

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

SROVNÁNÍ BIOCIDNÍ ÚČINNOSTI DEZINFEKČNÍCH PŘÍPRAVKŮ PROTI BIOFILMU

DIPLOMOVÁ PRÁCE

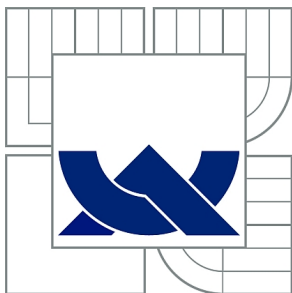
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

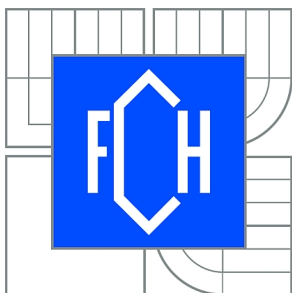
AUTHOR

Bc. BARBORA ŠLITROVÁ

BRNO 2010



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ
FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

SROVNÁNÍ BIOCIDNÍ ÚČINNOSTI DEZINFEKČNÍCH PŘÍPRAVKŮ PROTI BIOFILMU

COMPARISON OF THE BIOCIDAL ACTIVITY OF DISINFECTANTS AGAINST BIOFILM

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Bc. BARBORA ŠLITROVÁ

VEDOUcí PRÁCE
SUPERVISOR

doc. Ing. JIŘINA OMELKOVÁ, CSc.

BRNO 2010



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0424/2009	Akademický rok: 2009/2010
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Barbora Šlitrová	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.	
Konzultanti:		

Název diplomové práce:

Srovnání biocidní účinnosti dezinfekčních přípravků proti biofilmu

Zadání diplomové práce:

1. Vypracujte literární přehled k dané problematice
2. Popište použité metody hodnocení
3. Zpracujte naměřené výsledky z experimentů
4. Zhodnoťte získané výsledky formou diskuse

Termín odevzdání diplomové práce: 14.5.2010

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Barbora Šlitrová
Student(ka)

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.12.2009

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Pseudomonas aeruginosa je častým původcem nosokomiálních nákaz. Tento oportunní patogen je rezistentní vůči antibiotikům různých tříd i vůči biocidům. Některé jeho kmeny tvoří biofilm. Ve zdravotnictví představuje tvorba biofilmu značné riziko, které může vést až k závažnému onemocnění či úmrtí nemocného. Protože bakterie v biofilmu jsou odolnější než jejich planktonní formy, je důležité nalézt takové dezinfekční přípravky, které budou účinné i proti biofilmu. Byla otestována baktericidní účinnost čtyř dezinfekčních přípravků jak vůči biofilmu, tak na planktonních buňkách *P. aeruginosa*.

ABSTRACT

A common vector of nosocomial infections is *Pseudomonas aeruginosa*. This opportunistic pathogen is resistant against different classes of antibiotics as well as against biocides. Some *P. aeruginosa* strains are able to form biofilm. The biofilm formation on medical devices represent a common occurrence that can lead to serious illness and death. Bacteria in biofilms are more resistant than their planktonic counterparts. Therefore it is important to find disinfectants that will be effective also against biofilm. Bactericidal efficacy of four disinfectants has been evaluated on biofilm and on planktonic forms of *P. aeruginosa*.

KLÍČOVÁ SLOVA

Pseudomonas aeruginosa, biofilm, baktericidní aktivita, dezinfekční přípravky

KEYWORDS

Pseudomonas aeruginosa, biofilm, bactericidal activity, disinfectants

ŠLITROVÁ, B. *Srovnání biocidní účinnosti dezinfekčních přípravků proti biofilmu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 53 s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala.

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Můj vděk patří firmě Chemila za možnost podílet se na výzkumu vztahů mezi biofilm tvořící *Pseudomonas aeruginosa* a dezinfekčními přípravky. Děkuji paní Zuzaně Matuškové a doc. Ing. Jiřině Omelkové, CSc., za cenné připomínky a ochotnou pomoc. Také bych ráda poděkovala Ing. Jiřímu Stokláškoví, své rodině a všem, kteří mi poskytli pomoc a podporu při tvorbě této práce.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Biofilm	8
2.1.1	Glykokalyx	9
2.1.2	Heterogenita biofilmu	9
2.1.3	Bakteriální adheze	9
2.1.4	Maturace biofilmu	11
2.1.5	Disperze	11
2.1.6	Rezistence biofilmu vůči antimikrobiálním látkám	11
2.1.7	Infekce spojené s biofilmem	12
2.2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14
2.2.1	Výskyt a odolnost <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14
2.2.2	Patogenita a terapie <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14
2.2.3	Biofilm <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15
2.2.4	Mechanismy rezistence <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16
2.2.5	Shrnutí rezistenčních mechanismů v pseudomonádovém biofilmu	17
2.3	Dekontaminace	19
2.3.1	Fyzikální metody	19
2.3.2	Chemické metody	19
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	21
3.1	Použitá média	21
3.1.1	TSA (Tryptone Soya Agar)	21
3.1.2	TSB (Tryptone Soya Broth)	21
3.1.3	Neutralizátor	21
3.1.4	Ředící voda	21
3.1.5	Fyziologický roztok	21
3.2	Přístroje a pomůcky	21
3.3	Interferující podmínky	23
3.4	Použité mikroorganismy	23
3.5	Testované dezinfekční přípravky	23
3.5.1	Příprava tvrdé vody	23
3.6	Zkušební metody	25
3.6.1	Zkouška biocidní účinnosti vůči biofilmu	25
3.6.2	Kvantitativní test na nosičích pro zjištění baktericidní aktivity	28
4	VÝSLEDKY	29
4.1	Baktericidní účinnost dezinfekčního přípravku č. 1 s účinnou látkou N-chlorbenzensulfonamidem sodným	29
4.1.1	Baktericidní účinnost přípravku č. 1 v 0,01; 0,05 a 0,1% koncentraci proti biofilmu	29
4.1.2	Baktericidní účinnost přípravku č. 1 v 0,1; 0,5 a 1% koncentraci proti biofilmu	31
4.1.3	Baktericidní účinnost přípravku č. 1 suspenzní metodou na nosičích	33
4.1.4	Porovnání baktericidní účinnosti přípravku č. 1	34
4.2	Baktericidní účinnost dezinfekčního přípravku č. 2 s účinnou látkou kyselinou peroctovou	35
4.2.1	Baktericidní účinnost přípravku č. 2 v 0,8% koncentraci proti biofilmu	35
4.2.2	Baktericidní účinnost přípravku č. 2 v 1% koncentraci proti biofilmu	36

4.2.3	Baktericidní účinnost přípravku č. 2 suspenzní metodou na nosičích	37
4.2.4	Porovnání baktericidní účinnosti přípravku č. 2	38
4.3	Baktericidní účinnost dezinfekčního přípravku č. 3 s účinnými látkami ethanolem a isopropanolem	39
4.3.1	Baktericidní účinnost přípravku č. 3 v 50% koncentraci proti biofilmu	39
4.3.2	Baktericidní účinnost přípravku č. 3 v 100% koncentraci proti biofilmu	40
4.3.3	Baktericidní účinnost přípravku č. 3 suspenzní metodou na nosičích	41
4.3.4	Porovnání baktericidní účinnosti přípravku č. 3	42
4.4	Baktericidní účinnost přípravku č. 4 s účinnými látkami KAS	43
4.4.1	Baktericidní účinnost přípravku č. 4 v 0,25% koncentraci proti biofilmu	43
4.4.2	Baktericidní účinnost přípravku č. 4 v 1% koncentraci proti biofilmu	44
4.4.3	Baktericidní účinnost přípravku č. 4 suspenzní metodou na nosičích	45
4.4.4	Porovnání baktericidní účinnosti přípravku č. 4	46
5	DISKUZE	47
6	ZÁVĚR	49
	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	50
	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	53

1 ÚVOD

Tvorba biofilmu se stala velmi zkoumaným a diskutovaným tématem zejména proto, že se biofilm může vytvořit na jakémkoli povrchu a bakterie v tomto biofilmovém společenství jsou odolnější vůči antimikrobiálním látkám. Mikrobiální adheze a formace biofilmu v lékařském prostředí představuje značné riziko, které může vést až k závažnému onemocnění či úmrtí. Prevence tvorby biofilmu či jeho případné ošetření antimikrobiálními přípravky jsou složité, protože mikroorganismy v biofilmu uplatňují širokou škálu rezistenčních mechanismů.

Jedním z organismů tvořících biofilm je také *Pseudomonas aeruginosa*. Tento oportunní patogen je častým původcem nosokomiálních nákaz. Způsobuje infekce zejména u pacientů s narušenou imunitou. Napadá plíce postižené cystickou fibrózou a velmi nebezpečné jsou i infekce popálenin. Postihuje také pacienty po implantacích, zavedení cévek, transkutánních infuzí a močových katétrů. *Pseudomonas aeruginosa* je ubikvitní bakterie, která je velmi obtížně odstranitelná. Může být rezistentní vůči různým třídám antibiotik a také velmi odolná vůči biocidům.

Tato práce se proto věnuje výzkumu vztahů mezi *Pseudomonas aeruginosa* a dezinfekčními přípravky. Bylo vybráno několik komerčně dostupných biocidů, jejichž baktericidní účinnost byla vyzkoušena jak na biofilmu, tak na planktonních formách *P. aeruginosa*.

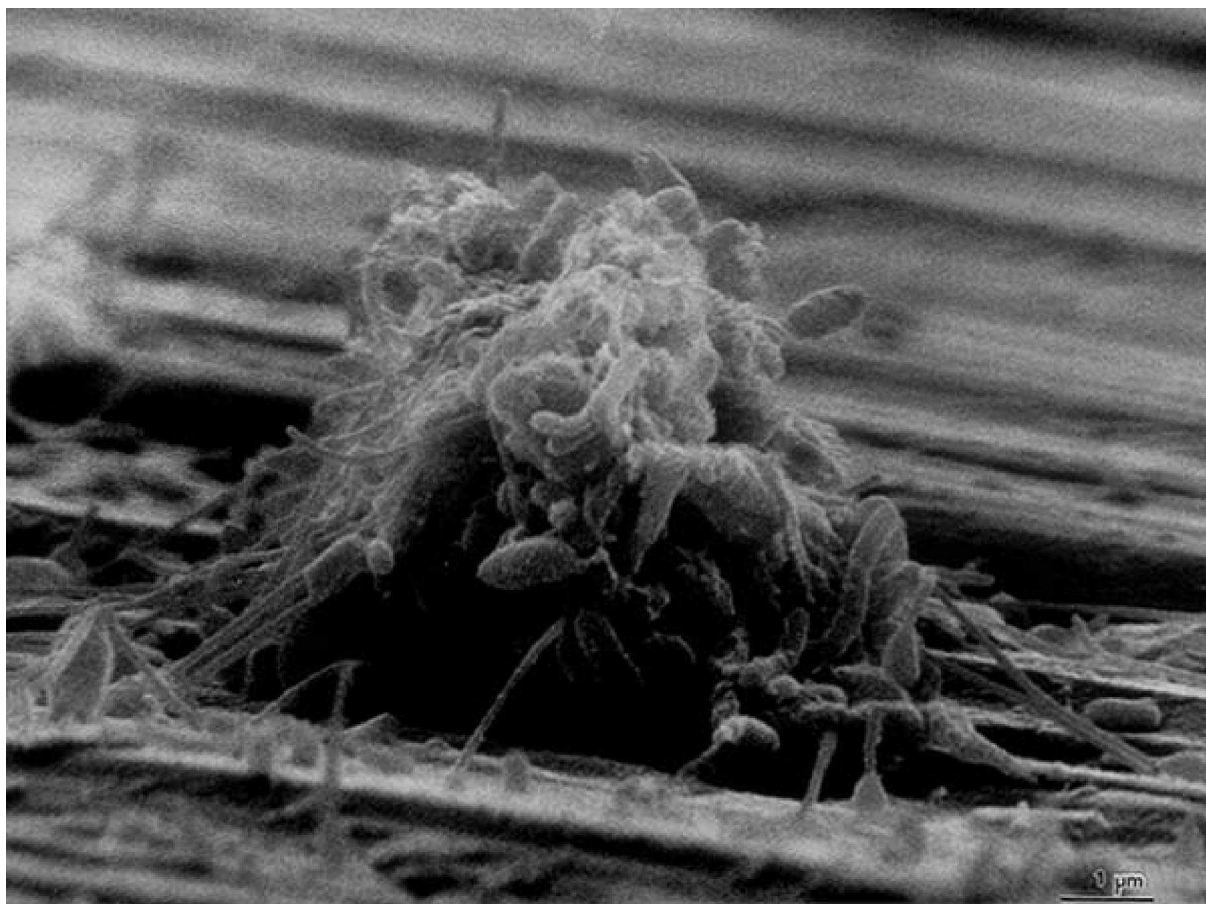
2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Biofilm

Ačkoli byl biofilm poprvé spatřen Antonem van Leeuwenhoekem už koncem 17. století, počátky podrobnějšího zkoumání sahají až na začátek 20. století, kdy Zobell a ostatní pozorovali tendenci bakterií upřednostňovat život v organizovaném společenstvu [1]. V roce 1943 zjistili, že v přirozených vodních ekosystémech jsou bakterie vázané v biofilmu ve značné převaze vůči planktonním buňkám [2]. Avšak teorie popisující tvorbu biofilmu byla vytvořena teprve v roce 1978 [3].

Podle definice je to organizované spolupracující společenstvo mikroorganismů napojených na povrch či k sobě navzájem, začleněných do matrice extracelulárních polymerních látek mikrobiálního původu. Buňky v biofilmu vykazují jiný fenotyp než planktonní buňky stejného genotypu. Biofilm mohou tvořit bakterie, fungi, řasy, protozoa, viry nebo různé kombinace těchto mikroorganismů [4], avšak v této práci bude řeč pouze o bakteriálním biofilmu.

Základními předpoklady pro vznik biofilmu jsou vhodný mikroorganismus, glykokalyx a vhodný povrch. Bakterie dokáží kolonizovat v podstatě jakýkoli povrch – živý či neživý – včetně kontaktních čoček, lodních trupů, potrubí na mléko či ropu, říčních kamenů a zejména pomůcek v lékařství, kterými proudí tekutina, jako jsou např. katétry. V mnoha případech je povrch současně potravním zdrojem, např. celulóza v papírenském průmyslu [1].



Obr. 1 Fotografie biofilmu elektronovým mikroskopem [3]

2.1.1 Glykokalyx

Bakteriální exopolysacharidy jsou hlavní složkou glykokalyx, který tvoří tenkou vrstvu okolo buňky. Bývá hydratován a u většiny kmenů je záporně nabit, takže slouží jako účinná past pro zachycení a nakoncentrování esenciálních minerálů a výživy z okolního prostředí. Tato vlastnost je využívána při čištění odpadních vod. Glykokalyx poskytuje buňce jistý stupeň ochrany před biocidy, antibiotiky, protilátkami, povrchově aktivními látkami, bakteriofágy, amébami či bílými krvinkami. V podstatě tedy glykokalyx vytváří trojrozměrné silové pole, které obklopuje, ukotvuje a chrání bakterie v biofilmu [1].

2.1.2 Heterogenita biofilmu

Je-li biofilm heterogenní (což je v přírodě přirozenější než biofilm tvořený jediným druhem mikroorganismu), metabolity jednoho organismu mohou sloužit jako výživa pro druhý a také adheze jednoho druhu mikroorganismu může ulehčit navázání dalších bakterií. Naopak soupeření o živiny a akumulace toxických produktů primárního kolonizátora může omezit heterogenitu biofilmu [1].

