i podle použitého mikroorganismu. Některé látky, které jsou neúčinné při normální teplotě, mohou mít za zvýšené teploty letální účinky (na př. některé detergenty). Maximální zvýšení teploty dezinfekčního roztoku je dáno hodnotou, při které se použitý přípravek rozkládá. Na př. jodofory se rozkládají při teplotě nad 35°C, u chlorových preparátů dochází při



zvýšení teploty k rychlejšímu uvolňování chloru do ovzduší. Teplota nad 50°C působí na většinu vegetativních mikrobů letálně. Vztah mezi účinkem a teplotou vyjadřuje t.zv. teplotní koeficient. Jeho hodnoty jsou pro jednotlivé chemické látky různé a kolísají i s druhem mikroba. Ukazují, jak rychle se mění účinek látky se změnou teploty. Teplotní koeficient zjistíme stanovením expozice nutné k usmrcení dvou stejných dávek kultury, vystavených stejným koncentracím zkoušeného prostředku při různých teplotách.

(Příklad: v dané koncentraci usmrtí dezinfekční látka mikroba při teplotě 22°C za 30 min. a při teplotě 37°C za 5 min. Teplotní koeficient pro rozmezí 22-37°C se vypočte:

$$30 : 5 = 6$$

Pro každý stupeň daného teplotního rozmezí (t.j. 15°C) se vypočte TK takto:

$$\frac{\log 6}{15} = 0,0518$$

Příslušné číslo k tomuto logaritmu je 1,127 pro každý °C a znamená o kolik se změní expozice při změně teploty o 1°C.

U látek s nízkým teplotním koeficientem lze předpokládat použitelnost v širším teplotním rozmezí.

- 2.3. **Bílkovinný koeficient:** Přítomnost organických látek ovlivňuje účinek chemických dezinfekčních prostředků. Mechanismus tohoto působení je složitý, závisí na složení dezinfekčního prostředku i na typu organické látky. Organická hmota může reakcí s dezinfekčním prostředkem vytvářet sloučeniny málo rozpustné nebo méně toxické než je samotný dezinfekční prostředek. Tím může být zesílena mechanická ochrana mikrobů nebo snížena koncentrace účinné látky. Pro stav, v jakém se mikroba nachází během působení dezinfekční látky v daném prostředí se zavádí pojem "chráněné a nechráněné" bunky. Nechráněným mikroba proniká látka ve zlomcích vteřiny, u mikroba chráněného organickým prostředím s vysokým obsahem bílkovin nebo tuků je jednak zpomaleno pronikání, jednak dochází obtížněji k metabolickým a protoplazmatickým změnám.

Kriteriem pro hodnocení vlivu organických látek na účinnost dezinfekčních prostředků je t.zv. bílkovinný koeficient. Vyjadřuje poměr baktericidního účinku daného preparátu ve vodném roztoku k účinnosti téhož preparátu v roztoku bílkoviny. Při testování se zkoušená látka ředí 20% vodným roztokem krevního sera. Čím menší je hodnota BK, tím méně ovlivňuje přítomnost bílkovin v prostředí účinnost dezinfekční látky.

Příklad: Dezinfekční prostředek usmrtí mikroba za 6 min ve vodném roztoku při ředění 1:250 a v roztoku 20% sera při ředění 1:50. Bílkovinný koeficient pro exp. 6 min

$$250 : 50 = 5$$

Účinnost dezinfekčního prostředku je tedy v přítomnosti bílkovin 5x menší.

## 2.4. Zkoušené látky.

### 2.4.1. Ředidla.

Zkoušené látky jsou buď ve formě pevné substance nebo roztoku. Substance mají být rozpustné ve vodě event. v biologicky neaktivním rozpouštědle, s možností dalšího ředění. V případě emulgování vodou. Rovněž roztoky mají být ředitelné nebo emulgovatelné vodou. Pro ředění přípravků se používá sterilní destilovaná voda. Při použití jiných rozpouštědel než voda je nutné kontrolním pokusem zjistit, zda neovlivňují negativně růst mikrobů. Vzorky se ředí vždy před pokusem.

### 2.4.2. Způsob ředění.

Při vyjadřování koncentrace zkoušených přípravků v roztoku se přípravek považuje za jednotnou látku a jeho množství se udává v g/l nebo v ml/l. (Podle SI, tedy nikoliv v %).

Pokud se uvádí pouze množství aktivní látky, je třeba toto výslovně uvést, aby nedošlo k záměně (na př. Persteril - kyselina peroctová, formalin - formaldehyd).

Při ředění roztoků se doporučuje užívat jednotnou stupnici ředění: 10 - 7,5 - 5,0 - 2,5 - 1,0 - 0,75 - 0,5 - 0,25 - 0,1 atd. Při testování zcela neznámé látky je vhodné vyzkoušet nejprve orientačně řadu ředění  $10^{-1}$  -  $10^{-5}$  a podle výsledku zvolit příslušnou část stupnice.

## 2.5. Neutralizátory.

Neutralizátory jsou látky, které přerušují (neutralizují) působení dezinfekční látky po dané expozici. U některých dezinfekčních přípravků může jejich velmi malé množství přenesené do kultivačního bujónu působit dále jako inhibitor růstu bakterií, zejména když se jedná o mikroorganismy předem osla-



bené a poškozené působením dezinfekční látky.

Neutralizátory se používají různým způsobem:

- přidávají se přímo do tekuté půdy
- přidávají se do první zkumavky při zředování mikrobiálními suspensemi při kvantitativním stanovení počtu zárodků
- přidávají se do první vody na oplachování nosičů mikrobů.

Jako univerzální neutralizátor pro různé skupiny dezinfekčních prostředků se osvědčila směs:

Tween 80	30 g/l
lecitin	3 g/l
cystein	1 g/l

Pro halogenové preparáty se doporučuje přidat sirnatan sodný (5 g/l). Tuto neutralizační směs je možno sterilizovat při 120°C 20 min.

Univerzální neutralizátor je možno nahradit pro vybrané skupiny dezinfekčních látek jednotlivými složkami:

aldehydy: histidin	5 g/l	
halogeny: sirnatan sodný	5 g/l	
organocítní prep: Tween 80	30 g/l	+ lecitin 3g/l
kvarterní amoniové sloučeniny:	Tween 80 30 g/l	+ lecitin 3 g/l
		nebo mýdlový roztok 5 g/l
organické sloučeniny rtuti: thioglykolát sodný	2,5 g/l	

Poznámka: Protože kultivační bujón jako směs organických látek inaktivuje částečně působení dezinfekčních prostředků, doporučuje se zjistit, zda je nutné přidávat do bujónu neutralizátor, nebo zda samotný bujón stačí k neutralizaci nebo zředění látky přenesené kličkou při vyočkování z pokusného roztoku.

