

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zdravotně sociální fakulta

Dekontaminace velkoobjemových prostor

diplomová práce

Autor práce: Bc. Radek BURDA
Studijní program: Ochrana obyvatelstva
Studijní obor: Civilní nouzová připravenost

Vedoucí práce: Ing. Karel Bílek, Ph.D.

Datum odevzdání práce: 14. 8. 2013

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to – v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne (datum)

.....

(jméno a příjmení)

Poděkování

Rád bych vyjádřil poděkování vedoucímu své práce Ing. Karlu Bílkovi, Ph. D. za vedení diplomové práce, za veškerou pomoc a osobní přístup. Dále děkuji pracovníkům SÚJCHBO, v. v. i. Ing. Haně Placákové za spolupráci na testech, Mgr. Haně Andělové a Mgr. Jiřině Procházkové, Ph. D. za překlad.

ABSTRAKT

Dnešní doba s sebou přináší mnoho potencionálních zdrojů rizik odvíjejících se ať už od činnosti člověka či nepřízně počasí, které mohou mít za následek kontaminaci nejrůznějších prostor nebo přírodního prostředí. Tato práce se zabývá dekontaminací biologických agens, jež v sobě zahrnuje širokou škálu postupů a metod, počínaje prostým úklidem a konče dezinfekcí popř. sterilizací. Do současné doby byla navržena a do praxe zavedena celá řada dekontaminačních technik, sloužících k likvidaci biologických agens z kontaminovaných povrchů. Na trhu se vyskytuje několik ověřených dezinfekčních přípravků, nicméně jejich účinnost je testována v laboratorních podmínkách. Účinnost dezinfekčních prostředků je dána zavedením závazných mezinárodních a národních norem, které jsou úzce zaměřené na jednu analýzu, popisují provedení, hodnocení a požadavky. V případě dekontaminace velkoobjemových prostor, jako jsou například operační sály, laboratoře nebo veřejné prostory, je hodnocení dekontaminace dle daných norem relativně problematické.

V úvodu diplomové práce byly vymezeny následující cíle:

- zpracovat aktuální literární přehled k dané problematice se zaměřením na mikrobiální kontaminaci,
- navrhnout a vybrat vhodné dekontaminační přípravky pro dekontaminaci velkoobjemových prostor tj. laboratoří, nemocničních prostor hal apod.,
- vybrané přípravky a způsoby dekontaminace experimentálně ověřit.

Teoretická část práce byla rozdělena do pěti hlavních kapitol. První kapitola obecně definuje pojem kontaminace, který bezprostředně souvisí s dekontaminací. Druhá kapitola je zaměřena na mikrobiální kontaminaci, definuje původce infekčních onemocnění, mechanismy šíření biologických agens a nejpravděpodobněji zneužitelné původce onemocnění. Třetí kapitola teoretické části je zaměřena na samotnou dekontaminaci. Definuje obecně dekontaminaci se zaměřením na mikrobiální dekontaminaci, kterou se rozumí odstraňování biologických agens z povrchů a prostředí. V této kapitole jsou zpracovány způsoby dekontaminace, které lze v podstatě

rozdělit do dvou základních skupin, a to na fyzikální a chemické postupy. Další kapitola této části práce definuje vybrané platné normy popisující různé typy zkoušek pro hodnocení účinnosti dezinfekčních přípravků. Poslední kapitola teoretické části se zabývá velkoobjemovými prostory, definuje je a popisuje experimentální prostory Pracoviště velkoobjemového zkušebnictví v areálu Státního ústavu jaderné, chemické a biologické ochrany, v. v. i.

Cílem této práce bylo vytvořit vlastní metodiku testování účinnosti dekontaminačních přípravků, kde byl kladen důraz na simulaci reálných podmínek. Analýzou vhodnosti způsobů dekontaminace pro tento účel bylo vytipováno několik možných způsobů. Jednalo se o dekontaminaci prováděnou použitím generátoru aerosolu, dekontaminaci odparem, dekontaminaci manuálním rozprašovačem a dekontaminaci motorovým rozprašovačem. Na základě analýzy výrobcem udávaných dezinfekčních účinků bylo vybráno několik přípravků pro dekontaminaci velkoobjemových prostor. Pro tuto práci byly vybrány dezinfekční prostředky ChiroSan® Plus, Incidin OxyDes, Kohrsolin® FF, Korsolex® basic, Persteril® 36 a Sanosil® Super 25 Ag. Účinnost dekontaminačních prostředků na mikroorganismy byla experimentálně testována v prostorech o objemu 30, 60 a 120 m³. Za testované B-agens byly zvoleny *Bacillus anthracis*, *Bacillus atrophaeus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus pneumoniae*. S přihlédnutím k platným normám byly vytvořeny tři způsoby ověření účinku dekontaminace. Jednalo se o modifikovaný povrchový test, modifikovaný suspenzní test a agarový test.

Na základě vymezených cílů práce byly stanoveny následující výzkumné otázky:

- Existují vhodné způsoby dekontaminace velkoobjemových prostor?
- Je dekontaminace odparem využitelná pro dekontaminaci velkoobjemových prostor?
- Je aerosolizace dekontaminačních přípravků využitelná pro dekontaminaci velkoobjemových prostor?

Analýzou vhodnosti použitých způsobů dekontaminace bylo zjištěno, že existují vhodné způsoby dekontaminace velkoobjemových prostor. Pro tuto práci se osvědčila

dekontaminace za použití manuálního a motorového rozprašovače. Avšak pro prostory nad objem cca 30 m³ je z časového hlediska vhodnější použít motorový rozprašovač.