2.1.3 Bakteriální adheze

Proces navázání bakterie na povrch a následný nárůst biofilmu je závislý na řadě faktorů: druhu mikroorganismu, složení povrchu, podmínkách v okolním prostředí a základních metabolitech. Primární adheze mezi bakterií a neživým povrchem je obecně zprostředkována nespecifickou (např. hydrofobní) interakcí, zatímco při adhezi k živé tkáni je zapotřebí specifického molekulárního (lektin, ligand nebo adhezin) mechanismu [1].

Ve své nejjednodušší formě může být bakteriální adheze rozdělena na dvě fáze: primární neboli fáze přichycení a sekundární fáze neboli fáze zabudování. Někdy je přidána ještě fáze kondicionování povrchu. Ta nastává, když je přirozený povrch pozměněn adsorpcí vody, albuminu, lipidů, extracelulárních molekul matrix, fibronektinu, anorganických solí či dalších látek. Adsorpcí se mohou změnit vlastnosti povrchu natolik, že afinita mikroorganismu k tomuto změněnému povrchu je naprosto odlišná [1].

2.1.3.1 Kondicionování povrchu

Před tím než je použit, má např. implantát nebo kanyla čistý a sterilní povrch, většinou vyrobený z tzv. biomateriálu. Po aplikaci implantátu začnou nad jeho povrchem proudit tělní tekutiny (např. krev, moč nebo sliny) a určité látky z nich se koncentrují u povrchu. Druh látek, které se takto budou koncentrovat u povrchu záleží na jeho vlastnostech, to jsou ku příkladu hydrofóbnost nebo náboj. Tyto látky vytvoří kondicionální film, který nemusí pokrývat povrch rovnoměrně, ale může vytvořit mřížkovou strukturu. Vytvořením kondicionálního filmu se změní vlastnosti povrchu, což ovlivní afinitu mikroorganismů [5]. Například plasmové proteiny, jako je fibronectin, zlepšují primární adherenci koagulóza-negativních stafylokoků [6].

Kondicionální film je příčinou toho, že funkční povrchy, jako jsou hydrofilní gely a antimikrobiální povlaky, jsou neúčinné v zabránění mikrobiální adheze. Jsou velmi účinné *in vitro* v nepřítomnosti kondicionálního filmu, ale *in vivo* je pokryje kondicionální film, který tak potlačí jejich funkčnost a umožní mikroorganismům adherovat. Role

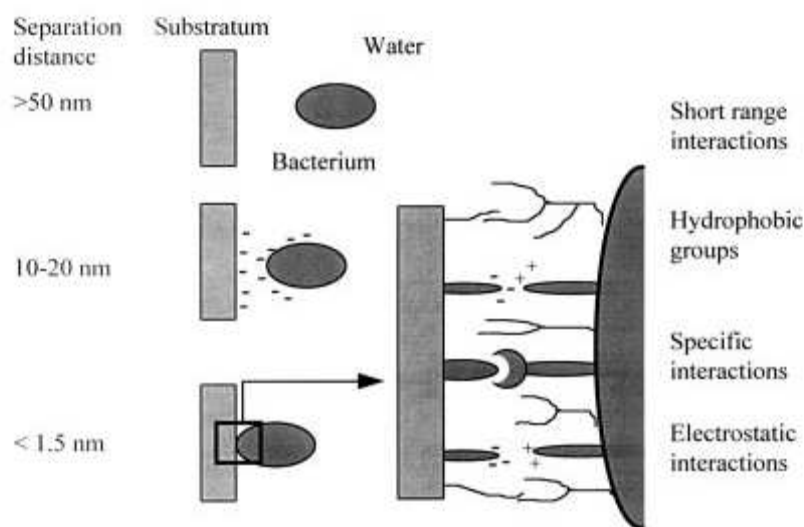
kondicionálního filmu je zásadní pro mnoho patogenů, jež nedokáží adherovat přímo na holý povrch [5].

2.1.3.2 Primární bakteriální adheze (fáze přichycení)

Při primární adhezi dochází k náhodnému střetu vhodného povrchu a planktonní buňky. Tato fáze je reverzibilní. Organismus se dostane k povrchu buď náhodně (např. proudem tekutiny omývajícím povrch), nebo záměrně pomocí chemotaxe a motility. Když organismus dosáhne kritického přiblížení (většinou <1 nm), to, zda adheze nastane nebo nenastane, záleží na konečném součtu přitažlivých a odpuzivých sil mezi povrchem a buňkou. Tyto síly zahrnují elektrostatické a hydrofobní interakce, van der Waalsovy síly, správné sterické natočení, teplotu, hydrodynamické síly... Z hlediska elektrostatických sil dochází většinou k odpuzování, protože většina bakteriálních stěn a inertních povrchů je negativně nabitá. Odpuzivé síly mezi dvěma povrchy mohou být překonány specifickými molekulárními interakcemi, které jsou zprostředkovány adhezinem nacházejícím se na povrchu pili (fimbrií). Nebo například vápenaté a hořečnaté ionty v moči mohou fungovat jako most mezi záporně nabitým povrchem buňky a povrchem s negativním nábojem. Zásadní vliv na výsledek primární adheze však mají hydrofobní interakce [1].

2.1.3.3 Sekundární bakteriální adheze (fáze zabudování)

Sekundární fáze adheze neboli fáze zabudování zahrnuje vytvoření vazby mezi specifickými adheziny a povrchem. V tomto okamžiku volně vázaný organismus dokončí proces adheze produkcí exopolysacharididů, které vytvoří komplexy s molekulami povrchu a s receptor-specifickými ligandy lokalizovanými na pili. Na konci sekundární fáze se adheze stává ireverzibilní, pokud tedy nezpůsobíme přerušení vazby chemicky nebo fyzikálně, a organismus je k povrchu pevně vázán. Jeden organismus může produkovat různé adheziny podle prostředí, ke kterému chce přilnout. V této fázi dochází také k navázání vazby mezi mikroorganismy vzájemně. Produkce některých adhezínů je regulována ve fázi transkripce, což dovoluje bakterii „přepnout“ mezi biofilmem a planktonní formou [1].



Obr. 2 Proces adheze. Při vzdálenosti >50 nm působí pouze Van der Waalsovy síly, při vzdálenosti 10 – 20 nm ovlivňují adhezi Van der Waalsovy a elektrostatické síly, při vzdálenosti $<1,5$ nm dochází k ireverzibilnímu navázání mikroorganismu k povrchu [5].

2.1.4 Maturace biofilmu

Pomnožením mikroorganismu pevně navázaného na povrch a produkcí extracelulárních látek vzrůstá denzita a komplexnost biofilmu. Produkované extracelulární látky interagují s organickými a anorganickými sloučeninami v prostředí a vytváří tak glykokalyx. V případě infikovaného implantátu to může zahrnovat i proteiny vytvořené hostitelem, které reagují na vzniklý zánět, jsou to např. fibrinogen, fibronektin a glykosaminoglykany [1].

Růstový potenciál kterékoli bakterie je limitován dostupností živin v okolním prostředí, perfuzí živin k buňkám v rámci biofilmu a odstraňováním odpadních látek. Optimální hydrodynamický průtok přes biofilm podporuje růst, perfuzi a současně nezpůsobuje erozi svrchních vrstev biofilmu. Dalšími faktory limitující růst biofilmu jsou vnitřní pH, dostupnost kyslíku, dostupnost zdrojů uhlíku a osmolarita [1].

2.1.5 Disperze

V jistém okamžiku dojde ke kritickému nárůstu biofilmu a je dosaženo dynamické rovnováhy, kdy svrchní vrstvy biofilmu začnou vytvářet planktonní buňky. Tyto planktonní buňky mohou kolonizovat další povrch. Buňky ve vrstvách nejbližších kolonizovanému povrchu postupně odumírají nedostatkem živin, snížením pH, pO_2 nebo akumulací toxických meziproduktů [1].

Poslední studie ukazují, že kolonizace povrchu biofilmem, jeho zrání a následný úhyn by mohly být regulovány na úrovni exprese genu závislého na denzitě populace, která je kontrolována signálními molekulami *quorum sensing*. Při *quorum sensing* spolu buňky komunikují tzv. autoinduktory, což jsou malé signální molekuly, jejichž koncentrace je přímo úměrná denzitě populace. Dosažením určité prahové koncentrace autoinduktoru pak dojde k ovlivnění genové exprese. Gramnegativní i grampozitivní bakterie využívají *quorum sensing* jako komunikační kaskádu ke změně konkrétních fyziologických projevů buňky. Tyto projevy zahrnují symbiózu, virulenci, konjugaci, produkci antibiotik, pohyb, sporulaci a v neposlední řadě tvorbu biofilmu. Gramnegativní bakterie pro komunikaci využívají acylované homoserinové laktony, zatímco grampozitivní bakterie k tomuto účelu používají oligopeptidy. Poslední výzkumy naznačují, že *quorum sensing* je využíváno jak v rámci druhu, tak mezidruhově. Signální molekuly, způsob přenosu i geny kontrolovány mechanismem *quorum sensing* se liší. Navzdory těmto rozdílům vzájemná komunikace umožňuje bakteriím zkoordinovat genovou expresi a tím i vlastnosti celého společenstva. Zralý biofilm tak vykazuje znaky (bakteriální růst, fyziologická kooperace a metabolická účinnost), jež mu umožňují formu koordinace jako u jednoduché eukaryotické tkáně [1, 7].

2.1.6 Rezistence biofilmu vůči antimikrobiálním látkám

Buňky v biofilmu mají jiné vlastnosti než jejich planktonní protějšky. Zejména, co se týče rezistence vůči antimikrobiálním látkám, ať už jde o antibiotika, biocidy či germicidy, jsou mikroorganismy v biofilmu vůči těmto látkám odolnější. V některých případech je koncentrace antibiotik o 3 – 4 řády vyšší, chceme-li dosáhnout stejné baktericidní aktivity u bakterií v biofilmu jako u planktonních buněk stejného genotypu. Mechanismy zodpovědné za tuto zvýšenou odolnost jsou následující: (i) zpomalený průnik antimikrobiální látky matrix biofilmu, (ii) jiná růstová rychlost mikroorganismů v biofilmu a (iii) další fyziologické vlastnosti biofilmu [1, 3].

2.1.6.1 Zpomalený průnik antimikrobiální látky matrix biofilmu

Molekuly antimikrobiálního prostředku musí difundovat skrz matrix, aby inaktivovaly buňky v biofilmu. Avšak extracelulární polymery, ze kterých se matrix skládá, představují difuzní bariéru jak tím, že ovlivňují transportní rychlost dovnitř biofilmu, tak tím, že reagují s molekulami antimikrobiálního činidla. Biofilm tak funguje jako určitý molekulární filtr [1, 3]. Různé studie [8, 9] ukázaly, že účinnost glykopeptidových antibiotik (např. vankomycin a teikoplanin) byla ovlivněna matrix biofilmu, zatímco účinnost makrolidových antibiotik ne.

2.1.6.2 Růstová rychlost mikroorganismů v biofilmu

Další mechanismus zodpovědný za zvýšenou rezistenci biofilmu je ten, že buňky v něm rostou pomaleji než planktonní buňky [3]. Evans a kol. [10] prokázali, že nejpomaleji rostoucí *Escherichia coli* byly nejodolnější vůči účinku ceftrimidu. Další studie [11] zase ukázala na biofilmu *Staphylococcus epidermidis*, že čím rychleji mikroorganismus roste, tím rychleji je inaktivován ciprofloxacinem. Výsledkem experimentu v jiné studii [12] byl důkaz, že čím starší je biofilm *Pseudomonas aeruginosa*, tím odolnější je vůči antimikrobiálním látkám. Podobné výsledky vykazují různé kombinace bakterií a antimikrobiálních agens. Autoři [12, 13] tvrdí, že jedním z důvodů rezistence může být nižší metabolická aktivita buněk ve starším biofilmu.

2.1.6.3 Další fyziologické vlastnosti biofilmu

Faktory negativně ovlivňující antimikrobiální aktivitu *in vitro*, včetně pH, pCO_2 , pO_2 , koncentrace divalentních kationtů, úroveň nasycení a koncentrace pyrimidinu, budou mít také nepříznivý vliv na nejhlubší vrstvy bakteriálního biofilmu, kde panují kyselé a anaerobní podmínky. Dá se předpokládat, že baktericidní aktivita antimikrobiálních látek bude v kyselém prostředí se zvýšenou pCO_2 omezena. Aniontová struktura alginátového polysacharidu je zase příčinou hromadění divalentních kationtů v biofilmu *P. aeruginosa*, což negativně ovlivňuje aktivitu aminoglykosidů a tetracyklinů [1].

2.1.7 Infekce spojené s biofilmem

V EU onemocní nosokomiální infekcí každý rok přes 4 miliony pacientů, z toho asi 37000 zemře. Procentuální rozdělení je následující: 27 % odpovídá infekcím močového traktu, 24 % onemocněním dýchacího ústrojí, 17 % infekcím získaných na operačním sále a 10,5 % krevními infekcím. Zbylé procenta zahrnují gastrointestinální onemocnění, infekce kůže a měkkých tkání, onemocnění centrální nervové soustavy, atd. Existuje předpoklad, že 20 – 30 % nosokomiálních infekcí by se dalo zabránit zlepšením hygienických návyků [14].

Nosokomiální infekce jsou mezi prvními 5 příčinami úmrtí na světě. 60 – 70 % z těchto infekcí jsou spojeny s použitím infikovaného implantátu. Patří mezi ně umělé srdeční chlopně, ortopedické implantáty, cévní a močové katétry, kardiostimulátory, náhrady cév, oční protézy, kontaktní čočky...Bez ohledu na to, jak sofistikované a moderní jsou dnešní náhrady a implantáty, stále jsou náchylné ke kolonizaci mikroorganismy [15].

Biofilm může kolonizovat tkáň v těle pacienta a způsobit zánět i bez předchozího zásahu do organismu. Mezi takové nosokomiální infekce patří infekční endokarditida, otitida,...

2.1.7.1 Infekční endokarditida

Infekční endokarditida je zánět vnitřního povrchu srdce neboli endokardu a postihuje zejména srdeční chlopně. Tento zánět způsobují mikroorganismy, nejčastěji streptokoky nebo stafylokoky, ale i gramnegativní bakterie či fungi. Endokarditidou jsou ohroženy zejména poškozené srdeční chlopně (následkem vrozených vad, předchozích operací,...). Při poškození endokardu se vylučuje fibronektin, který je schopen se vázat na fibrin, kolagen, lidské buňky nebo bakterie. Pokud má bakterie receptor na fibronektin, může se navázat na poškozenou tkáň. Bylo dokázáno, že virulentnější kmeny měly vyšší schopnost vazby na fibronektin. Některé streptokokové kmeny také produkují vysokomolekulární dextran, jež usnadňuje adhezi buněk k endokardu. Vytvoření biofilmu na povrchu srdeční chlopně může způsobit poškození chlopně tkáně či embolii [3].

2.1.7.2 Zánět středního ucha (otitida)

Jde vlastně o zánět středoušní sliznice, který může být bakteriálního nebo virového původu. Z bakterií ho způsobují např. *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, β -hemolytické streptokoky, střevní bakterie, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* a další. Problémem léčby zánětu středního ucha může být kromě odolnosti bakterií v biofilmu také nízká penetrace antibiotik do středoušní tekutiny [3].