Postup: Do zkumavky s bujónem se naočkuje 1 klička zkoušeného přípravku nejvyšší použité koncentrací a 1 klička mikrobiální suspence získané z originální suspence zředěním na  $10^{-2}$ . Kontrolní zkumavka s bujónem se naočkuje pouze zředěnou suspensí. Po inkubaci 24 a 48 h se srovnává zákal t.j. intenzita růstu mikroba v kontrolní a pokusné zkumavce. Pokud je zákal stejný, nedošlo vlivem přenesené dezinfekční látky k inhibici růstu a nemusí být použit zvláštní neutralizátor.

## 2.6. Exposice.

Účinná expoziční doba dobrých dezinfekčních prostředků má být co nejkratší. Pro testování se používá řada exposic 1, 2, 4, 8, 16, 30, 60 min, 2, 4 h. Podle předpokládaného použití a účinnosti přípravků se zvolí vhodná část stupnice, na př. minutové exposice pro přípravky určené k dezinfekci pokožky, hodinové exposice pro ukládání nástrojů.

## 2.7. Kultivační půdy.

Používání vhodných a kvalitních půd je jedním z předpokladů pro získání správných výsledků pokusů. Dobrou reprodukovatelnost výsledků zajišťují standardní živné půdy vyráběné průmyslově v sušeném stavu. Výhodou sušených živných půd je možnost snadného skladování a přípravy libovolného množství potřebné půdy.

V ČSSR jsou používány výrobky SEVAC n.p. IMUNA, Šaříšské Michalany, okr. Prešov.

Pro kultivaci uvedených mikrobu (4.1.1.) jsou vhodné následující půdy.

### 1. Živný bujon č. 2:

Obsahuje vhodné množství živných látek pro dobrý růst bakterií z relativně malých inokul. Receptura této půdy je kvalitativně srovnatelná s označením "Nutrient Broth No. 2" zahraničních preparátů.

složení: masový výtažek (sušina)	10 g/l
pepton pro bakteriologii	10 g/l
NaCl	5 g/l
pH ± 7,0	

### 2. Živný agar č. 2:

Vhodný pro všeobecné použití v bakteriologii. Kvalitativně odpovídá označení "Nutrient agar No 2" zahraničních preparátů.

složení: Masový výtažek (sušina)	10 g/l
směs peptonů SEVAC	10 g/l
NaCl	5 g/l
agar	15 g/l
pH 7,2	

### 3. Sabouraudova půda SEVAC:

Je určena pro kultivaci kvasinek a plísní.

složení: pepton pro bakteriologii	8,0 g/l
glukosa	18,0 g/l
maltosa	18,0 g/l

### 4. Sabouraudův agar SEVAC:

Je určen pro izolaci a kultivaci kvasinek.

složení: pepton pro bakteriologii	8,0 g/l
glukosa	18,0 g/l
maltosa	18,0 g/l
agar	15,0 g/l

### 5. Krevní agar:

Pro přípravu se použije živný agar č. 2, do kterého se asepticky přidá 5-7% sterilní krve.

### 6. Kolmý serový agar:

Používá se pro uchovávání mikrobů v půdních konzervách: Základní složkou je živný agar pH 7,2-7,4, obohacený po sterilizaci 10% sterilního telecího séra a rozplněný za aseptických podmínek do zkumavek po 5 ml.

## 3. Interpretace výsledků.

### 3.1. Kvalitativní metody.

Výsledky získané kvalitativními metodami vyjadřují pouze schopnost mikrobů množit se, jsou-li po expozici v dezinfekčním roztoku vyočkovány do živné půdy. Přitom není možné stanovit numericky přesný počet přežívajících mikrobů. Nejčastěji se používá hodnocení:

- + znamená, že mikrob roste, tedy látka je neúčinná,
- znamená, že mikrob neroste, látka je účinná.

I při hodnocení výsledků získaných kvalitativní suspenční metodou (4.2.) lze uplatnit požadavek snížení počtu mikrobů vlivem působení dezinfekční látky o 99,99%. Vyplývá to z předpokládané iničiální density mikrobiální suspence a způsobu jejího zředění během pokusu (4.1.5).



### 3.2. Kvantitativní metody.

Výsledky kvantitativních pokusů poskytují údaje o vlivu různých faktorů na dynamiku dezinfekčního procesu. Pro hodnocení účinnosti je zaveden pojem mikrobicidní efekt (ME), který udává řádový pokles počtu CFU (colony forming units, t.j. jednotek schopných tvořit kolonie) v daném systému mikrobiální suspence a dezinfekční látky, v závislosti na různých faktorech (koncentrace, teplota, čas).

$$ME = \log \frac{N_0}{N_d} = \log N_0 - \log N_d$$

$N_0$  = počet CFU v kontrolním pokusu s  $H_2O$

$N_d$  = počet CFU po aplikaci dezinfekční látky

Zavýhovující pro stanovení účinnosti dezinfekční látky je považován pokles počtu CFU o 4 řády, t.j. o 99,99%, t.j. ME = 4 (Tab. 3).

### 4. Laboratorní metody.

Laboratorní metody stanovení dezinfekční účinnosti přípravků podávají základní údaje o antimikrobních vlastnostech zkoušených látek. Na jejich podkladě musí být dále prováděny modelové pokusy odpovídající praktickým podmínkám i konečné ověření v praxi. Při stanovení účinnosti jednou metodou nelze výsledky aplikovat i na jinou metodu. Každý pokus musí být alespoň 3x opakován, buď v časovém odstupu nebo paralelně.

#### 4.1. Testovací mikroorganizmy.

##### Přehled kmenů.

- 4.1.1. Při základním výzkumu dezinfekce, při testování a srovnávání různých látek a všude tam, kde jsou požadovány reprodukovatelné výsledky, je nutné pracovat s mikroby známých a prověřených vlastností. Tomuto požadavku odpovídají kmeny soustředěné ve sbírkách mikroorganizmů, kde jsou odborně konzervovány a evidovány a odkud je možné obdržet požadované kmeny v lyofilizovaném stavu.

V ČSSR zasílá mikrobiální kmeny Čs. státní sbírka typových kultur Institutu hygieny a epidemiologie, Praha 10, Šrobárova 48, PSC 100 42. Mezinárodní označení této sbírky je Czechoslovak National Collection of Type Cultures (CNCTC).

Výběr kmenů vhodných pro testování dezinfekčních prostředků zahrnuje zástupce  $G^+$  a  $G^-$  mikroby, kvasinkovitých organismů a bakteriálních spor.