2.1.7.3 Chronický zánět prostaty

Infekce v prvotním stadiu je snadno léčitelná antibiotiky, ale pokud jsou mikroorganismy rezistentní začnou vytvářet mikrokolonie a následně biofilm a tím se onemocnění dostane do chronické fáze. Mezi mikroorganismy způsobujícími zánět prostaty patří např. *Escherichia coli*, *Klebsiella*, enterobakterie, *Proteus*, *Serratia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Corynebacteriaceae*, nebo *Enterococcus faecalis* [3].

2.1.7.4 Infekce plic postižených cystickou fibrózou

Cystická fibróza (CF) je dědičné onemocnění způsobené mutací genu pro CFTR protein. Zasahuje různé orgány, v plicích způsobuje hromadění hlenu. Plíce jsou potom náchylnější k infekci. Mikroorganismy nejčastěji napadající plíce postižené cystickou fibrózou jsou *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Burkholderia cepacia*. Přesný mechanismus kolonizace plic postižených CF *Pseudomonas aeruginosa* není znám. Při prvotní infekci nejsou kmeny *P. aeruginosa* mukózní. Ale po určitém intervalu dojde nejspíše k mutaci a následné selekci mukózních kmenů. Tyto kmeny jsou pak velmi rezistentní jak vůči imunitní reakci, tak vůči antibiotikům [3].

2.1.7.5 Zánět dásní a periodontitida

Zánětlivá onemocnění zubního okolí jsou způsobeny mikroorganismy jako *Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus micros*, *Eubacterium timidum*, *Eubacterium brachy*, *Lactobacillus* spp., *Actinomyces naeslundii*, *Pseudomonas anaerobius*, *Eubacterium* sp., *Bacteroides intermedius*, *Fusobacterium* sp., *Selenomonas sputigena*, *Eubacterium* sp. strain D6, *Bacteroides pneumosintes*, a *Haemophilus aphrophilus*. Tyto mikroorganismy kolonizují zubní plak, pomnoží se v něm a vytvoří biofilm. Pokud není dodržována pravidelná ústní hygiena, může dojít ke vzniku zánětu [3].

2.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa je drobná gramnegativní nefermentující tyčinka se sklonem k polárnímu barvení, někdy obalená slizem. Pohybuje se pomocí polárně umístěného bičíku. Roste na běžných půdách v plochých perleťově lesklých koloniích, jejichž okolí bývá u většiny kmenů – pokud je půda bezbarvá – zelenavě zbarveno. Mladé kultury voní po hroznech, jahodách nebo jasmínu, starší páchnou po amoniaku. Na krevním agaru vyvolává β -hemolýzu. Je natolik nenáročná, že se dovede pomnožit i v destilované vodě, do níž se dostaly pouhé stopy živin. Odbourává glukózu aerobní respirací. Má pozitivní katalázu a oxidázu a dovede využít citrát amonný jako jediný zdroj uhlíku. Obvykle tvoří barevné pigmenty – zelený (pyocyanin), žlutozelený (fluorescein nebo pyoverdin), někdy i červený a hnědý [16, 17].

P. aeruginosa produkuje liposacharid účinkující jako endotoxin. Mukózně rostoucí kmeny jsou obaleny pouzdrém z alginátu, které jim umožňuje přilnutí k respiračnímu epitelu a chrání je před fagocytózou a účinkem antibiotik. *P. aeruginosa* dále produkuje dva exotoxiny (označované A a S), cytotoxický leukocidin a množství enzymů většinou charakteru proteáz (elastázu, alkalickou proteázu) a hemolysinů (fosfolipázu C a rhamnolipid účinkující jako lecithináza) [16].

2.2.1 Výskyt a odolnost *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonády jsou ubikvitní, nalézají se v půdě a ve vodách, jsou i jedním z původců hniloby u rajčat. V nemocnicích se vyskytují všude, kde je vlhko (kuchyňské výlevky, vázy na květiny,...). V těchto místech se jich nelze zbavit, ale je třeba zamezit kontaminaci sterilních pomůcek a zařízení a dbát, aby je personál nepřenášel z jednoho pacienta na druhého. Snadno kontaminují katetry, dýchací přístroje a tekuté léčivé formy – oční kapky, infuzní roztoky apod. Patří mezi poměrně odolné bakterie. Rostou v širokém rozmezí 4 – 42 °C. Na neživém povrchu jsou schopny přežít 6 hodin až 16 měsíců. Vlhkost jejich výdrž zvyšuje. Na suchém povrchu vydrží i 5 týdnů. Některým dezinfekčním látkám ze skupiny kvarterních amoniových sloučenin odolávají do té míry, že se v nich dokonce množí a jsou rezistentní vůči řadě antibiotik (např. kotrimoxazol) [16, 17, 18].

2.2.2 Patogenita a terapie *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa se chová jako typický oportunní patogen, je schopna napadnout kterýkoli orgán, jehož odolnost byla nějakým způsobem snížena. Je to významný původce nosokomiálních nákaz. Je příčinou nejméně jedné čtvrtiny pozdních ventilátorových pneumonií a napadá plíce postižené cystickou fibrózou. U nemocných s dlouhodobě zavedeným močovým katétre vyvolává infekce močového traktu. Velmi nebezpečné jsou pseudomonádové infekce popálenin, které mohou skončit až smrtelnou sepsí. Generalizovat se a skončit sepsí však může téměř každá pseudomonádová infekce u jedinců se sníženou odolností, např. u novorozenců nebo neutropenií. [16].

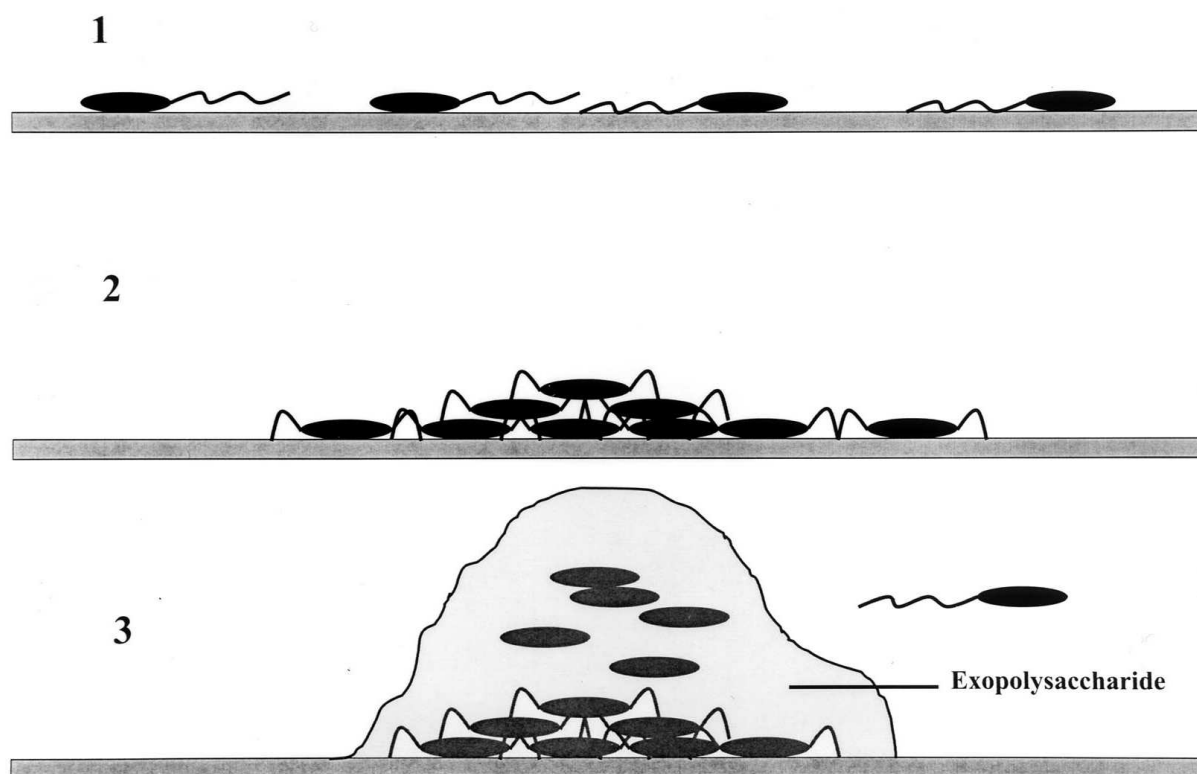
Sekundární infekce ran se vyznačují typickým nazelenalým až modrozeleným hnisem. Koupání ve vodě infikované pseudomonádami může vést k folikulitidě nebo k zánětu zevního zvukovodu. *P. aeruginosa* často nacházíme v sekretu při chronickém zánětu středního ucha. Chronicky probíhají i osteomyelitidy například po implantaci kloubních náhrad nebo

endokarditidy uživatelů drog. Nebezpečné jsou infekce oka po poranění či operaci a keratitidy vyvolané kontaminovanými kontaktními čočkami [16].

V malém množství se pseudomonády mohou vyskytovat u některých jedinců ve střevě. Po širokospektrých antibioticích se přemnoží a vyvolají průjem. Pseudomonádová infekce střeva u novorozenců je příčinou závažné ulcerativní enterokolitidy [16].

Terapeuticky představují pseudomonádové infekce mnohdy problém. Účinná bývá kombinace protipseudomonádového penicilinu (tikarcilin, piperacilin, případně potencované inhibitory beta-laktamázy) s aminoglykosidy (netilmicin nebo amikacin), dále cefalosporiny III. generace (ceftazidim nebo cefoperazon) a karbapenemy (imipenem, meropenem). Účinné jsou i některé fluorochinolony (ciprofloxacin, levofloxacin). Vždy je však nutno vycházet z citlivosti příslušného kmene. K ochraně vysoce rizikových pacientů se užívá inaktivovaná vakcína obsahující i detoxikovaný exoprotein [16].

2.2.3 Biofilm *Pseudomonas aeruginosa*



Obr. 3 Schematické znázornění procesu tvorby biofilmu u *P. aeruginosa* [1]

Pomocí genetické modifikace kmene *P. aeruginosa* PA14 byl podrobně prozkoumán proces tvorby biofilmu tohoto mikroorganismu. Bylo zjištěno, že bakterie výše jmenovaného kmene nejprve primární adhezí vytvoří na povrchu monovrstvu (obr. 2 fáze 1). Bakterie této monovrstvy se poté trhavým pohybem (twitching motility) shlukují do agregátů, ze kterých se stanou mikrokolonie (obr. 2 fáze 2). Pro primární adhezi je klíčovým bičík, který bakterii dostane do kritické blízkosti k povrchu, zatímco pro tvorbu agregátů je nutná syntéza pili typu IV [1].

U *P. aeruginosa* je exopolysacharidický glykokalyx tvořen solí kyseliny alginové. Tento polysacharid se skládá z jednotek kyseliny mannuronové spojených β -1,4 vazbou a C-5

epimeru L-guluronové kyseliny. Produkce kyseliny alginové je regulována na základě různých faktorů v okolním prostředí, jako např. vysoká osmolarita, vysoká pO_2 , přítomnost ethanolu a nedostatek dusíku. Stěžejní pro produkci a regulaci produkce kyseliny alginové je enzym fosfomannomutasa [1]. Davies a kol. [19, 20] dokázali, že se po adhezi k povrchu zvyšuje u bakterií exprese genu pro syntézu kyseliny alginové, a to až 19krát více u buněk biofilmu než u planktonních. A mimo to, že mikroorganismy v biofilmu akumulují 2krát více kyseliny uronové, která je markerem syntézy kyseliny alginové, než volně plovoucí mikroorganismy. Tyto výsledky silně podporují tezi aktivace produkce kyseliny alginové vazbou na povrch, ale protože stejný gen aktivuje i syntézu lipopolysacharidů, musí být interpretovány s jistou rezervou [1].

2.2.4 Mechanismy rezistence *Pseudomonas aeruginosa*

Regulace výskytu *P. aeruginosa* antibiotiky či dezinfekčními přípravky je více než složitá. Největším problémem je rezistence této bakterie vůči antimikrobiálním látkám. Hlavní faktory její rezistence jsou:

- nízká permeabilita buněčné stěny,
- genetická kapacita pro široké možnosti rezistenčních mechanismů,
- rezistence získaná mutací chromozomálních genů regulujících rezistenční geny,
- schopnost získat rezistenční geny od jiných organismů plazmidovým, transpozonovým nebo bakteriofágovým přenosem,
- schopnost tvořit biofilm.

P. aeruginosa je velmi adaptabilní mikroorganismus. Nejen, že je schopna růstu na velkém množství substrátů, může také reagovat na změny v okolním prostředí změnou svých vlastností. Její genom má 6,26 Mbp kódujících 5567 genů. Ve srovnání s *Escherichia coli* (4,64 Mbp, 4279 genů) a *Staphylococcus aureus* (2,81 Mbp, 2594 genů) má *P. aeruginosa* značnou genetickou kapacitu, což vysvětluje její nesmírně adaptabilní povahu [21].

2.2.4.1 Permeabilita buněčné stěny

Jak již bylo zmíněno, hlavní složkou glykokalyx pseudomonádového biofilmu je alginát, který je schopen vázat antibiotika kationtové povahy, jako jsou aminoglykosidy a zabraňovat tak jejich difuzi. Alginát představuje první překážku pro některá antibiotika [21].

Další překážkou pro antimikrobiální agens je vnější membrána buněčné stěny *P. aeruginosa*. Ta omezuje průnik malých hydrofilních molekul a brání průniku větších molekul. Hydrofilní antibiotika s malými molekulami (např. β -laktamáty, chinolony) mohou proniknout do buňky pouze skrz porinové kanály. *P. aeruginosa* produkuje několik druhů porinů. Jeden z nich hraje specifickou roli pro příjem kladně nabitých aminokyselin, jako je lysin. Ztráta genu kódujícího produkci tohoto porinu je spojována s rezistencí vůči imipenemu [21].

Aminoglykosidy a kolistin nepronikají do buňky porinovými kanály, ale vazbou na lipopolysacharid na vnější stěně membrány. Tím poruší její soudržnost a dostanou se k cytoplazmatické membráně. Aminoglykosidy jsou aktivně transportovány do buňky, kde narušují syntézu bílkovin ribozomy. Kolistin ničí buňku rozrušením cytoplazmatické membrány. Rezistence vůči aminoglykosidům a kolistinu je získána zvýšenou expresí genu kódujícího protein vnější membrány, který chrání lipopolysacharid před navázáním antibiotik [21].

2.2.4.2 Role vylučování

Systém pro vylučování toxických molekul je složen ze tří částí bílkovinného původu: pumpy v cytoplazmatické membráně, porinu ve vnější membráně a proteinu, který tyto dvě části spojuje. V *P. aeruginosa* byly nalezeny a popsány čtyři různé systémy pro vylučování antibiotik. Všechny třídy antibiotik, kromě polymyxinů, mohou být vyloučeny jedním nebo více způsoby. Geny kódující vylučovací systémy jsou přítomny ve všech kmenech *P. aeruginosa*, ale exprese není vysoká. Může být zvýšena mutací regulačních genů [21].

2.2.4.3 Inaktivace a modifikace antibiotik

P. aeruginosa dokáže produkovat enzymy schopné inaktivovat nebo pozměnit antibiotika. Všechny kmeny *P. aeruginosa* mají gen pro indukovatelnou chromozomální β -laktamázu. Zvýšená exprese tohoto genu je kromě indukce zapříčiněna také spontánní mutací regulačního genu např. po terapii ceftazidimem [21].

Ačkoli se β -laktamáza normálně nachází v periplazmě, po protipsedomonádové léčbě pacientů s cystickou fibrózou byla detekována i ve sputu. Tento extracelulární enzym byl nejspíše uvolněn lýzou mikroorganismů s vysokou produkcí enzymu v plicích. Tam snížil lokální koncentraci β -laktamátů a tak byly bakterie s nižší produkcí ochráněny [21].