A: <i>Staphylococcus aureus</i>	CNCTC Mau 43/60 <sup>+</sup>
<i>Escherichia coli</i>	CNCTC 324/70 (NCTC 8196) +)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> var. <i>erythrogenes</i>	CNCTC Ps 79/70 (NCTC 6749) +)
<i>Candida albicans</i>	CNCTC 49/64
<i>Bacillus subtilis</i>	CNCTC 4/42
B: <i>Proteus vulgaris</i>	CNCTC Pr O 11/70 (NCTC4635) +)
<i>Salmonella typhimurium</i>	CNCTC Tm 4/49

(NCTC National Collection of Type Cultures,  
London)

<sup>+</sup>) mezinárodní standardní kmeny pro testování dezinfekčních prostředků

Základní řadu mikroby ze skupiny A je možno doplnit o mikroby skupiny B, podle zaměření jednotlivých testů.

Někteří autoři zařazují mezi vybrané mikroby také *Mycobacterium phlei*, jako zástupce mykobakterií. *M. phlei* jako nepatogenní, saprofytický mikroorganismus má řadu vlastností odlišných od patogenních mykobakterií: na př. růstové nároky, rychlost růstu i rezistenci k různým faktorům. Není tedy vhodné, zařazovat tento druh jako reprezentativního zástupce skupiny mykobakterií. Kromě toho byly zjištěny rozdíly v citlivosti k dezinfekčním prostředkům i u patogenních druhů mykobakterií. Zavedení *M. phlei* jako standardního testovacího kmene by mohlo vést k mylné interpretaci výsledků a k jejich generalizaci na celou skupinu mykobakterií. Proto je nutné, aby se testováním přípravků vhodných k dezinfekci patogenních mykobakterií zabývala specializovaná pracoviště.

#### Charakteristika jednotlivých mikroby.

*Staphylococcus aureus* Mau 43/60:  $G^+$  koky, velikosti 0,4-0,6  $\mu\text{m}$ . Po 24 h kultivaci při 37°C tvoří kolonie velikosti 0,1-0,5 mm, hladké, lesklé, neprůsvitné, mazlavé, barvy žlutobílé. V bujonu tvoří zákal a malý sediment, bez povrchové blanky. Iso-  
loval dr. Ludwig Grün, Düsseldorf, "SG 511".  
Kultivační půdy: krevní agar, masopeptonový bujon  
Kultivační teplota: 37°C.



Escherichia coli Ec 324/70: G<sup>-</sup> tyčinky, velikosti 0,3-0,5 x 1,2-3,7  $\mu$ m. Po kultivaci při 37°C tvoří kolonie velikosti 1-2 mm hladké, lesklé, mazlavé, šedobílé barvy. V bujonu tvoří zákal, slabý sediment, žádnou blanku. Pochází ze sbírky NCTC 8196. Kultivační půdy: masopeptonový bujon a agar. Kultivační teplota 37°C.

Pseudomonas aeruginosa var. erythrogenes PS 79/70: G<sup>-</sup> tyčinky, velikosti 0,3-0,5 x 0,5-1,2  $\mu$ m. Po 24 h kultivaci na masopeptonovém agaru tvoří kolonie velikosti 0,6-1 mm, hladké, lesklé, mazlavé, barvy zelenožluté, bez kovového lesku. Okraje kolonií jsou hladké i roztřepané. Vyskytuje se ve formách S, SR, R. Na místě nárostu tvoří na agaru hnědý pigment. Pochází ze sbírky NCTC 6749. Kultivační půdy: masopeptonový bujon a agar. Kultivační teplota: 37°C.

Candida albicans 49/64: G<sup>+</sup>, velikost 2-7 x 3-5  $\mu$ m. Na Sabouraudově agaru tvoří po 48 h kultivaci kolonie velikosti 1-1,8 mm, matně lesklé, hladké, bílé. V glukosovém bujonu tvoří sediment. Pochází z Centralbureau Voor Schimmelcultures, "35H", Baarn, Holland. Kultivační půdy: Sabouraudův agar, Sabouraudův (glukosový) bujon. Kultivační teplota: 30°C.

Bacillus subtilis 4/42: Gram-labilní, tyčinky 0,4-0,8 x 1-3  $\mu$ m. Spory jsou centrální, paracentrální, cylindrické, oválné. Po kultivaci 24 h na masopeptonovém agaru tvoří kolonie 1-2,5 mm, drsné, matné, ploché s hladkými i roztřepenými okraji, barvy šedobělavožluté. Kolonie jsou neadherentní a odlupují se z povrchu agaru. V bujonu roste v povrchové blance. Kultivační půdy: masopeptonový agar a bujon. Kultivační teplota: 37°C.

Proteus vulgaris Pr O 11/70 "OXL": G<sup>-</sup> tyčinky i vlákna, velikosti 0,3-0,5 x 0,8-3  $\mu$ m. Po kultivaci 24 h při 37°C na masopeptonovém agaru se tvoří kolonie velikosti 0,1-1,6 mm, hladké, lesklé, mazlavé, barvy šedobělavé. Vyskytuje se ve formách S a SR. V bujonu roste v zákalu, se slabým prstencem na povrchu a sedimentem. Pochází ze sbírky ATCC 6896, jako kmen pro testování desinficiencí.



Salmonella typhimurium Tm 4/49: G<sup>-</sup> drobné tyčky ve formě kokobacilů. Pdkultivaci 24 h při 37°C tvoří na 2% agaru kolonie velikosti 1,4-2 mm, hladké, lesklé, mazlavé, barvy šedo-bílé. V bujonu roste v zákalu. Kmen byl izolován z nutrie r. 1949.

Kultivační media: masopeptonový agar a bujon.

Kultivační teplota: 37°C.

#### 4.1.2. Konservace kmenů.

Bakteriální kmeny používané k testování musí být udržovány za správných podmínek, aby nedošlo k nežádoucím změnám jejich vlastností. Nejvhodnější způsob konservace kultur je lyofilisace, při které zůstanou zachovány a nezměněny původní vlastnosti mikrobů.

Pro krátkodobější uchovávání kultur se doporučuje metoda t.zv. půdních konserv. Princip metody spočívá v tom, že mikrob se naočkuje vpichem do kolmého agaru ve zkumavce, který se po inkubaci 24 h při vhodné kultivační teplotě pře-  
vrství sterilním parafinovým olejem a uzavře se vatovou a gumovou zátkou. Konservy se uchovávají při teplotě +4 nebo +20°C. Tyto konservy mají trvanlivost 1-3 roky, pak je nutno je přeočkovat pasážováním přes bujon a pevnou půdu. Z jedné konservy je možno vyočkovávat mikroba opakovaně, dokud nedojde ke ko taminaci půdy.

Pro výše uvedené kmeny používané k testování dezinfekčních prostředků vyhovuje plně použití kolmého sérového agaru, pro *Candida albicans* se doporučuje kolmý sladinkový nebo Sabouraudův agar a přeočkování po 1 roce. (2.7.).

Nejméně vhodný způsob přechovávání kmenů, při kterém se ztrácejí některé vlastnosti kmenů, je dlouhodobé pasážování na pevných půdách s přeočkováním v několikadenním inter-  
valu.

#### 4.1.3. Příprava suspense vegetativních forem mikrobů.

Po vyočkování z půdní konzervy nebo z lyofilisátu se mikrob pasázuje na vhodné pevné půdě. K přípravě experimentální suspense se použije 3-10 pasáž, t.j. v průběhu 3-10 dnů se kultura denně přeočkovává na agarové plotny a k přípravě suspense se použije vždy 24h kultura. Několik kolonií se suspenduje ve sterilním fyziologickém roztoku nebo 0,1% pep-  
tonové vodě. Densita suspense se upraví vizuálním srovnáváním se zákalovým standardem podle McFarlanda č.5, nebo nefelometricky. Suspense má obsahovat 10<sup>8</sup>-10<sup>9</sup> zárodků/ml. Objem suspense se stanoví podle předpokládané potřeby.

#### 4.1.4. Příprava suspence bakteriálních spor.

Kultivace *B. subtilis* probíhá na šikém agaru 48 h při 37°C a 5-6 dní při pokojové teplotě. Pak se na vysporulovanou kulturu nalije 5 ml sterilní destilované vody a vzniklá suspenze se přepipetuje do zkumavky. Densita spgr upravená podle stupnice McFarlanda č. 5 dosahuje asi 10<sup>8</sup> spor/ml.

Kontrola sporulace se provádí mikroskopicky na preparátech barvených podle Wirtze-Conklina: fixovaný preparát se převrství 5% vodným roztokem malachitové zeleně a zahřívá se do vystoupení par 2-3 min, barvivo se slije a postup se opakuje celkem 3x. Pak se preparát opláchne a dobarvuje se 2 min zředěným karbolfuchsinem. Správně vysporulovaná kultura má obsahovat alespoň 80% spor.

Tepelná inaktivace spor není nutná. Jestliže se vychází z předpokladu, že spory jsou odolnější než vegetativní formy a působí se na ně látkami o vyšší koncentraci, je málo pravděpodobné, že by citlivější vegetativní formy mohly přežít a ovlivnit výsledek pokusu. Naproti tomu může tepelná inaktivace (nebo i chemická, doporučovaná některými autory) poškodit bakteriální spory a tím změnit i jejich citlivost.

#### 4.1.5. Stanovení počtu zárodků v suspensi.

Aby výsledky pokusů byly srovnatelné, je třeba pracovat se stejným množstvím zárodků. Hustota jedinců v suspensi se může určit několika způsoby:

- měřením optické density na nefelometru
- počítáním v počítací komůrce
- pomocí srovnávacího zákalového standardu.

Tento způsob je nejjednodušší a po zacvičení jednoho pracovníka dává dostatečně standardní výsledky. Srovnává se podle zákalové stupnice BaSO<sub>4</sub>, připravené podle McFarlanda. Srovnávací standard č. 5 odpovídá počtu mikrobu 10<sup>8</sup>-10<sup>9</sup>/ml. Pro jednotlivé mikroby platí přibližně tyto hodnoty:

<i>S. aureus</i>	7.10 <sup>8</sup> - 10 <sup>9</sup>
<i>E. coli</i>	7.10 <sup>8</sup> - 10 <sup>9</sup>
<i>Ps. aeruginosa</i>	6.10 <sup>8</sup> - 10 <sup>9</sup>
<i>Candida albicans</i>	5.10 <sup>7</sup>
<i>B. subtilis</i> (spory)	4.10 <sup>8</sup>



Příprava zákalového standardu č. 5: smíchá se 95 ml 1%  $H_2SO_4$  p.a. a 5 ml 1%  $BaCl_2$  p.a. Vzniklá suspence se v množství asi 10 ml zataví do bakteriologické zkumavky.

Mikrobiální suspence má obsahovat  $10^8$ - $10^9$  CFU/ml. Stanovení této hodnoty vyplývá z požadavku, aby se působením dezinfekčního prostředku snížil počet mikrobů o 4 řády, t.j. o 99,99% z původního počtu zárodků. Při stanovení hodnoty  $10^8$ - $10^9$  se vychází z uspořádání suspensních testů, při kterých se původní množství zárodků v průběhu pokusu sníží postupným zředováním celkem o 4 řády. Zbývající počet jedinců musí pak být usmrcen působením zkoušené látky.

(Příklad: Mikrobiální suspence density  $10^9$ /ml se zředí při provádění suspensní metody (4.2.) v Petriho miskách na  $10^7$  (0,1 ml suspence se přidá k 10 ml zkoušeného nebo kontrolního roztoku). Při vyočkování kličkou z pokusného roztoku v Petriho misce do 5 ml bujony se přenese cca 0,01 ml roztoku, ve kterém je množství  $10^7$  zárodků. Výsledný počet zárodků v bujonech pak bude cca  $2 \cdot 10^4$ /ml. Jestliže toto množství bylo usmrceno působením zkoušené látky, mikroby v bujonech neporostou a látka bude hodnocena jako účinná).

Při použití 16 h bujonové kultury se předpokládá počet mikrobů cca  $10^9$ /ml.

Při přípravě suspence z kolonií vyrostlých na agarové plotně se hustota upraví podle některého z uvedených způsobů.

Přesný počet zárodků se stanoví dodatečně zředovací metodou a kultivací na agaru: Připraví se 4 zkumavky s 9,9 ml fyziologického roztoku nebo 0,1% peptonové vody. Ze základní suspence se přenese 0,1 ml do první zkumavky a po promíchání se vždy novou pipetou přenese 0,1 ml do druhé zkumavky, z druhé do třetí atd. Vznikne řada ředění  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-8}$ , z posledních dvou zkumavek se přenese po 0,5 ml na 2 agarové plotny. Potevřené plotny se nechají uschnout v termostatu a pak se inkubují 24 h při  $37^\circ C$ . Po spočtení kolonií se stanoví počet zárodků v původní suspensi. Hodnotí se plotny, na kterých vyrostlo 20-300 kolonií.

počet kolonií na obou plotnách = CFU/ml

CFU/ml x stupeň ředění = počet CFU v základní suspensi

Příklad: v ředění  $10^{-8}$  bylo stanoveno 55 CFU/ml. Počet

CFU v základní suspensi se vypočte  $55 \cdot 10^8 = 5 \cdot 10^9$ /ml.