P. aeruginosa produkuje další β -laktamázy, včetně širokého spektra plazmidových enzymů, jež jsou aktivní vůči penicilinům a cefalosporinům. Použití β -laktamázových inhibitorů chrání tato antibiotika před účinkem některých plazmidových enzymů, ne však před chromozomální β -laktamáзой. Nedávno byly zaznamenány už i enzymy rezistentní vůči β -laktamázovým inhibitorům [21].

Existují dva typy specifických karbapenemáz v *P. aeruginosa*, serinové a metaloenzymy [21].

Inaktivace aminoglykosidů se děje prostřednictvím enzymů přenášejících acetyl, fosfátové a adenylyl skupiny na amino- nebo hydroxylskupiny antibiotik. Tyto enzymy plazmidového původu používají cytoplazmatické kofaktory (acetylCoA nebo ATP) jako zdroj přenášených skupin. Na rozdíl od chromozomální β -laktamázy nedochází k nadprodukci těchto enzymů následkem spontánní mutace během terapie antibiotiky. Ale získání genu kódujícího tyto enzymy se děje plazmidovým přenosem [21].

2.2.4.4 Modifikace enzymů

Tento mechanismus rezistence je založen na mutaci genů kódujících enzymy tak, že získají rezistenci vůči inhibici antimikrobiálními látkami. Současně to však neovlivní jejich esenciální roli v buňce. U *P. aeruginosa* se toto stává nejčastěji u terapie chinolony mutací genu kódujícího podjednotku A DNA gyrázy. Změny ve struktuře 30S podjednotky ribozomu ovlivňují zase senzitivitu vůči streptomycinu a změny enzymů vážících peniciliny senzitivitu vůči β -laktamátům [21].

2.2.5 Shrnutí rezistenčních mechanismů v pseudomonádovém biofilmu

Na rezistenci biofilmu vůči antimikrobiálním agens se podílí již zmíněný alginátový glykokalyx a nízká permeabilita membrány. V hlubokých vrstvách biofilmu dochází také ke hromadění metabolitů a tím vzniká prostředí nepříznivé pro antimikrobiální látky. K rezistenci dále přispívá vysoká denzita buněk a vylučovací mechanismy. V buňkách mohou jako odpověď na stres nastat fyziologické změny, kdy jsou sníženy metabolické procesy

a indukován ochranný mechanismus. Také dochází k zapojení *quorum sensing* a podle toho ke změně vlastností bakterií. Některé buňky zapojují jako obranný mechanismus expresi inaktivačních enzymů, jiné expresi modifikovaných enzymů rezistentních vůči účinku antimikrobiálních látek. Celková rezistence je však výsledkem interakcí v rámci celé populace a terapie proto musí být zaměřena na mnohobuněčné společenstvo [21].

2.3 Dekontaminace

Přenos patogenních nebo potenciálně patogenních mikroorganismů z prostředí do lidského či zvířecího těla může zapříčinit vznik onemocnění. Je proto nutné tyto mikroorganismy z prostředí odstranit. Dekontaminace zahrnuje všechny cesty, které vedou k odstranění znečišťujících látek a organismů z ploch a předmětů, včetně usmrcení organismů. Podle výsledného stupně čistoty se dělí na mechanickou očistu, dezinfekci, dvoustupňovou dezinfekci, vyšší stupeň dezinfekce a sterilizaci. Sterilizace je proces, který vede k usmrcování všech mikroorganismů, včetně spór, k inaktivaci virů a usmrcení zdravotně významných červů a jejich vajíček. Dezinfekce je pak soubor opatření ke zneškodňování mikroorganismů pomocí fyzikálních, chemických nebo kombinovaných postupů, které mají přerušit cestu od zdroje k vnímavému jedinci. Vyšší stupeň dezinfekce jsou potom postupy, které zaručují usmrcení bakterií, virů, mikroskopických hub a některých bakteriálních spór. Nezaručují však usmrcení ostatních mikroorganismů (např. vysoce rezistentních spór) a vývojových stádií zdravotně významných červů a jejich vajíček. [16, 22]

V současnosti upravuje sterilizační a dezinfekční metody zákon č. 258/2000 Sb. o ochraně veřejného zdraví a o změně některých souvisejících zákonů v platném znění [22].

2.3.1 Fyzikální metody

Fyzikální postupy sterilizace a dezinfekce zahrnují tepelné metody (plamen, horký vzduch, páru pod tlakem, proudící páru, var, frakcionovanou sterilizaci, pasterizaci, tyndalizaci), záření (infračervené, ultrafialové, ionizační), nízkoteplotní plazma, filtraci a mechanickou očistu a úklid. V praxi se z fyzikálních postupů uplatňuje především působení tepla, méně často záření, filtrace a prostý úklid nebo omytí [16].

2.3.2 Chemické metody

K chemickým postupům sterilizace a dezinfekce se užívají dezinfekční látky (biocidy). Účinek nějaké látky může být mikrobicidní, pokud dochází k úplnému usmrcení mikroorganismů, nebo mikrobistatický, když způsobí jen zastavení růstu, rozmnožování a činnosti mikroorganismů.

Nejdůležitější skupiny dezinfekčních látek:

- oxidační činidla (peroxosloučeniny, ozon, peroxid vodíku, manganistan draselný, další peroxidy a persírany, superoxidovaná voda),
- halogeny (chlor a jeho deriváty, jodové přípravky, deriváty bromu a fluoru),
- alkylační činidla (ethylenoxid, formaldehyd, glutaraldehyd),
- cyklické sloučeniny (fenol a jeho deriváty, difenyly),
- alkálie a kyseliny (louhy, vápno, vápenné mléko, soda, kys. solná, sírová, octová),
- sloučeniny těžkých kovů (rtuť, stříbro, měď),
- alkoholy (ethanol, propanoly),
- povrchově aktivní látky (kvarterní amoniové sloučeniny),
- ostatní sloučeniny,
- kombinované látky [16].

Tab. 2.3.2 Mechanismus účinku biocidů [16]

biocid	mechanismus účinku	vliv na mikrobiální buňku
oxidační činidla, halogeny	oxidace SH-skupin v proteinech	inhibice enzymů, změna tvaru bílkovin
halogeny	halogenace aromatických aminokyselin	inhibice enzymů, změna tvaru bílkovin
alkylační činidla	alkylace NH ₂ -skupin v proteinech a nukleových kyselinách	inhibice enzymů a funkce nukleových kyselin
deriváty fenolu, alkoholy	denaturace bílkovin	inhibice enzymů, poškození membrán, koagulace cytoplazmy
silné kyseliny a louhy	hydrolýza bílkovin, zmýdelňování tuků	inhibice enzymů, rozpad membrán, koagulace cytoplazmy
těžké kovy	vazba na SH-skupiny, denaturace bílkovin	inhibice enzymů, koagulace cytoplazmy
tenzidy, chlorhexidin	vazba na obě složky fosfolipidů	poškození lipidů buněčných membrán
akridinová barviva	interkalace mezi páry bází	inhibice replikace DNA

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použitá média

3.1.1 TSA (Tryptone Soya Agar)

Živná půda obsahující enzymatický hydrolyzát kaseinu, sojový pepton, chlorid sodný a agar.

3.1.2 TSB (Tryptone Soya Broth)

Tekuté živné médium s pankreatickým kaseinovým hydrolyzátem, sojovým peptonem, chloridem sodným, hydrogenfosforečnanem draselným a dextrózou.

3.1.3 Neutralizátor

Směs enzymatického hydrolyzátu kaseinu, kvasničného extraktu, dextrózy, thiosíranu sodného, thioglykolanu sodného, lecitinu, polysorbátu a bromkresolové červeně. Po uplynutí časové expozice zastaví vliv dezinfekční látky na mikroorganismy.

3.1.4 Ředící voda

Roztok peptonu a chloridu sodného, používán jako ředící médium pro bakteriální suspenze a přípravu ředících řad.

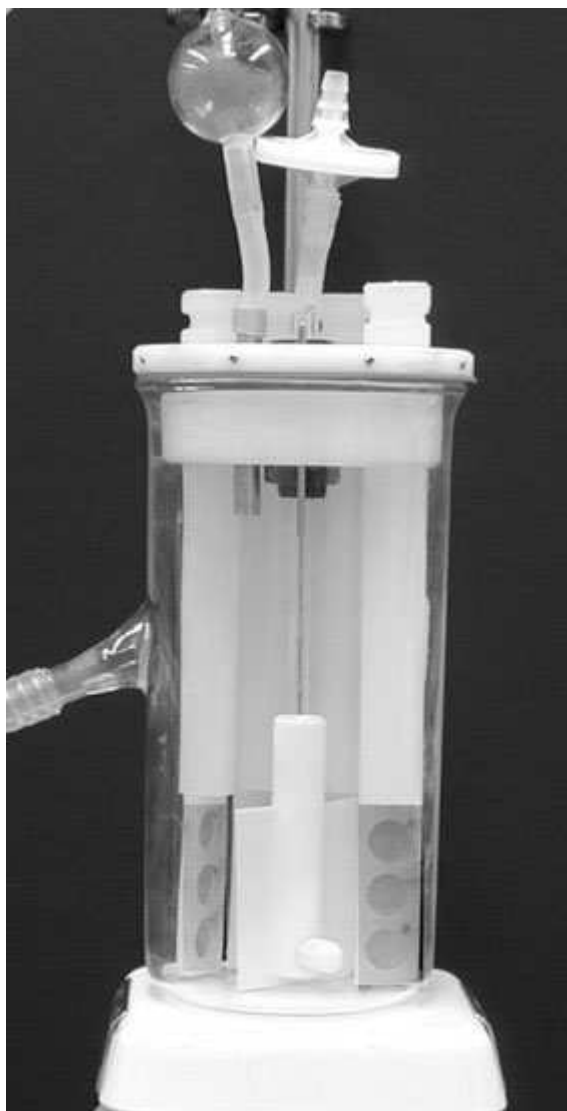
3.1.5 Fyziologický roztok

Roztok chloridu sodného, používá se jako fyziologický a ředící roztok pro bakteriální, kvasinkové a plísňové suspenze.

3.2 Přístroje a pomůcky

a) komponenty reaktoru

- i) *Berzelius Pyrex nádoba* – 1000 ml, průměr $9,5 \pm 0,5$ cm, ve výšce $400 \text{ ml} \pm 20 \text{ ml}$ opatřen vroubkovaným výtokem s $30\text{-}45^\circ$ sklonem, výtok je napojen na hadici s vnitřním $\varnothing 8 \text{ mm}$
- ii) *víko reaktoru* – UHMW polyethylenové se 3 otvory na 6-8 cm dlouhé trubičky z nerez oceli nebo jiného neohebného autoklávovatelného materiálu s vnějším $\varnothing 5\text{-}8 \text{ mm}$ pro přítok média, výměnu vzduchu a inokulaci. Uprostřed je otvor na skleněnou trubičku pro oporu míchadla. Ve víku je dále 8 děr pro tyče a okolo víka je gumové těsnění pro správné přilehnutí víka na nádobu
- iii) *polypropylenové tyče* – 8 polypropylenových tyčí, každá na 3 kupony. Dovnitř jsou po stranách zabudovány nerez šroubky na udržení kuponů na místě. Tyče zapadají do otvorů ve víku reaktoru
- iv) *polykarbonátové kupony* – poskytují povrch, na kterém roste biofilm. 24 cylindrických polykarbonátových kuponů s průměrem $1,27 \text{ cm}$ a tloušťkou 3 mm
- v) *míchadlo* – pro konstantní promíchávání. Teflonová destička zapadající do teflonového válce s otvorem na magnetickou kapsli. Teflonový válec zapadá do skleněné trubičky ve víku



Obr. 4 CDC biofilm reaktor [23]

- b) *přerušovač toku* – skleněný, který se hodí na hadici s vnitřním Ø 3 mm a bude sterilizovatelný. Vsunout vertikálně do přítokové hadice k prevenci kontaminace výživy a nádoby na výživu.
- c) *silikonové hadice* – 2 velikosti: jedna s vnitřním Ø 3 mm a druhá s vnitřním Ø 8 mm, sterilizovatelné. Použité k propojení nádoby na výživu a reaktoru, reaktoru s nádobou na odpadní médium a vzdušných filtrů s víky reaktoru a nádob
- d) *nádoby* – 20 l autoklávovatelné nádoby na médium a odpad
- e) *víka nádob* – každé s 2 otvory na hadice s vnitřním Ø 3 mm (větrání a přítok/odtok)
- f) *magnetická míchačka* – 100 – 400 RPM
- g) *pipeta* – 10 a 25 ml
- h) *automatická pipeta* – 100 – 1000 µl
- i) *analytické váhy*
- j) *předvážky*
- k) *vortex*
- l) *peristaltická pumpa*
- m) *pean*
- n) *bakteriologické očkovací kličky*
- o) *Pasteurovy pipety*

- p) *Bunsenův kahan* – na sterilizaci nástrojů
- q) *zkumavky s víčkem* – s objemem 10 ml
- r) *autokláv*
- s) *stojan a svorka na stojan* – na držení přerušovače toku a přítokové hadice s médiem vertikálně na reaktorem
- t) *Petriho misky* – Ø 90 mm, plastické, sterilní
- u) *vodní lázeň s třepačkou* – schopná udržet teplotu $37\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$
- v) *stopky*
- w) *chladnička s mrazničkou*
- x) *mrazák* – s teplotou $-80\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$
- y) *inkubátor* – s teplotou $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$

3.3 Interferující podmínky

- Bez podmínek
- Čisté (0,3 g/l bovinního albuminu)
- Nečisté (3 g/l bovinního albuminu s 3 ml/l praných ovčích erytrocytů)

3.4 Použité mikroorganismy

Pseudomonas aeruginosa ATCC 700888

Pseudomonas aeruginosa ATCC 15442

3.5 Testované dezinfekční přípravky

Testovací roztoky byly připraveny v tvrdé vodě.

3.5.1 Příprava tvrdé vody

Roztok A: bylo rozpuštěno 19,84 g bezvodého chloridu hořečnatého ve vodě a naředěno na 1000 ml. Roztok byl vysterilizován v autoklávu.

Roztok B: bylo rozpuštěno 35,02 g kyselého uhličitanu sodného ve vodě a naředěno na 1000 ml. Roztok byl sterilizován membránovou filtrací.

Pro přípravu 1 litru tvrdé vody bylo nalito 600 ml destilované vody do 1000 ml odměrné láhve a přidáno 6,0 ml roztoku A a pak 8,0 ml roztoku B. Baňka byla zamíchána a obsah byl doplněn po rysku. Hodnota pH tvrdé vody musí být $7,0 \pm 0,2$.

Tvrdá voda musí být vždy čerstvě připravená, příprava musí probíhat za sterilních podmínek.