## 4.2. Kvalitativní suspensní metoda.

### 4.2.1. Standardní suspensní metoda.

Suspensní metoda s kvalitativním hodnocením výsledků je technicky nejjednodušší metoda, která umožňuje jednak určení nejkratší účinné expozice při určité koncentraci, jednak určení nejnižší účinné koncentrace při standardní expozici. Je vhodná pro rychlou kontrolu účinnosti dezinfekčních roztoků používaných v praxi i pro srovnání účinnosti různých přípravků.

Pomůcky: sterilní Petriho misky plastikové nebo skleněné (počet podle zvolených koncentrací), banky na ředění roztoků, pipety a 10 ml a a 1 ml dělené, bakteriologické zkumavky s živnou půdou (počet koncentrací x počet expozic), bakteriologické kličky  $\varnothing$  4-5 mm, sterilní destilovaná voda.

#### Provedení pokusu:

1. U zkoušeného přípravku neznámé účinnosti se v předpokusu stanoví jeho účinnost ve zředění  $10^{-1}$  až  $10^{-5}$  při expozicích 5, 15 a 30 min při použití jednoho mikroba (nejčastěji *S. aureus*), podle dále uvedeného postupu (bod 3-7).
2. Podle výsledku předpokusu se vybere 4-5 koncentrací vzorku, u kterých se předpokládá kladný i záporný výsledek. Vzorky se ředí sterilní destilovanou vodou podle 2.4.2.
3. Naředěné roztoky se rozplní po 9,9 ml do sterilních Petriho misek. Kontrolní miska obsahuje 9,9 ml dest. vody.
4. Do středu každé misky se přidá 0,1 ml mikrobiální suspenze připravené podle 4.1.3. a krouživým pohybem miskou se zamíchá.
5. Po expozici 1, 2, 4, 8, 16, 30, 60 min a 2, 4 h se vyočkuje bakteriologickou kličkou o  $\varnothing$  4-5 mm do vhodné tekuté půdy ve zkumavce. Podle výsledku předpokusu je možno řadu expozic zkrátit.
6. Zkumavky se subkulturou se inkubují v termostatu při teplotě  $37^{\circ}\text{C}$  (event. nižší, podle růstových nároků mikroba) po dobu 48 h. Spory se inkubují 5-7 dní.
7. Výsledky pokusu se hodnotí po inkubaci podle zákalu bujony, sedimentu nebo povrchové blanky. Pro přesnou identifikaci vyrostlých mikrobů je nutné provést kontrolní vyočkování na vhodnou pevnou půdu, s následující kultivací 24-48 h. Pak se odečte definitivní výsledek. Jako účinná se hodnotí koncentrace (expozice) při níž v nejméně 3x opakovaném pokusu nedošlo k růstu mikrobů (3.1.).

#### 4.2.2. Modifikovaná suspensní metoda pro terénní kontrolu dezinfekčních roztoků.

Pro rutinní kontrolu účinnosti dezinfekčních roztoků používaných ve zdravotnických zařízeních lze postup uvedený v 4.2.1. zjednodušit. Ke kontrole jsou dodávány odebrané provozní roztoky dezinfekčních prostředků, u kterých je nutno ověřit jejich účinnost a správnost přípravy. Pokud není možné a vhodnější provést chemický rozbor a stanovit obsah aktivní látky v roztoku, používá se hodnocení biologické, pomocí suspensní metody a vybraných mikrobiálních kmenů.

Pracovní dezinfekční roztoky se odebírají na zdravotnických pracovištích do dobře uzavíratelných lahví v množství asi 100 ml. Na každém vzorku se označí název přípravku, udaná koncentrace a způsob aplikace (na př., na ruce, na povrchy a pod.). Vzorky se zpracovávají tentýž den. Podle možností a vybavení pracoviště by mělo být měřeno pH roztoků a provedena chemická analýza alespoň u halogenových přípravků (stanovení aktivního chloru a jodu).

Biologický pokus se provádí suspensní metodou s mikroby *S. aureus*, *E. coli* a *Ps. aeruginosa*. Mikrobiální suspense se připravují podle 4.1.3. Při provádění suspensní metody se odebrané dezinfekční roztoky neředí. Převedou se v množství 9,9 ml do Petriho misky a přidá se 0,1 ml mikrobiální suspense. Expoziční čas se zvolí podle druhu přípravku a způsobu jeho aplikace: u přípravků určených k dezinfekci rukou 1-8 min, u přípravků na povrchovou dezinfekci až do 30 min. Další zpracování je stejné jako v 4.2.1., bod 5-7.

V uvedeném testu je nutné přidávat do kultivačního bujONU neutralizátory, které neutralizují působení dezinfekční látky přenesené při vyočkování z pokusné Petriho misky do bujONU (2.5.).

#### 4.3. Kvantitativní suspensní metoda.

Kvantitativní suspensní metoda je vhodná k posouzení průběhu hynutí mikrobů v závislosti na koncentraci a čase. Vychází ze suspensní metody, počet přežívajících mikrobů se však hodnotí kvantitativně, po kultivaci na pevné půdě a spočítání kolonií. Počet kolonií se označuje jako CFU.

Při výběru vhodných koncentrací přípravků nelze vycházet mechanicky z výsledků kvalitativní suspensní metody. Vzhledem k odlišným růstovým podmínkám v bujONU a na agarové plotně nemusí výsledky přesně souhlasit. Je tedy nutné provést předpokus s roztoky ředěnými  $10^{-1}$ - $10^{-5}$  a podle výsledku vybrat 3-4 ředění ve vhodném rozsahu (2.4.2.)



**Pomůcky:** Petriho misky - podle počtu koncentrací, zkumavky s 4,5 ml neutralizátoru, zkumavky s 4,5 ml bujonu nebo peptonové vody, pipety a 1 ml dělené, plotny s živnou půdou.

Provedení:

1. Zkoušené vzorky se naředí sterilním rozpouštědlem a rozplní do Petriho misek v množství 9,9 ml.
2. Pro každou expozici a každou koncentraci se připraví řada 5 zkumavek: v první je 4,5 ml neutralizátoru, v dalších 4,5 ml bujonu nebo 1% peptonové vody.
3. Pro každou zkumavku se připraví 1-2 agarové plotny, které se nesuší, ale jen ohřejí v termostatu.
4. Do středu každé misky s naředěným roztokem se přidá 0,1 ml mikrobiální suspence (4.1.3.) hustoty  $10^8$ - $10^9$ /ml.
5. Po dané expozici (1, 10, 20, 30 min) se přeneso 0,5 ml pokusného roztoku z Petriho misky do první zkumavky s neutralizátorem. Novou pipetou se roztok probublá a přeneso se opět 0,5 ml do další zkumavky s bujonem. Postup se opakuje pro všech 5 zkumavek. Z každé zkumavky se pak přeneso po 0,5 ml na 1-2 agarové plotny a nakláněním se tekutina rozlije po celé ploše. Otevřené misky se nechají uschnout v termostatu nebo v susárně při 30-35°C, pak se zavřou a kultivují se běžným způsobem v termostatu. Po inkubaci 24-48 h se spočítají kolonie vyrostlé na agaru a vypočte se počet CFU/ml (sečtením kolonií ze dvou ploten, na kterých narostlo 20-300 kolonií).
6. Hodnocení viz 3.2.

4.4. Metoda stanovení bakteriostatického působení chemických látek

Touto metodou se stanoví množství chemické látky, které při trvalém účinku (přítomnosti v prostředí) je schopno zabránit množení určitého mikroorganismu, ale nemusí jej usmrtit. Princip metody spočívá v tom, že zkoušená látka se přidá přímo do kultivačního bujonu s naočkovaným mikroblem a hodnotí se, v jaké koncentraci stačí zabránit jeho růstu.

Pomůcky: Dvojnásobně koncentrovaná tekutá živná půda ve zkumavkách, sterilní destilovaná voda, pipety, bakteriologické klíčky. Je výhodné použít zkumavky menších rozměrů.

Provedení:

1. Zkoušená látka se naředí ve dvojnásobné koncentraci, než bude výsledná koncentrace (2.4.2.). Do zkumavek se napipetuje po 2 ml takto naředěné látky.



2. Připraví se mikrobiální suspence (4.1.3.), která se zředí 1:100 destilovanou vodou nebo bujonem a z této zředěné suspence se naočkuje dvojnásobně koncentrovaný bujon v poměru 1:100 (na př. 1 ml suspence do 99 ml bujonu). Množství bujonu se určí podle předpokládaného rozsahu pokusu.
3. Naočkovaný bujon se přidá v množství 2 ml k připraveným roztokům ve zkumavkách.
4. Zkumavky se inkubují při vhodné teplotě 5 dní. Kontrola se provádí za 24, 48 a 120 h. Výsledek se hodnotí podle zákalu bujonu. Vyočkováním na pevnou půdu se identifikují vyrostlé mikroby, event. se prokáže přítomnost mikrobů schopných množení, jejichž růst byl pouze inhibován. Vyočkování je nutné také vzhledem k tomu, že zákal bujonu může být způsoben reakcí zkoušené látky nebo kontaminací.
5. Hodnocení: Jako minimální inhibiční koncentrace (MIC) se hodnotí nejmenší množství látky, které brání růstu mikrobů. Každý pokus se opakuje nejméně 3x.

#### 4.5. Stanovení baktericidního účinku chemických látek na mikroby zaschlé na nosičích z různých materiálů.

Před zavedením nových dezinfekčních prostředků do praxe se ověřuje jejich dezinfekční účinnost za různých podmínek používání.

Na základní laboratorní testy prováděné suspensními metodami, které podávají informace o germicidních vlastnostech zkoušených látek, navazují laboratorní testy, v kterých jsou používány jako nosiče mikrobů předměty z různých materiálů. Jako modelové nosiče jsou vhodné materiály používané ve zdravotnických zařízeních, chovech pokusných zvířat, v průmyslu potravin a v oblasti komunální hygieny.

Na uvedené laboratorní metody hodnocení dezinfekční účinnosti látek navazuje testování přípravků přímo v praktickém prostředí a za podmínek běžného užívání.

##### 4.5.1. Výběr nosičů.

Jako standardní nosiče se používají v bakteriologii skleněné matové perličky o průměru 4-5 mm. Vyznačují se stejnou velikostí a standardní jakostí materiálu. Mikroby na nich dobře ulpívají.

Pro praktické hodnocení účinnosti dezinfekčních prostředků se doporučuje vybírat nosiče z materiálů odpovídajících danému způsobu použití přípravků. Přitom je třeba

ověřit, zda samotný zvolený materiál nepůsobí na mikroby toxicky.

Jako nosiče jsou vhodné destičky o rozměrech 25x25 mm ze skla, podlahové krytiny PVC, kovů a plastických hmot. V zahraniční literatuře se doporučují také keramické dlaždice. Pro hodnocení preparátů určených pro praní textilu se používají bavlněné nebo polyesterové nosiče o rozměrech 20x30 mm.

#### 4.5.2. Výběr testovacích mikroorganismů a příprava mikrobiální suspence.

Protože se pracuje s mikroby zaschlými na nosičích, musí být použity mikroby odolné k vyschnutí. Na nosiče se nanášejí v bujonové suspensi, protože bujon působí jako ochranné prostředí a umožňuje lepší přežití mikrobů při zasychání. Používají se tyto testovací kmeny:

Staphylococcus aureus CN CTC Mau 43/60  
Escherichia coli CNCTC Ec 324/70  
Pseudomonas aeruginosa CNCTC Ps 79/70

Mikrobiální suspence se připraví podle uvedeného postupu (4.1.3.) ve fyziologickém roztoku a zředí se bujonem v poměru 1:100 (t.j. přibližně na  $10^7$  CFU/ml. Pro kontaminaci skleněných perliček se používá bujonová suspence o hustotě  $10^9$ /ml.

#### 4.5.3. Metoda se skleněnými perličkami.

Skleněné matové perličky o velikosti 4-5 mm jsou vhodným nosičem mikrobů. Proti jiným nosičům mají výhodu ve stejné velikosti, povrchu, standardní jakosti materiálu, mikroby na nich dobře ulpívají, snadno se s nimi manipuluje.

Příprava perliček: na sterilní perličky v Petriho misce se nalije 20 ml bujonové mikrobiální suspence o hustotě  $10^9$ /ml. Ke kontaminaci perliček se používá S.aureus. Po 10 minutovém kontaktu perliček se suspensí se přebytek suspence odsaje pipetou a perličky se přesypou do jiné Petriho misky vyložené filtračním papírem. Suší se v termostatu při  $37^{\circ}\text{C}$  po dobu 60 minut. Suché nosiče se uchovávají v lednici a mohou se použít během 3 dnů.