Tab. 3.1 Koncentrace testovaných dezinfekčních přípravků

Č.	Zkušební konc. [%]	Koncentrace účinné látky ve zkušebních konc. [%]	Účinná látka
1	0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1	0,0025; 0,0125; 0,025; 0,125; 0,25	N-chlorbenzensulfonamid sodný (uvolňuje aktivní chlor)
2	0,8; 1	0,216; 0,27	kyselina peroctová (in situ)
3	50; 100	22,5 a 10; 45 a 20	ethanol, isopropanol,
4	0,25; 1	0,05; 0,2	kvarterní amoniové soli (KAS)

Tab. 3.2 Použití testovaných dezinfekčních přípravků

Č.	Deklarované účinnosti	Doporučené použití přípravku
1	baktericidní, fungicidní, virucidní, mykobaktericidní, tuberkulocidní	dezinfekce ve zdravotnictví a farmacii, v potravinářství a v oblasti komunální hygieny, v zemědělství a ve veterinární praxi, dezinfekce vod
2	baktericidní, fungicidní, virucidní, mykobaktericidní, tuberkulocidní sporicidní	mytí a dezinfekce zdravotnických pomůcek, operačního a anesteziologického instrumentária včetně endoskopů
3	baktericidní, fungicidní, virucidní, mykobaktericidní, tuberkulocidní	dezinfekce ploch a povrchů ve zdravotnictví
4	baktericidní, fungicidní, virucidní, mykobaktericidní, tuberkulocidní	k dezinfekci ploch ve zdravotnictví

3.6 Zkušební metody

3.6.1 Zkouška biocidní účinnosti vůči biofilmu

Pracovní postup přípravy biofilmu *Pseudomonas aeruginosa* vychází z normy ASTM E 2562 – 07 Standard Test Method for Quantification of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Grown with High Shear and Continuous Flow using CDC Biofilm Reactor [4] a z manuálu pro CDC biofilm reaktor [24]. Norma je platná od května 2007. Vyhodnocení výsledků je provedeno podle normy ČSN EN 13697 - Chemické dezinfekce a antiseptika – Kvantitativní test pro neporézní povrchy určený pro hodnocení baktericidního nebo fungicidního účinku chemických dezinfekčních přípravků používaných v potravinářství, průmyslu, domácnostech a kolektivních zařízeních – Metoda testování a požadavky bez mechanického působení (Fáze 2/ krok 2) [25]. Norma je platná od března 2002..

3.6.1.1 Příprava médií

- a) očkovací médium – bylo připraveno 100 ml TSB média o koncentraci 300 mg/l. Médium bylo vysterilizováno a naočkováno jedinou CFU *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 700888) z Petriho misky (PM) pomocí očkovací kličky. Bylo inkubováno 24 h při 37 °C ± 1 °C
- b) vsádkové kultivační médium – bylo připraveno a vysterilizováno 500 ml TSB o koncentraci 300 mg/l
- c) médium pro kontinuální fázi – bylo připraveno 20 l TSB o koncentraci 100 mg/l. Nejdříve bylo vysterilizováno 20 l vody a poté byl asepticky přidán koncentrovaný roztok (2 g TSB na 500 ml, sterilizovaný 20 min) tak, aby finální objem byl 20 l a finální koncentrace 100 mg/l

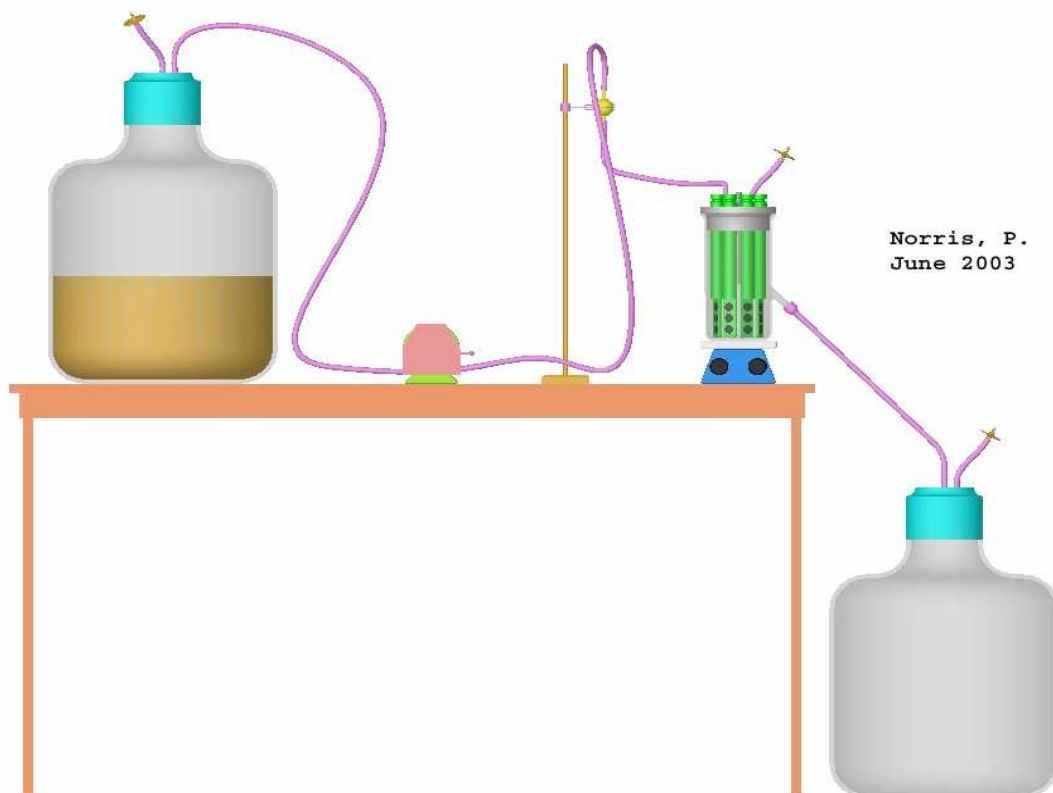
3.6.1.2 Příprava reaktoru

Kupony byly omyty mýdlem a opláchnuty vodou, poté byly na 2 h ponořeny v 2M HCl a následně opláchnuty v destilované vodě. Po uschnutí na vzduchu byly kupony umístěny do tyčí tak, aby byl vzorkovací povrch kuponu v jedné rovině s povrchem tyče, a byly utáhnuty šroubky.

Byl sestaven reaktorový systém (tyče, kupony, míchadlo, vzdušný filtr a hadice). Vzdušný filtr a přítoková hadice byly připojeny k neohebným trubičkám ve víku reaktoru. Po kontrole umístění na magnetické míchačce (míchadlo nesmělo zavadit o tyče) byla připojena výtoková hadice a otevřené konce hadic byly obaleny alobalem. Celý reaktorový systém byl vysterilizován.

3.6.1.3 Vsádková fáze

Reaktor byl umístěn magnetickou míchačkou a asepticky bylo přidáno 500 ml vsádkového kultivačního média. Plyny musely volně procházet skrz vzdušný filtr a výtoková trubice musela být uzavřena. Médium bylo asepticky naočkováno injikováním 1 ml předpřipraveného inokula (viz 3.6.1.1 a) skrz inokulační port ve víku reaktoru. Bylo puštěno míchadlo na 120 RPM a reaktor byl ponechán 24 h ve vsádkové fázi.



Obr. 5 Schéma zapojení CDC biofilm reaktoru [24]

3.6.1.4 Fáze kontinuálního průtoku

Hadice s výživou byla asepticky připojena k nádobě obsahující médium pro kontinuální průtok a odtoková hadice byla umístěna do odtokové nádoby a odsvorkována. Hadice s výživou byla připojena na peristaltickou pumpu a průtok byl nastaven na 2,5 ml/min (5 ml/min). Reaktor byl 24 h ponechán ve fázi kontinuálního průtoku.

3.6.1.5 Zkouška baktericidní aktivity vůči biofilmu

Bylo vypnuto míchání a peristaltická pumpa. Tyč byla vytažena rovně nahoru a stékající kapky byly zachyceny do sterilní Petriho misky. Pro určení denzity biofilmu byl biofilm ze tří kuponů na jedné tyči okamžitě seškrábán. Tyče určené ke zkoušení baktericidní aktivity byly ponořeny do roztoků dezinfekčních přípravků. Pro vodní kontrolu byla místo roztoku dezinfekčního přípravku použita tvrdá voda. Po uplynutí kontaktní doby byly tyče z roztoků dezinfekcí a tvrdé vody přemístěny do neutralizátoru. Po neutralizaci činidla byly tyče vytaženy a bylo provedeno vzorkování kuponů. Kupony byly uvolněny šroubovákem a uchopeny peanem. Očkovací kličkou byla seškrábána strana kuponu, která byla otočená k míchadlu. Při seškrábávání bylo nutno držet kličku kolmo k povrchu kuponu. Klička byla omyta ve zkumavce s 9 ml ředící vody. Seškrábání a omytí bylo 3-4krát zopakováno. Nakonec byl kupon opláchnut 1 ml sterilní ředící vody. Výsledný objem 10 ml byl zaznamenán jako seškrábaný objem (viz rovnice 1). Obsah zkumavek byl homogenizován. Disagregovaný biofilm byl naředěn podle standardních mikrobiologických technik. Každé ředění bylo vyočkováno po 1 ml vždy na 2 PM s TSA a misky byly inkubovány 24 h při $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

3.6.1.6 Vyhodnocení

Byly spočítány kolonie na miskách. Z duplikátů byly udělány průměry a podle následující rovnice byl vypočítán log denzity pro 1 kupon:

$$\log_{10}(CFU / cm^2) = \log_{10} \left[\frac{\text{prumer CFU / misku}}{\text{objem na misce}} \cdot \frac{\text{seškrábaný objem}}{\text{seškrábaný povrch}} \cdot \text{ředění} \right] \quad (1)$$

3.6.2 Kvantitativní test na nosičích pro zjištění baktericidní aktivity

Pracovní postup a hodnocení baktericidní účinnosti vychází z normy ČSN EN 13697 [25].

3.6.2.1 Příprava testovací bakteriální suspenze

Ze zásobní kultury *P. aeruginosa* na šikmém agaru byly bakteriologickou kličkou naočkovány PM s TSA. Misky byly kultivovány 24 hodin při $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$. Kolonie z PM byly seškrábány a kultura byla suspendována ve sterilním fyziologickém roztoku na denzitu 5. stupně MF zákalové stupnice, což je asi $10^8 - 10^9$ CFU / 1 ml. Z homogenizované suspenze byla připravena ředící řada na zjištění denzity suspenze. Vždy po 1 ml této suspenze bylo vyočkováno na 2 PM a zalito rozvařeným a vytemperovaným živným agarem. PM byly kultivovány 24 hodin při $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$. Byly spočítány kolonie na miskách a výpočtem byla získána denzita bakteriální suspenze.

3.6.2.2 Zkouška baktericidní účinnosti

Zkouška byla provedena kvantitativní metodou na nosičích. Všechna činidla byla vytemperována na pokojovou teplotu. Do zkumavky byl přenesen 1 ml bílkovinné zátěže a 1 ml bakteriální suspenze příslušné denzity. Směs byla promíchána. Poté bylo 0,05 ml této směsi přeneseno na nosič uložený na PM. Nosič byl sušen při $36\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, dokud nebyl suchý, ne déle než 60 minut. Poté byl převrstven 0,1 ml roztoku dezinfekčního přípravku o příslušné koncentraci. Pro vodní kontrolu bylo místo 0,1 ml roztoku dezinfekčního přípravku použito 0,1 ml tvrdé vody. Po uplynutí požadované zkušební doby byl nosič přenesen do 10 ml neutralizátoru společně s 5 g skleněných kuliček. Směs byla promíchána a poté ponechána 5 minut odstát. Po promíchání byl z PM odebrán 1 ml směsi a byla připravena ředící řada. Ze všech ředění bylo odebráno po 1 ml vždy na 2 PM a zalito agarem TSA, ochlazeným na $45\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$. Kultivace proběhla při $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ po dobu 24 h.

3.6.2.3 Vyhodnocení testu

Byly spočítány kolonie ze všech inkubovaných misek. Hodnoty N_0 a N_d , tedy počty CFU v kontrole s vodou a na nosičích s bakteriální suspenzí po vystavení působení dezinfekčního přípravku, byly stanoveny jako průměry počtu CFU vždy ze 2 Petriho misek po přepočtu na 1 ml.

Příklad: $N_{0(d)} = \frac{n_1 + n_2}{2} \cdot \frac{10}{d}$, kde d je ředící faktor

Poté byly obě hodnoty (N_0 a N_d) zlogaritmovány a byl získán rozdíl R těchto logaritmů.

$$R = \log N_0 - \log N_d$$

Je-li tato hodnota (R) větší než 4, znamená to, že přípravek redukoval titr mikroorganismů o více než 4 řádů a má tedy baktericidní účinek.

3.6.2.4 Požadavky dle normy

Baktericidní účinnost má podle normy ten přípravek, který je schopen při $18\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ až $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ po 5 minutách kontaktního času redukovat počet CFU daného mikroorganismu o více než 4 řády.

4 VÝSLEDKY

V diplomové práci byly testovány 4 dezinfekční přípravky s různými účinnými látkami. Byla ověřena jejich baktericidní účinnost vůči biofilmu *P. aeruginosa* ATCC 700888 a vůči planktonním buňkám *P. aeruginosa* ATCC 15442. Testování bylo provedeno dle normy ČSN EN 13697 [25]. Přípravky č. 2 – 4 byly otestovány ve dvou koncentracích. U přípravku č. 1 bylo vyzkoušeno šest koncentrací. Výsledky u jednoho přípravku jsou vždy rozděleny na čtyři podkapitoly: 1. a 2. se vztahují k testování biocidu vůči biofilmu, 3. je zaměřena na suspenzní test na nosičích a ve 4. podkapitole je provedeno porovnání.

4.1 Baktericidní účinnost dezinfekčního přípravku č. 1 s účinnou látkou N-chlorbenzensulfonamidem sodným

4.1.1 Baktericidní účinnost přípravku č. 1 v 0,01; 0,05 a 0,1% koncentraci proti biofilmu

Podmínky testování

- nastavení magnetické míchačky: teplota $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$
rychlost 120 RPM
- průtok peristaltického čerpadla: 5 ml/min
- teplota testování: $18\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ až $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$
- kontaktní čas: 15 min
- testované koncentrace: 0,01; 0,05 a 0,1%

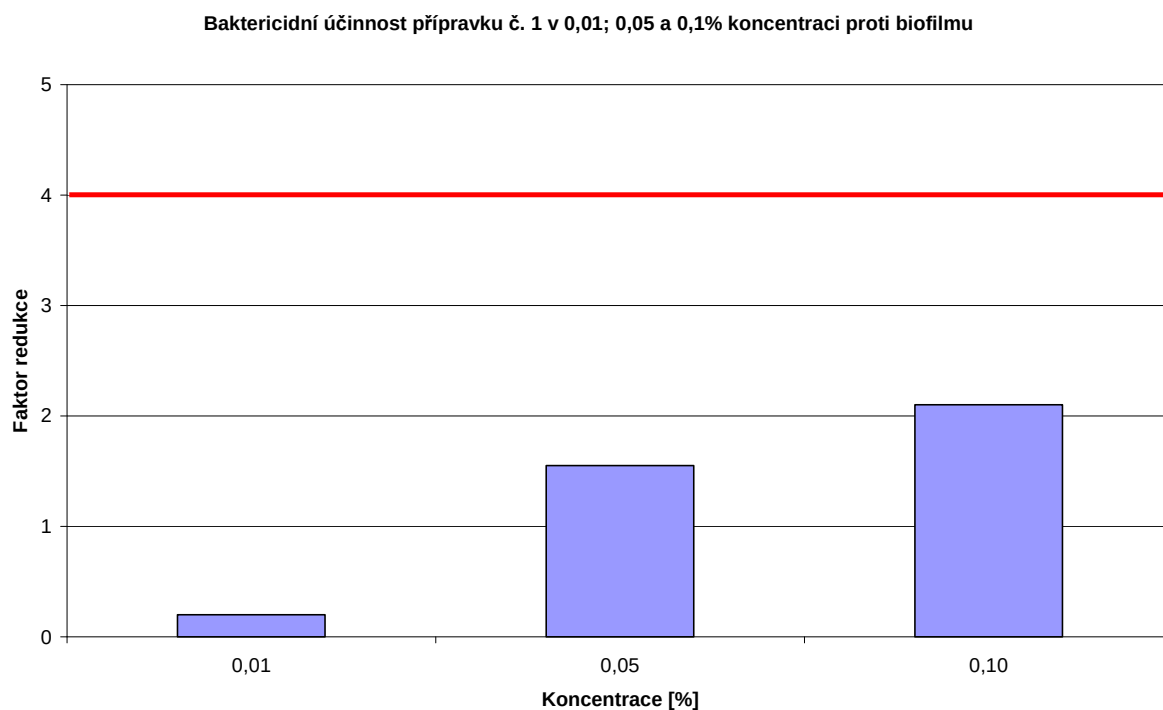
Tab. 4.1.1 Výsledky testování

Testovací organismus	Vodní kontrola N_0 [CFU/cm ²]	Test přípravku N_d (koncentrace v %/kontaktní čas v min) [CFU/cm ²]		
		0,01/15	0,05/15	0,1/15
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 700888	10^{-2} : >300, >300	10^{-2} : >300, >300	10^{-1} : >300, >300	10^{-1} : 158, 166
	10^{-3} : 199, 209	10^{-3} : 128, 134	10^{-2} : 55, 61	10^{-2} : 15, 17
	10^{-4} : 19, 22	10^{-4} : 12, 14	10^{-3} : 5, 6	10^{-3} : 1, 2
	10^{-5} : 2, 1	N_d : 6,01	N_d : 4,66	N_d : 4,11
	N_0 : 6,20	R: 0,19	R: 1,54	R: 2,09

Testovaný přípravek č. 1, ředěný v tvrdé vodě, v koncentracích 0,01; 0,05 a 0,1% a v čase působení 15 minut při teplotě $18\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ až $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ **neredukoval** biofilm *P. aeruginosa* o více než 4 řády (viz tabulka 4.1.1). Přípravek **neprokázal** baktericidní účinnost proti biofilmu za daných podmínek zkoušky.