Provedení pokusu: Do zkumavky s testovaným roztokem se vloží kontaminované perličky (počet podle počtu exposic). S ohledem na pracnost metody je možné základní řadu exposic zredukovat podle potřeby, nejlépe na exposice 2, 15, 30 60 min. Po dané exposici se perličky po jedné vyjmají sterilní drátěnou kličkou, opláchnou se ve zkumavce se sterilním neutralizačním roztokem (pro každou perličku je zvláštní zkumavka) a přenesou se do kultivačního bujonu. Kontrolní pokus se provádí s desti-



lovanou vodou nebo ředidlem dezinfekčního prostředku. Kromě toho se kontroluje růst mikrobů z neošetřených nosičů.

Hodnocení: Výsledky se hodnotí kvalitativně, podle růstu mikrobů v bujonu: + mikrob roste  
- mikrob neroste.

#### 4.5.4. Metoda s nosiči z různých materiálů.

Na materiálu, z kterého jsou nosiče zhotoveny velmi záleží. Některé hmoty, na př. guma mají toxické vlastnosti a mikroby na nich hynou. Proto je nutné ověřit v předpokusu přežívání mikrobů na zvoleném materiálu.

Předpokus: na čisté nosiče se nanese mikrobiální suspence v bujonu o densitě  $10^3$ ,  $10^5$  a  $10^7$  CFU/ml, nechá se zaschnout a za 60 min. se nosiče otisknou na agarovou plotnu. Jako kontrolní, stejně zpracovaný materiál se používají skleněné nosiče. Porovnává se hustota nárostu kolonií na otisku ze zkoušeného a kontrolního materiálu.

Příprava nosičů: Vybrané nosiče se důkladně omyjí a pokud to materiál vydrží, vyvaří se v destilované vodě. Před pokusem se otřou 70% etanolem. Na suché nosiče se nanese 1 kapka bujonové suspence mikrobi a roztáhne se po celé ploše nosiče. Suspence se nechá zaschnout. Pro každou koncentraci a expozici se připraví 3-4 nosiče.

Provedení pokusu: Nosiče se zaschlou suspensí se otřou tampo-  
nem namočeným do zkoušeného dezinfekčního roztoku. Natřené nosiče se ve stanovených časových intervalech (5, 15, 30, 60 min.) otisknou na agarovou plotnu. Je nutné, aby agar obsahoval vhodný neutralizátor, aby zbytky dezinfekční látky ne-  
inhibovaly růst mikrobů. Plotny s otisky se kultivují 24 h při  $37^{\circ}\text{C}$ , pak se hodnotí výsledek podle narostlých kolonií.

Hodnocení: Výsledky získané otiskováním nosičů na agarové plotny lze hodnotit semikvantitativně. Kontrolní otisky jsou porostlé masivním nárostem slitých kolonií. Otisky dezinfikovaných nosičů jsou buď sterilní nebo obsahují různý počet bakteriálních kolonií. Počet kolonií vzhledem ke kontrolním otiskům se hodnotí následující stupnicí:

- 0 otisk bez kolonií
- 1 1-20 kolonií
- 2 21-100 kolonií
- 3 izolované kolonie, nelze spočítat
- 4 nárost více či méně slitých kolonií, zřetelně slabší než v kontrole
- 5 souvislý nárost kolonií v kontrole

Při hodnocení účinku dezinfekčního prostředku se vychází z toho, že skutečné množství mikrobů nanesené na 1 nosič je  $10^4-10^5$ . Jestliže po dezinfekci je otisk nosiče sterilní nebo jsou izolovány ojedinělé kolonie, předpokládá se snížení počtu zárodků o 4-5 řádů, které je kritériem dostatečné dezinfekční účinnosti. Pokud jsou izolovány desítky kolonií dochází ke snížení počtu zárodků o 3-4 řády, což u předem dobře očištěných předmětů představuje ještě dobrý dezinfekční efekt. Hodnocení 0 a 1 tedy představuje dobrý dezinfekční účinek přípravku na mikroby zaschlé na nosičích.

#### 4.5.5. Metoda hodnocení pracích prostředků.

Ověření dezinfekčních vlastností pracích přípravků s dezinfekční přísadou je nutno provádět za podmínek, které co nejvíce napodobují proces praní. Textilní nosiče uměle kontaminované vybraným mikroblem se dezinfikují testovaným přípravkem ve statickém nebo dynamickém pokusu. Ve statickém pokusu se nosiče vkládají do testovaného roztoku dané koncentrace a po určené expozici se vyjmají, oplachují sterilní vodou a kultivují. V dynamickém pokusu se nosiče v experimentálním roztoku vkládají do laboratorní pračky, po vyprání se vymáchají ve sterilní vodě a kultivují.

Kultivace mikrobů se provádí dvěma způsoby: vymáchané nosiče se nejprve otisknou na agarovou plotnu a pak se vloží do zkumavky s tekutou půdou. Oplachovací voda se buď sfiltruje přes membránový filtr, který se kultivuje obvyklým způsobem na pevné agarové plotně, nebo se 0,5 ml této vody nalije na agarovou plotnu, nechá se zaschnout a kultivuje se 24 h při 37°C.

Příprava textilních nosičů: Jako standardní textil pro zhotovování nosičů se používá tenké bavlněné plátno. Při speciálních testech je někdy třeba zvolit jiný materiál (vlna, hedvábí, umělá vlákna), podle podmínek a požadavků pokusu. Z vyprané látky se nastríhají nosiče o velikosti 3x2 cm, které se vysterylizují v autoklávu. Na nosiče se nanese 0,1 ml bujonové mikrobiální suspence. Nosiče se používají vlhké nebo se nechají úplně zaschnout.

Provedení statického pokusu: Zkoušený vzorek se naředí a rozdělí v požadovaných koncentracích po 20 ml do Petriho misek. Do roztoků se vloží nosiče, v dvojnásobném množství než je počet expozic. V daných časových intervalech se vyjmají vždy 2 nosiče a opláchnou se postupně v 2x 50 ml sterilní destilované vody. Tím dochází k neutralizaci a odstranění zbytků pracího roztoku. Po máchání se každý nosič otiskne na agarovou plotnu a po sejmutí se vloží do zkumavky s tekutou živnou pů-



dou. Po inkubaci 24 h při 37°C se hodnotí počet kolonií na agaru a růst mikrobů v bujonu.

Provedení dynamického pokusu: kontaminované vzorky se perou v 500 ml testovného roztoku v laboratorní pračce. Laboratorní pračka značky Koltest nebo Linitest se skládá z 6 hermeticky uzavíratelných kytet, které jsou upevněny v otáčivém nosníku a otáčejí se ve vytemperované vodní lázni. Po stanovené době praní se nosiče vyjmou a zpracují se stejným způsobem jako při statickém pokusu.