V grafu 4.1.1 lze pozorovat, jak se zvyšující se koncentrací vzrůstá i faktor redukce dezinfekčního přípravku.

Graf 4.1.1 Baktericidní účinnosti přípravku č. 1 v 0,01; 0,05 a 0,1% koncentraci proti biofilmu



4.1.2 Baktericidní účinnost přípravku č. 1 v 0,1; 0,5 a 1% koncentraci proti biofilmu

Podmínky testování

- nastavení magnetické míchačky: teplota $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$
rychlost 120 RPM
- průtok peristaltického čerpadla: 5 ml/min
- teplota testování: $18\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ až $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$
- kontaktní čas: 30 min
- testované koncentrace: 0,1; 0,5 a 1%

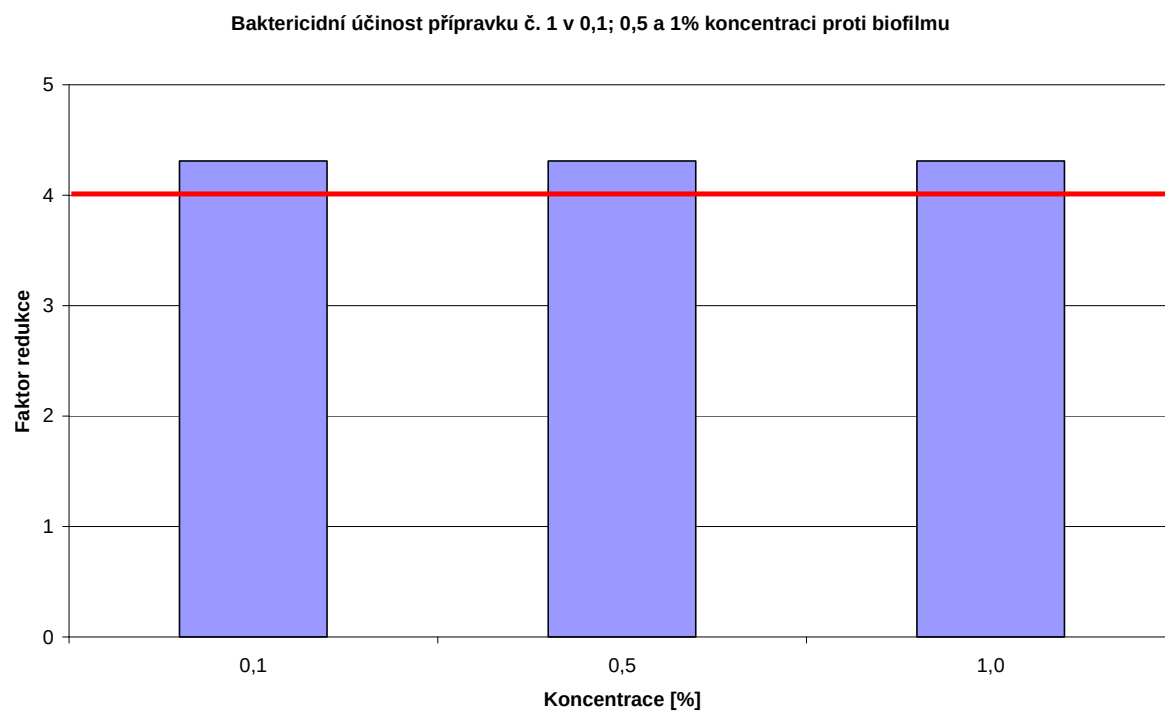
Tab. 4.1.2 Výsledky testování

Testovací organismus	Vodní kontrola N_0 [CFU/cm ²]	Test přípravku N_d (koncentrace v %/kontaktní čas v min) [CFU/cm ²]		
		0,1/30	0,5/30	1/30
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 700888	10^{-1} : >300, >300	10^0 : 0, 0	10^0 : 0, 0	10^0 : 0, 0
	10^{-2} : 257, 261	10^{-1} : 0, 0	10^{-1} : 0, 0	10^{-1} : 0, 0
	10^{-3} : 25, 27	10^{-2} : 0, 0	10^{-2} : 0, 0	10^{-2} : 0, 0
	10^{-4} : 2, 3	N_d : <1	N_d : <1	N_d : <1
	N_0 : 5,31	R: >4,31	R: >4,31	R: >4,31

Testovaný přípravek č. 1, ředěný v tvrdé vodě, v koncentracích 0,1; 0,5 a 1% a v čase působení 30 minut při teplotě $18\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ až $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ **redukoval** biofilm *P. aeruginosa* o více než 4 řády (viz tabulka 4.1.2). Přípravek **prokázal** baktericidní účinnost proti biofilmu za daných podmínek zkoušky.

Ze srovnání s grafem 4.1.1 je možné v grafu 4.1.2 pozorovat, že zvýšením koncentrace a prodloužením doby kontaktu byl dosažen faktor redukce nutný pro posouzení dezinfekčního prostředku jako baktericidně účinného.

Graf 4.1.2 Baktericidní účinnosti přípravku č. 1 v 0,1; 0,5 a 1% koncentraci proti biofilmu



4.1.3 Baktericidní účinnost přípravku č. 1 suspenzní metodou na nosičích

Podmínky testování

- teplota testování: $18\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ až $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$
- kontaktní čas: 30 min
- testovaná koncentrace: 1%
- interferující podmínky: nečisté

Tab. 4.1.3 Výsledky testování

Testovací organismus	Vodní kontrola N_0 [CFU/ml]	Test přípravku N_d (koncentrace v %/kontaktní čas v min/interferující podmínky) [CFU/ml]
		1/30/NP
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	10^{-3} : >300, >300 10^{-4} : 155, 129 10^{-5} : 14, 15 10^{-6} : 2, 0 N_0 : 7,15	10^0 : 0, 0 10^{-1} : 0, 0 10^{-2} : 0, 0 N_d : <1 R: >6,15

Testovaný přípravek č. 1, ředěný v tvrdé vodě, v 1% koncentraci a v čase působení 30 minut, za podmínek vyššího znečištění, při teplotě $18\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ až $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, metodou ředící neutralizační, **redukoval** na nosičích titr vegetativních forem bakterií *P. aeruginosa* více než o 4 řády (viz tabulka 4.1.3). Přípravek **prokázal** baktericidní účinnost za daných podmínek zkoušky.

4.1.4 Porovnání baktericidní účinnosti přípravku č. 1

Ze souhrnné tabulky 4.1.4 vyplývá, že přípravek č. 1 byl baktericidně účinný v 1% koncentraci po dobu 30 minut jak na planktonní buňky, tak na biofilm *P. aeruginosa*. Dále redukoval počty buněk v biofilmu na požadovanou úroveň ve stejném čase i v koncentraci 0,5% a 0,1%. Na bakterie v biofilmu neúčinkoval v čase 15 minut v koncentracích 0,01%; 0,05% a 0,1%.

Tab. 4.1.4 Souhrnná tabulka baktericidní účinnosti přípravku č. 1

Mikroorganismus	Konc. [%]	Kontaktní čas [min]	Podmínky	Baktericidní účinnost
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 700888	0,01	15	bez podmínek	ne
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 700888	0,05	15	bez podmínek	ne
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 700888	0,1	15	bez podmínek	ne
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 700888	0,1	30	bez podmínek	ano
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 700888	0,5	30	bez podmínek	ano
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 700888	1	30	bez podmínek	ano
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	1	30	nečisté	ano

4.2 Baktericidní účinnost dezinfekčního přípravku č. 2 s účinnou látkou kyselinou peroctovou

4.2.1 Baktericidní účinnost přípravku č. 2 v 0,8% koncentraci proti biofilmu

Podmínky testování

- nastavení magnetické míchačky: teplota $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$
rychlost 120 RPM
- průtok peristaltického čerpadla: 2,5 ml/min
- teplota testování: $18\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ až $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$
- kontaktní čas: 15 min
- testovaná koncentrace: 0,8%

Tab. 4.2.1 Výsledky testování

Testovací organismus	Vodní kontrola N_0 [CFU/cm ²]	Test přípravku N_d (koncentrace v %/kontaktní čas v min) [CFU/cm ²]
		0,8/15
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 700888	10^{-2} : >300, >300 10^{-3} : 124, 134 10^{-4} : 12, 14 10^{-5} : 0,1 N_0 : 6,01	10^{-1} : >300, >300 10^{-2} : 131, 137 10^{-3} : 13, 14 N_d : 5,02 R: 0,99

Testovaný přípravek č. 2, ředěný v tvrdé vodě, v 0,8% koncentraci a v čase působení 15 minut při teplotě $18\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ až $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ **neredukoval** biofilm *P. aeruginosa* o více než 4 řády (viz tabulka 4.2.1). Přípravek **neprokázal** baktericidní účinnost proti biofilmu za daných podmínek zkoušky.

4.2.2 Baktericidní účinnost přípravku č. 2 v 1% koncentraci proti biofilmu

Podmínky testování

- nastavení magnetické míchačky: teplota $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$
rychlost 120 RPM
- průtok peristaltického čerpadla: 2,5 ml/min
- teplota testování: $18\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ až $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$
- kontaktní čas: 5 min
- testovaná koncentrace: 1%

Tab. 4.2.2 Výsledky testování

Testovací organismus	Vodní kontrola N_0 [CFU/cm ²]	Test přípravku N_d (koncentrace v %/kontaktní čas v min) [CFU/cm ²]
		1/5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 700888	10^{-2} : >300, >300 10^{-3} : >300, >300 10^{-4} : 49, 57 10^{-5} : 4,7 N_0 : 6,62	10^{-1} : 109, 115 10^{-2} : 10, 12 10^{-3} : 0, 1 N_d : 3,95 R: 2,67

Testovaný přípravek č. 2, ředěný v tvrdé vodě, v 1% koncentraci a v čase působení 5 minut při teplotě $18\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ až $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ **neredukoval** biofilm *P. aeruginosa* o více než 4 řády (viz tabulka 4.2.2). Přípravek **neprokázal** baktericidní účinnost proti biofilmu za daných podmínek zkoušky.

4.2.3 Baktericidní účinnost přípravku č. 2 suspenzní metodou na nosičích

Podmínky testování

- teplota testování: $18\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ až $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$
- kontaktní čas: 15 min
- testovaná koncentrace: 0,8%
- interferující podmínky: čisté i nečisté

Tab. 4.2.3 Výsledky testování

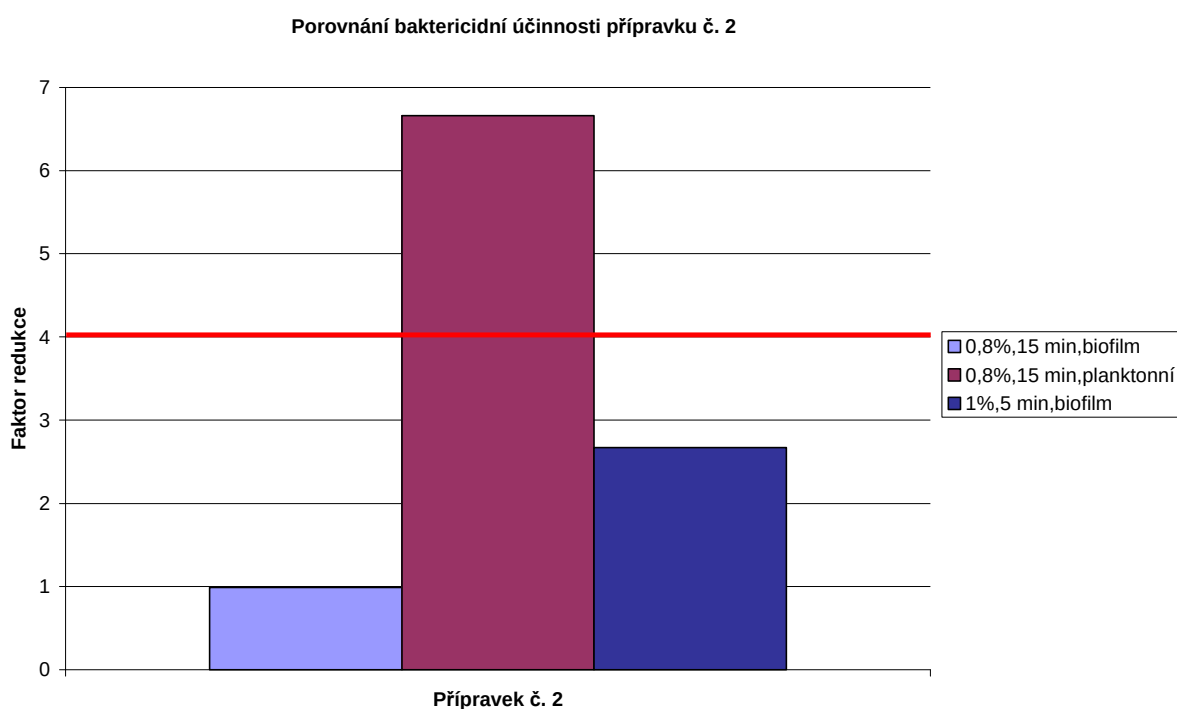
Testovací organismus	Vodní kontrola N_0 [CFU/ml]	Test přípravku N_d (koncentrace v %/kontaktní čas v min/interferující podmínky) [CFU/ml]	
		0,8/15/ČP	0,8/15/NP
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	10^{-3} : >300, >300 10^{-4} : >300, >300 10^{-5} : 42, 50 10^{-6} : 4, 5 N_0 : 7,66	10^0 : 0, 0 10^{-1} : 0, 0 10^{-2} : 0, 0 N_d : <1 R: >6,66	10^0 : 0, 0 10^{-1} : 0, 0 10^{-2} : 0, 0 N_d : <1 R: >6,66

Testovaný přípravek č. 2, ředěný v tvrdé vodě, v 0,8% koncentraci a v čase působení 15 minut, za podmínek vyššího znečištění, při teplotě $18\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ až $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, metodou ředící neutralizační, **redukoval** na nosičích titr vegetativních forem bakterií *P. aeruginosa* více než o 4 řády (viz tabulka 4.2.3). Přípravek **prokázal** baktericidní účinnost za daných podmínek zkoušky.

4.2.4 Porovnání baktericidní účinnosti přípravku č. 2

V grafu 4.2.4 lze vidět, že přípravek č. 2 účinkoval na planktonní buňky, zatímco na bakterie v biofilmu ne. Podmínky normy pro baktericidní účinnost sice nesplnil, ale z grafu je možné vypočítat, že se zvýšenou koncentrací vzroste i faktor redukce. Takže je pravděpodobné, že pokud bychom ještě zvýšili koncentraci, baktericidní účinnosti by bylo dosaženo. V tabulce 4.2.4 je potom provedeno souhrnné shrnutí, tj. za jakých podmínek přípravek účinkoval a za jakých ne.

Graf 4.2.4 Porovnání baktericidní účinnosti přípravku č. 2



Tab. 4.2.4 Souhrnná tabulka baktericidní účinnosti přípravku č. 2

Mikroorganismus	Konc. [%]	Kontaktní čas [min]	Podmínky	Baktericidní účinnost
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 700888	0,8	15	bez podmínek	ne
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 700888	1	5	bez podmínek	ne
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	0,8	15	čisté	ano
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	0,8	15	nečisté	ano

4.3 Baktericidní účinnost dezinfekčního přípravku č. 3 s účinnými látkami ethanolem a isopropanolem

4.3.1 Baktericidní účinnost přípravku č. 3 v 50% koncentraci proti biofilmu

Podmínky testování

- nastavení magnetické míchačky: teplota $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$
rychlost 120 RPM
- průtok peristaltického čerpadla: 2,5 ml/min
- teplota testování: $18\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ až $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$
- kontaktní čas: 5 min
- testovaná koncentrace: 50%

Tab. 4.3.1 Výsledky testování

Testovací organismus	Vodní kontrola N_0 [CFU/cm ²]	Test přípravku N_d (koncentrace v %/kontaktní čas v min) [CFU/cm ²]
		50/5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 700888	10^{-2} : >300, >300 10^{-3} : 124, 134 10^{-4} : 12, 14 10^{-5} : 0,1 N_0 : 6,01	10^0 : 43, 49 10^{-1} : 4, 5 10^{-2} : 0,0 N_d : 2,56 R: 3,45

Testovaný přípravek č. 3, ředěný v tvrdé vodě, v 50% koncentraci a v čase působení 5 minut při teplotě $18\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ až $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ **neredukoval** biofilm *P. aeruginosa* o více než 4 řády (viz tabulka 4.3.1). Přípravek **neprokázal** baktericidní účinnost proti biofilmu za daných podmínek zkoušky.

4.3.2 Baktericidní účinnost přípravku č. 3 v 100% koncentraci proti biofilmu

Podmínky testování

- nastavení magnetické míchačky: teplota $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$
rychlost 120 RPM
- průtok peristaltického čerpadla: 2,5 ml/min
- teplota testování: $18\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ až $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$
- kontaktní čas: 5 min
- testovaná koncentrace: 100%

Tab. 4.3.2 Výsledky testování

Testovací organismus	Vodní kontrola N_0 [CFU/cm ²]	Test přípravku N_d (koncentrace v %/kontaktní čas v min) [CFU/cm ²]
		1/5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 700888	10^{-2} : >300, >300 10^{-3} : >300, >300 10^{-4} : 49, 57 10^{-5} : 4, 7 N_0 : 6,62	10^0 : 0, 0 10^{-1} : 0, 0 10^{-2} : 0, 0 N_d : <1 R: >6,62

Testovaný přípravek č. 3, ředěný v tvrdé vodě, ve 100% koncentraci a v čase působení 5 minut při teplotě $18\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ až $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ **redukoval** biofilm *P. aeruginosa* o více než 4 řády (viz tabulka 4.3.2). Přípravek **prokázal** baktericidní účinnost proti biofilmu za daných podmínek zkoušky.

4.3.3 Baktericidní účinnost přípravku č. 3 suspenzní metodou na nosičích

Podmínky testování

- teplota testování: $18\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ až $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$
- kontaktní čas: 5 min
- testovaná koncentrace: 100%
- interferující podmínky: nečisté

Tab. 4.3.3 Výsledky testování

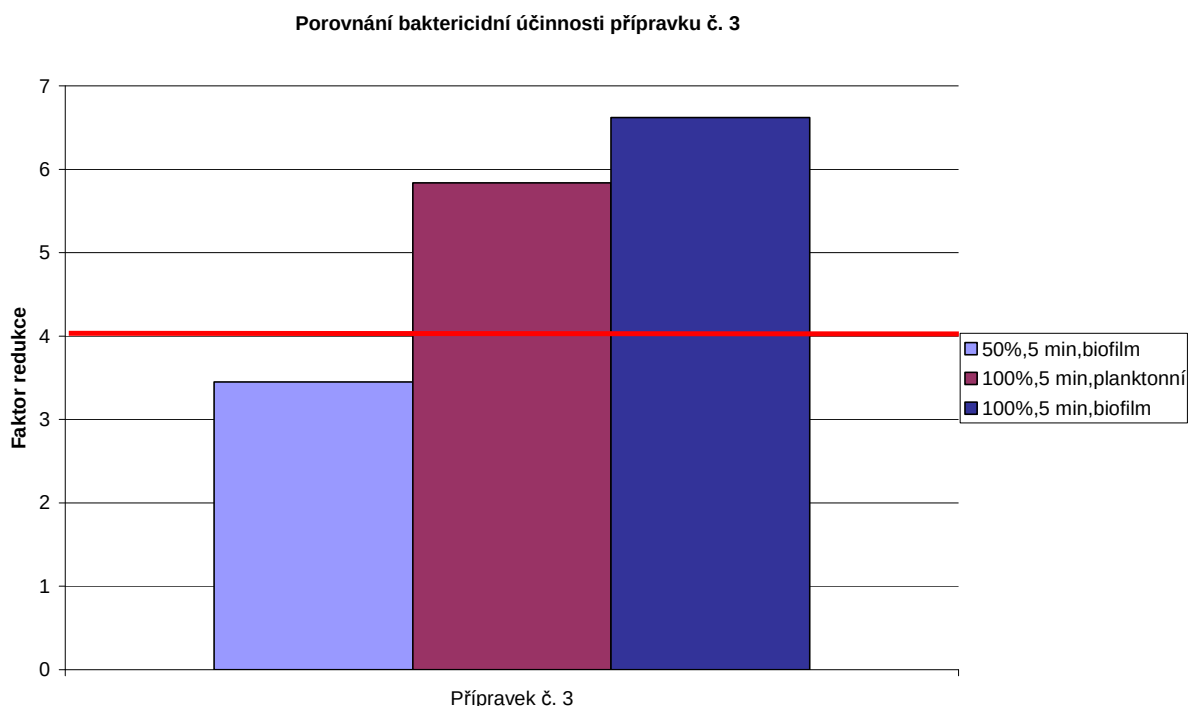
Testovací organismus	Vodní kontrola N_0 [CFU/ml]	Test přípravku N_d (koncentrace v %/kontaktní čas v min/interferující podmínky) [CFU/ml]		
		100/0,5/NP	100/1/NP	100/5/NP
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	10^{-3} : >300, >300 10^{-4} : 74, 65 10^{-5} : 8, 5 10^{-6} : 0, 0 N_0 : 6,84	10^0 : 0, 0 10^{-1} : 0, 0 10^{-2} : 0, 0 N_d : <1 R: >5,84	10^0 : 0, 0 10^{-1} : 0, 0 10^{-2} : 0, 0 N_d : <1 R: >5,84	10^0 : 0, 0 10^{-1} : 0, 0 10^{-2} : 0, 0 N_d : <1 R: >5,84

Testovaný přípravek č. 3, ředěný v tvrdé vodě, ve 100% koncentraci a v časech působení 0,5; 1 a 5 minut, za podmínek vyššího znečištění, při teplotě $18\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ až $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, metodou ředící neutralizační, **redukoval** na nosičích titr vegetativních forem bakterií *P. aeruginosa* více než o 4 řády (viz tabulka 4.3.3). Přípravek **prokázal** baktericidní účinnost za daných podmínek zkoušky.

4.3.4 Porovnání baktericidní účinnosti přípravku č. 3

Z grafu 4.3.4 lze vypočítat účinnost přípravku č. 3. Ten ve 100% koncentraci redukoval počty buněk v suspenzním testu na nosičích i v biofilmu. V koncentraci 50% pak dosáhl faktoru redukce téměř 3,5 řádu. V tabulce 4.3.4 je shrnutí všech podmínek, za kterých byl přípravek účinný nebo neúčinný.

Graf 4.3.4 Porovnání baktericidní účinnosti přípravku č. 3



Tab. 4.3.4 Souhrnná tabulka baktericidní účinnosti přípravku č. 3

Mikroorganismus	Konc. [%]	Kontaktní čas [min]	Podmínky	Baktericidní účinnost
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 700888	50	5	bez podmínek	ne
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 700888	100	5	bez podmínek	ano
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	100	0,5	nečisté	ano
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	100	1	nečisté	ano
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	100	5	nečisté	ano

4.4 Baktericidní účinnost přípravku č. 4 s účinnými látkami KAS

4.4.1 Baktericidní účinnost přípravku č. 4 v 0,25% koncentraci proti biofilmu

Podmínky testování

- nastavení magnetické míchačky: teplota $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$
rychlost 120 RPM
- průtok peristaltického čerpadla: 2,5 ml/min
- teplota testování: $18\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ až $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$
- kontaktní čas: 5 min
- testovaná koncentrace: 0,25%

Tab. 4.4.1 Výsledky testování

Testovací organismus	Vodní kontrola N_0 [CFU/cm ²]	Test přípravku N_d (koncentrace v %/kontaktní čas v min) [CFU/cm ²]
		0,25/5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 700888	10^{-2} : >300, >300 10^{-3} : >300, >300 10^{-4} : 49, 57 10^{-5} : 4,7 N_0 : 6,62	10^{-1} : >300, >300 10^{-2} : 71, 77 10^{-3} : 6, 8 N_d : 4,77 R: 1,85

Testovaný přípravek č. 4, ředěný v tvrdé vodě, v 0,25% koncentraci a v čase působení 5 minut při teplotě $18\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ až $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ **neredukoval** biofilm *P. aeruginosa* o více než 4 řády (viz tabulka 4.4.1). Přípravek **neprokázal** baktericidní účinnost proti biofilmu za daných podmínek zkoušky.

4.4.2 Baktericidní účinnost přípravku č. 4 v 1% koncentraci proti biofilmu

Podmínky testování

- nastavení magnetické míchačky: teplota $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$
rychlost 120 RPM
- průtok peristaltického čerpadla: 2,5 ml/min
- teplota testování: $18\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ až $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$
- kontaktní čas: 5 min
- testovaná koncentrace: 1%

Tab. 4.4.2 Výsledky testování

Testovací organismus	Vodní kontrola N_0 [CFU/cm ²]	Test přípravku N_d (koncentrace v %/kontaktní čas v min) [CFU/cm ²]
		1/5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 700888	10^{-2} : >300, >300 10^{-3} : 124, 134 10^{-4} : 12, 14 10^{-5} : 0,1 N_0 : 6,01	10^0 : >300, >300 10^{-1} : 177, 180 10^{-2} : 17, 19 N_d : 4,15 R: 1,86

Testovaný přípravek č. 4, ředěný v tvrdé vodě, v 1% koncentraci v čase působení 5 minut při teplotě $18\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ až $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ **neredukoval** biofilm *P. aeruginosa* o více než 4 řády (viz tabulka 4.4.2). Přípravek **neprokázal** baktericidní účinnost proti biofilmu za daných podmínek zkoušky.

4.4.3 Baktericidní účinnost přípravku č. 4 suspenzní metodou na nosičích

Podmínky testování

- teplota testování: $18\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ až $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$
- kontaktní čas: 5 min
- testovaná koncentrace: 0,25%
- interferující podmínky: nečisté

Tab. 4.4.3 Výsledky testování

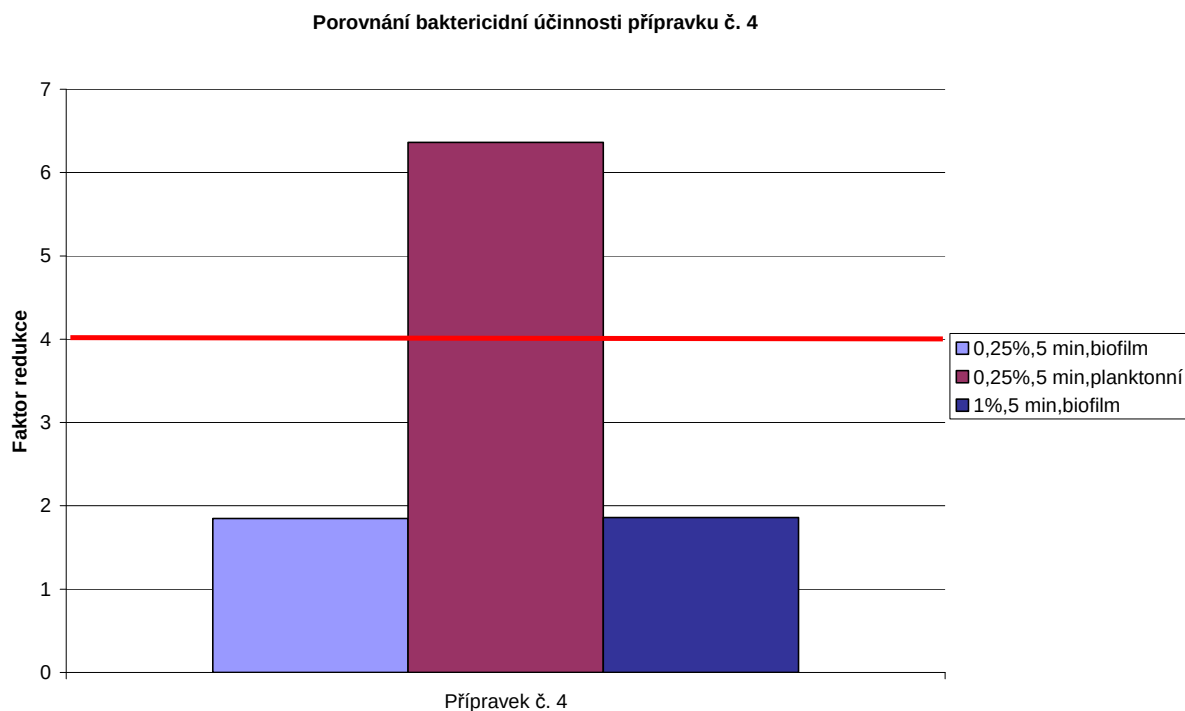
Testovací organismus	Vodní kontrola N_0 [CFU/ml]	Test přípravku N_d (koncentrace v %/kontaktní čas v min/interferující podmínky) [CFU/ml]
		0,25/5/NP
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	10^{-3} : >300, >300 10^{-4} : 221, 237 10^{-5} : 24, 23 10^{-6} : 2, 2 N_0 : 7,36	10^0 : 0, 0 10^{-1} : 0, 0 10^{-2} : 0, 0 N_d : <1 R: >6,36

Testovaný přípravek č. 4, ředěný v tvrdé vodě, v 0,25% koncentraci a v čase působení 5 minut, za podmínek vyššího znečištění, při teplotě $18\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ až $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, metodou ředící neutralizační, **redukoval** na nosičích titr vegetativních forem bakterií *P. aeruginosa* více než o 4 řády (viz tabulka 4.4.3). Přípravek **prokázal** baktericidní účinnost za daných podmínek zkoušky.