Oplachovací voda se zpracuje výše uvedeným způsobem.

Hodnocení: Za dokonalý dezinfekční účinek prací lázně se považuje výsledek, když otisky nosičů ani oplachovací voda nevykazuje růst mikroba. Pokud je kultivace oplachovací vody pozitivní a otisk a kultivace nosiče negativní, dojde sice k podstatné redukci počtu mikrobů a k jejich odstranění z textilu, ale nedojde k 100% usmrcení mikrobů vlivem pracího prostředku.

Tab. č. 1 - Příklad protokolu o výsledku kvalitativní suspensní metody

koncentrace přípravku g/l	H <sub>2</sub> O / 20 °C				H <sub>2</sub> O / 35 °C				20 % serum/20 °C							
	1	2	4	8	1	2	4	8	1	2	4	8	1	2	4	8
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7,5	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
5,0	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
2,5	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
1,0	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
0,75	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
0,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
kontrola	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Vysvětlivky : - mikrob neroste + mikrob roste + rozdílný výsledek v několika pokusech

Přípravek: Chloramin B

Mikrob: Staphylococcus aureus Mau 43/60, densita suspense 10<sup>8</sup> - 10<sup>9</sup>/ml

Pozn.: Telecí inaktivované sérum ÚSOL



Příklad výpočtu koncentračního koeficientu (podle údajů v tab.1)

$$t_1 = 2$$

$$T_2 = 8$$

$$t_3 = 32$$

$$C_1 = 2,5$$

$$C_2 = 1$$

$$C_3 = 0,75$$

$$n_1 = \frac{\log t_2 - \log t_1}{\log C_1 - \log C_2} = 1,5$$

$$n_2 = \frac{\log t_3 - \log t_2}{\log C_2 - \log C_3} = 4,8$$

Příklad výpočtu teplotního koeficientu.

Přípravek v koncentraci 1% usmrtí mikroba za 8 minut při teplotě 20°C a za 1 minutu při teplotě 35°C.

$$TK = \frac{8}{1} = 8 \text{ (pro teplotní rozmezí 15°C)}$$

$$\frac{\log 8}{15} = 0,06$$

Logaritmu 0,06 odpovídá číslo 1,15, které udává, o kolik se změní expozice při změně teploty o 1°C

Příklad výpočtu bílkovinného koeficientu.

Při expozici 8 minut usmrtí mikroba testovaný roztok při ředění vodou v koncentraci 1% (1:100) a při ředění 20% serem v koncentraci 5% (1:20).

$$BK = \frac{100}{20} = 5 \text{ (pro exp. 8 min.)}$$

Příklad výpočtu ME při kvantitativní metodě

Koncentrace přípravku g/l	Zředění po exp.	počet CFU/ml (2 plotny)	$N_d$	$\log N_d$	ME
50	$10^{-1}$	0 0	0		$\geq 5,5$
25	$10^{-1}$	22 + 25 = 47	$4,7 \cdot 10^2$	2,7	3,8
10	$10^{-3}$	52 + 44 = 96	$9,6 \cdot 10^4$	5,0	1,5

kontrola  $H_2O$   $10^{-4}$

$$160 + 185 = 345 \quad N_0 = 3,45 \cdot 10^6 \quad \log N_0 = 6,5$$

$$ME = \log N_0 - \log N_d$$

exp. 5 min

Dezinfekční látka v koncentraci 50 g/l a při expozici 5 min snižuje počet CFU o  $\geq 5,5$  řádů, t.j. o 99,999%.  
(Při výpočtu je nutno brát v úvahu 10násobné zředění směsi dezinfekčního roztoku s mikrobiální suspenzí po dané expozici).



## 6. Literatura

1. Adam W. et all.: Richtlinien für die Prüfung chemischer Desinfektionsmittel.  
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1972
2. Beck E.G. et all.: Empfehlungen für die Prüfung und Bewertung der Wirksamkeit chemischer Desinfektionsverfahren.  
Zbl.Bact.Hyg. I Abt.Orig. B, 165,1977, 335-380
3. Borneff J. et all.: Richtlinien für die Prüfung und Bewertung chemischer Desinfektionsverfahren.  
Zbl.Bact.Hyg.I.Abt.Orig. B,172,1981,534-562
4. Borneff J., Werner H.P.: Entwicklung einer neuen Prüfmethode für Flächendesinfektionsverfahren. VII. Mitteil. Vorschlag der Methodik.  
Zbl.Bact.Hyg. I.Abt. Orig.B, 165,1977, 97-101
5. Horn H., Přivora M., Weuffen W.: Handbuch der Desinfektion und Sterilisation, Band I.  
VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin 1972
6. MacKinnon I.H.: The use of inactivators in the evaluation of disinfectants.  
J Hyg. ambr. 73, 1974, 189
7. Reybrouck G., Werner H.P.: Ausarbeitung eines neuen quantitativen in-vitro-Test für die bakteriologische Prüfung chemischer Desinfektionsmittel.  
Zbl.Bact.Hyg.I.Abt.Orig.B, 165,1977,126-137
8. Reybrouck G.: Über die Standardisierung der Wertbestimmung von Flächendesinfektionsmitteln.  
Zb.Bact.Hyg.I.Abt.Orig.B,158,1974,465-468
9. Reybrouck G.: Efficacy of Inactivators Against 14 Disinfectants Substances.  
Zbl.Bact.Hyg. I Abt.Orig.B,168,1979,480-492
10. Svoboda K., Bolek S.: Desinfekce a sterilisace v prevenci nosokomiálních nákaz.  
Avicenum, Zdravot.aktuality,č. 183, Praha 1975
11. Ticháček B.: Teoretické a metodické základy desinfekce.  
SZN Praha 1968
12. Vaškov V.I.: Antimikrobnye sredstva i metody desinfekcii.  
Moskva "Medicina" 1977

ACTA HYGIENICA EPIDEMIOLOGICA ET MICROBIOLOGICA  
Příloha č. 1/1985

Zpracovala: RNDr. Jana Kneiflová, CSc.

Vydává Institut hygieny a epidemiologie v Praze ve  
spolupráci s Výzkumným ústavem preventivního lékařstva  
v Bratislavě

Vytiskla rozmnožovna VTI IHE

Stran 25, náklad 600 výtisků, formát A4, rok vydání 1985

ÚVTEI 73 027

Účelová publikace - JEN PRO VNITŘNÍ POTŘEBU - ZDARMA