4.4.4 Porovnání baktericidní účinnosti přípravku č. 4

Jak lze vidět z grafu 4.4.4 přípravek č. 4 byl účinný jen na planktonní buňky *P. aeruginosa*, vůči bakteriím v biofilmu byl neúčinný. Ani zvýšením koncentrace nedošlo k signifikantnímu nárůstu faktoru redukce. Shrnutí účinnosti přípravku č. 4 je potom provedeno v tabulce 4.4.4.

Graf 4.4.4 Porovnání baktericidní účinnosti přípravku č. 4



Tab. 4.4.4 Souhrnná tabulka baktericidní účinnosti přípravku č. 4

Mikroorganismus	Konc. [%]	Kontaktní čas [min]	Podmínky	Baktericidní účinnost
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 700888	0,25	5	bez podmínek	ne
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 700888	1	5	bez podmínek	ne
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	0,25	5	nečisté	ano

5 DISKUZE

Pseudomonas aeruginosa je podle každoroční zprávy Evropského centra pro prevenci a kontrolu onemocnění z roku 2008 třetím nejčastějším patogenem způsobujícím nosokomiální infekce. Až jedna pětina izolátů invazivní *P. aeruginosa* byla rezistentní vůči třem a více antibiotikům. Přitom 20 – 30 % nosokomiálních infekcí by se dalo předejít prevencí [15]. Jedním z hlavních zdrojů *P. aeruginosa* jsou lékařské pomůcky a zařízení jako např. endoskopy, dýchací přístroje a katétry. Proto je výběr vhodného způsobu dezinfekce těchto předmětů jedním ze stěžejních prvků prevence.

Baktericidní účinnost monochloraminu vůči biofilmu byla zkoumána ve studii [26] z roku 1995. Biofilm *P. aeruginosa* a *K. pneumoniae* vykázal pokles o 1,3 logaritmického řádu po vystavení účinku monochloraminu v koncentraci 2 mg/l na 2 hodiny. Dále byl účinek chloraminu podroben zkoumání ve studii [27] z roku 2008, kde srovnávali účinky chloru, stříbra a tobramycinu na buňky *P. aeruginosa* jak v suspenzi, tak v biofilmu. Nejúčinnějším činidlem redukujícím počty planktonních buněk byl dle očekávání chlor. U redukce bakterií v biofilmu se výsledky všech 3 činidel vzájemně příliš nelišily. Pro pokles buněk v biofilmu o 1 řád bylo nutné působit činidlem o koncentraci 10 mg/l nejméně 30 min. V mé práci přípravek č. 1 založený na chloraminové bázi redukoval počty CFU v biofilmu o 1,5 řádu při koncentraci 500 mg/l a kontaktním čase 15 min. Srovnáním s výsledky výše zmíněných studií se dá předpokládat, že zvýšením kontaktního času bych získala vyšší faktor redukce buněk *P. aeruginosa* v biofilmu. V americké studii [28] z roku 1997 byl biofilm *P. aeruginosa* vystavován různým koncentracím monochloraminu na různou kontaktní dobu. Tito vědci zjistili, že při dlouhodobém nebo opakovaném ošetření biofilmu chloraminem dochází k adaptaci. Bakterie v biofilmu zvýší svou schopnost neutralizovat činidlo a stanou se vůči němu méně citlivými.

Belgičtí badatelé [29] testovali účinnost biocidů na biofilm *P. aeruginosa* a *S. aureus*. Dospěli k závěru, že kyselina peroctová byla nejúčinnějším činidlem redukujícím biomasu *P. aeruginosa* od 1. minuty kontaktní doby. Ale co se týče redukce matrix, byly účinnějšími látkami peroxid vodíku a chlornan sodný. V jiné studii [30] bylo zjištěno, že roztok kyseliny peroctové zabraňuje tvorbě biofilmu v hemodializačním přístroji. V mé práci přípravek č. 2 na bázi kyseliny peroctové redukoval počty *P. aeruginosa* v biofilmu už v 1% koncentraci po dobu 5 minut o více než 2,5 logaritmického řádu. Koncentrace kyseliny peroctové v 1% roztoku přípravku byla 0,27 %. Zvýšením koncentrace tohoto biocidu by jistě bylo dosaženo vyššího faktoru redukce a tedy i naplnění podmínek normy pro baktericidní účinnost.

V belgické studii [29] byl vůči biofilmu také zkoumán účinek isopropanolu, který pro 99,999% redukci bakterií *P. aeruginosa* potřeboval kontaktní čas nejméně 30 minut. Japonští vědci [31] testovali 45 kmenů *P. aeruginosa* izolovaných ze švábů odchycených v nemocnicích. Zkoumali schopnost těchto kmenů tvořit biofilm a míru rezistence vůči dezinfekčním prostředkům. Jednou ze zkoušených látek byl ethanol. Oproti faktoru redukce pro buňky v suspenzi, byl faktor redukce ethanolu vůči biofilmu pouze 60%. V jiné studii z roku 2009 [32] 60% ethanol zničil během 20 minut biofilm *P. aeruginosa*, který měl původně denzitu $10^5 - 10^8$ CFU. V mé práci tomu odpovídají výsledky u přípravku č. 3, kdy v 50% koncentraci byl faktor redukce téměř 3,5 řádu a v koncentraci 100% inaktivoval kompletně buňky *P. aeruginosa* v biofilmu už během 5 minut.

Baktericidní aktivita kvarterních amoniových solí byla testována ve studii [33] z roku 2008. Kombinací různých biocidů a kationtů kovů byl objeven synergický efekt kvarterních amoniových látek a měďnatých iontů. V jiné studii [34] byla pozorována rezistence biofilmu vůči 6 zkoušeným kvarterním amoniovým látkám. Čím delší byl uhlíkový řetězec, tím nižší baktericidní aktivita. Neoptimálnější účinnost měla látka s C12 řetězcem.

Podobné výsledky vypovídající o nepříliš vysoké baktericidní aktivitě kvarterních amoniových vůči biofilmu jsem pozorovala i ve svém experimentu. Ani s vyšší koncentrací se účinnost KAS na buňky biofilmu nezměnila.

6 ZÁVĚR

Srovnáním výsledků baktericidní účinnosti dezinfekčních přípravků bylo ověřeno, že biofilm je vůči biocidům odolnější než planktonní buňky. Všechny dezinfekční přípravky byly účinné vůči buňkám v suspenzním testu na nosičích, vůči biofilmu tomu však bylo jinak. Dezinfekční přípravek č. 1 s účinnou látkou N-chlorbenzensulfonamidem sodným prokázal baktericidní účinnost vůči biofilmu *Pseudomonas aeruginosa* už od koncentrace 0,1 % a kontaktního času 30 minut. V nižších koncentracích a kontaktním čase 15 minut byl přípravek č. 1 na biofilmové buňky neúčinný. Přípravek č. 2, který generuje kyselinu peroctovou in situ, ani v 1% koncentraci neredukoval počty bakterií v biofilmu na požadovanou úroveň. Přípravek č. 3 založený na alkoholové bázi prokázal baktericidní účinnost vůči biofilmu ve 100% koncentraci a dokonce i v 50% koncentraci redukoval počty bakterií v biofilmu o více než 3 řády. Schopnost přípravku č. 4 s účinnými látkami KAS redukovat počty buněk v biofilmu se ani se zvýšenou koncentrací příliš nezměnila. Přípravek č. 4 tak neprokázal baktericidní účinnost.

Cílem práce bylo najít dezinfekční přípravky s baktericidní účinností i vůči biofilmu. Nejúčinnějším přípravkem se vzhledem ke zkoušeným koncentracím jeví přípravek č. 1 založený na chloraminové bázi. Přípravku č. 2 by nejspíše stačila jen zvýšená koncentrace, protože už v 1% koncentraci redukoval počty buněk v biofilmu o více než 2 řády. Přípravek č. 3 účinkoval pouze ve vysokých koncentracích. Naopak přípravek č. 4 baktericidní účinnost vůči biofilmu neprokázal. V dalším zkoumání by měly být vyzkoušeny přípravky s jinými účinnými látkami v koncentraci vyšší než v jaké účinkují na planktonní buňky.

SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] DUNNE, Jr., W. M. Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately? *Clinical Microbiology Reviews*, April 2002, vol. 15, no. 2, p. 155–166.
- [2] ZOBELL, C. E. The effect of solid surfaces on bacterial activity. *Journal of Bacteriology*, 1943, vol. 46, no. 1, p. 39–56.
- [3] DONLAN, R. M. – COSTERTON, J. W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, April 2002, vol. 15, no. 2, p. 167–193.
- [4] ASTM E 2562 – 07. Standard Test Method for Quantification of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Grown with High Shear and Continuous Flow using CDC Biofilm Reactor. ASTM International, April 2007, p. 1–6.
- [5] HABASH, M. – REID, G. Microbial Biofilms: Their Development and Significance for Medical Device-Related Infections. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 1999, vol. 39, p. 887–898.
- [6] HERRMANN, M. et al. Fibronectin, fibrinogen, and laminin act as mediators of adherence of clinical staphylococcal isolates to foreign material. *The Journal of Infectious Diseases*, 1988, vol. 158, p. 693–701.
- [7] MILLER, M. B. – BASSLER, B. L. Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology*, October 2001, vol. 55, p. 165–199.
- [8] FARBER, B. F. et al. *Staphylococcus epidermidis* extracted slime inhibits the antimicrobial action of glycopeptide antibiotics *The Journal of Infectious Diseases*. 1990, vol. 161, p. 37–40.
- [9] SOULI, M. – H. GIAMARELLOU. Effects of slime produced by clinical isolates of coagulase-negative staphylococci on activities of various antimicrobial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1998, vol. 42, p. 939–941.
- [10] EVANS, D. J. et al. Effect of growth-rate on resistance of gram-negative biofilms to ceftrimide. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1990, vol. 26, p. 473–478.
- [11] DUGUID, I. G. et al. Growthrate-dependent killing by ciprofloxacin of biofilm-derived *Staphylococcus epidermidis*; evidence for cell-cycle dependency. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1990, vol. 30, p. 791–802.
- [12] ANWAR, H. et al. Dynamic interactions of biofilms of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* with tobramycin and piperacillin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1992, vol. 36, p. 1208–1214.

[13] ANWAR, H. et al. Eradication of biofilm cells of *Staphylococcus aureus* with tobramycin and cephalexin. *Canadian Journal of Microbiology*, 1992, vol. 38, p. 618–625.

[14] European Centre for Disease Prevention and Control: *Annual Epidemiological Report on Communicable Diseases in Europe 2008* [online]. Stockholm, European Centre for Disease Prevention and Control, 2008. [cit. 3. 5. 2010]

Dostupné z:

<http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0812_SUR_Annual_Epidemiological_Report_2008.pdf>

[15] BRYERS, J. D. Medical biofilms. *Biotechnology and Bioengineering*, 1. 5. 2008, vol. 100, no. 1, p. 1–18.

[16] VOTAVA, M. a kol. *Lékařská mikrobiologie pro zubní lékaře*. Brno: Neptun 2007. 567 s. ISBN 978-80-86850-03-0

[17] VOTAVA, M. a kol. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun 2003. 495 s. ISBN 80-902896-6-5

[18] KRAMER, A. et al. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? *BMC Infectious Diseases*, 2006, vol. 6, no. 130, p. 1–8.

[19] DAVIES, D. G. et al. Exopolysaccharide production in biofilms: substratum activation of alginate gene expression by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, vol. 59, p. 1181–1186.

[20] DAVIES, D. G. – GEESEY, G. G. Regulation of the alginate biosynthesis gene *algC* in *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm development in continuous culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, vol. 61, p. 860–867.

[21] LAMBERT, P. A. Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 2002, vol. 95, no. 41, p. 22–26.

[22] platné znění zákona č. 258/2000 Sb., o ochraně veřejného zdraví a o změně některých souvisejících zákonů

[23] GOERES, D. M. et al. Statistical assessment of a laboratory method for growing biofilms. *Microbiology*, 2005, vol. 151, p. 757–762.

[24] CENTER FOR BIOFILM ENGINEERING For BioSurface Technologies, Inc. *CDC Biofilm Reactor – Operator's Manual*.

- [25] ČSN EN 13697 - Chemické dezinfekce a antiseptika – Kvantitativní test pro neporézní povrchy určený pro hodnocení baktericidního nebo fungicidního účinku chemických dezinfekčních přípravků používaných v potravinářství, průmyslu, domácnostech a kolektivních zařízeních – Metoda testování a požadavky bez mechanického působení (Fáze 2/ krok 2). Brusel: CEN, 2001, 29 s.
- [26] HUANG, CH.–T. et al. Nonuniform spatial patterns of respiratory activity within biofilms during disinfection. *Applied and Environmental Microbiology*, June 1995, vol. 61, no. 6, p. 2252–2256.
- [27] KIM, J. et al. Comparison of the antimicrobial effects of chlorine, silver ion, and tobramycin on biofilm. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, April 2008, vol. 52, no. 4, p. 1446–1453.
- [28] SANDERSON, S. S. – STEWART, P. S. Evidence of bacterial adaptation to monochloramine in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms and evaluation of bioxide action model. *Biotechnology and Bioengineering*, 20. 10. 1997, vol. 56, no. 2, p. 201–209.
- [29] TOTÉ, K. et al. Inhibitory effect of biocides on viable mass and matrix of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 2. 4. 2010.
- [30] CAPPELLI, G. et al. Effects of biofilm formation on haemodialysis monitor disinfection. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2003, vol. 18, p. 2105–2111.
- [31] SAITOU, K. et al. Biofilm formation abilities and disinfectant-resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cockroaches captured in hospitals. *Biocontrol Science*, June 2009, vol. 14, no. 2, p. 65–68.
- [32] BALESTRINO, D. et al. Eradication of microorganisms embedded in biofilm by an ethanol-based catheter lock solution. *Nephrology Dialysis Transplantation*, October 2009, vol. 24, no. 10, p. 3204–3209.
- [33] HARRISON, J. J. et al. Copper and quarternary ammonium cations exert synergistic bactericidal and antibiofilm activity against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, August 2008, vol. 52, no. 8, p. 2870–2881.
- [34] CAMPANAC, C. et al. Interactions between biocide cationic agents and bacterial biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, May 2002, vol. 46, no. 5, p. 1469–1474.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

CF	cystická fibróza
CFU	kolonie tvořící jednotky (colony forming units)
ČP	čisté podmínky (podmínky nižšího znečištění)
KAS	kvarterní amoniové soli
N_0	počet CFU v kontrole s vodou
N_d	počet CFU v suspenzi po vystavení účinku dezinfekčního přípravku
NP	nečisté podmínky (podmínky vyššího znečištění)
PM	Petriho miska
R	faktor redukce (rozdíl logaritmů N_0 a N_d)
RPM	otáčky za minutu (revolutions per minute)
TSA	agar se sojovým peptonem (tryptone soya agar)
TSB	tekuté medium se sojovým peptonem (tryptone soya broth)