Z důvodu neúčinnosti byla dekontaminace odparem shledána jako nevhodná pro dekontaminaci velkoobjemových prostor.

Pro dekontaminaci velkoobjemových prostor je vhodné použít rozprašovače produkující aerosol, tento způsob je tedy využitelný. Každopádně je třeba upozornit na skutečnost, že záleží na správné volbě dekontaminačního přípravku. Baktericidní schopnost testovaných přípravků byla na vysoké úrovni u všech testovaných přípravků. Dostatečná sporicidní aktivita byla prokázána jen u přípravků Korsolex® basic a Persteril® 36 a to na shodné úrovni. Nevýhodou Persterilu® 36 je jeho značná korozivní aktivita a to i na nerez, naopak jeho použití je cenově výhodné. Přípravek Korsolex® basic obsahuje inhibitory koroze, ale jeho cenová výhodnost je nižší.

Z provedených testů účinnosti dekontaminačních přípravků vyplynulo, že pro dekontaminaci velkoobjemových prostor je nejvhodnější použití manuálního rozprašovače do 30 m³ a motorového rozprašovače za předpokladu větších prostor. Z testovaných přípravků jsou pro Pracoviště velkoobjemového zkušebnictví SÚJCHBO, v. v. i. použitelné jen přípravky Persteril® 36 a Korsolex® basic s přihlédnutím k výše uvedeným výhodám a nevýhodám.

Klíčová slova: dekontaminace, velkoobjemové prostory, B-agens, mikrobiální kontaminace

ABSTRACT

The human acting and inclemency of the weather can have the negative impact on the environment and can result in its contamination. This thesis is focused on biological agent decontamination, covering various procedures and methods starting from basic cleaning up to disinfection or sterilisation. Many techniques of surface decontamination used for the biological agent elimination have been introduced so far. There are several verified disinfecting preparations on the market available. However, their efficiency have been tested mainly in the laboratory conditions. The efficiency of disinfectants is determined by the obligatory international and national standards. These standards are focused on the particular analysis and describe performance, evaluation and requirements. In case of the large-scale facility decontamination, such as operating rooms, laboratories or public areas, is the evaluation of decontamination according to these standards questionable.

The aims of this thesis were:

- To work out the bibliographic overview of given issue with the focus on the microbial contamination.
- Design and choose appropriate decontaminating preparations for the large-scale facility decontamination e.g. laboratories, medical rooms and halls, etc.
- Experimental verification of selected preparations and methods of decontaminations.

The theoretical part of the thesis is divided in the five main chapters. First chapter generally defines the term “contamination”, which is closely related to the decontamination. Second chapter is focused on the microbial contamination, defines infectious agents, the mechanisms of its spread and points out microbes most likely to be misused as a biological weapon. Third chapter of the theoretical part addresses the decontamination itself. It defines the decontamination in general aiming for microbial decontamination, i.e. the biological agent surface and environment removal. Two basic groups of decontamination e.g. physical and chemical procedures are mentioned in this

chapter. Fourth chapter presents valid standards describing various types of examinations for the disinfecting preparations efficacy evaluation. The last chapter of the theoretical part covers large-scale facilities, defines them and describes experimental facilities at the Department of large-scale testing in the National institute for nuclear, chemical and biological protection in Kamenna.

The aim of the thesis is to create own methodology of the disinfectant efficiency testing with emphasis on the real condition simulation. The decontamination was carried out by means of following methods: aerosol generator method, decontamination by evaporation, manual sprayer and engine sprayer respectively. For the analysis we chose these disinfectants: ChiroSan® Plus, Incidin OxyDes, Kohrsolin® FF, Korsolex® basic, Persteril® 36 and Sanosil® Super 25 Ag. The disinfectant efficiency was tested in 30, 60 and 120 m³ facilities. The tested B-agents were: *Bacillus anthracis*, *Bacillus atrophaeus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae*. For the decontamination efficiency verification we used a modified surface assay, a modified suspension assay and an agarose assay.

The following issues were of concern:

- Are there convenient techniques of the large-scale facility decontamination?
- Is the decontamination by evaporation usable for the large-scale facility decontamination?
- Is the spraying of disinfectants exploitable for the large-scale facility decontamination?

We found out that, based on the analysis of different techniques of decontamination, the large-scale facility decontamination is feasible. The most effective method of decontamination appears the manual and engine spraying with the latter more convenient for spaces over the 30 m³ in the matter of time.

The decontamination by evaporation was inefficient for the large-scale facility decontamination.

Experiments revealed that method based on aerosol distribution is convenient for large-scale facility decontamination. However, the nature of decontaminating preparation has to be considered. All disinfectants tested have shown good bactericidal activity. Nevertheless, only Korsolex® basic a Persteril® 36 have shown sufficient sporicidal activity with equal effect. The disadvantage of the preparation Persteril® 36 is its significant corrosive activity, on the other hand is inexpensive. The preparation Korsolex® basic contains anticorrosive compounds, but is more expensive than Persteril® 36.

Our results demonstrated that the most convenient method for the decontamination of facilities up to the 30 m³ is the manual aerosol sprayer. For facilities of larger volume the engine sprayer decontamination is more convenient.

From the preparations tested, only Korsolex® basic a Persteril® 36 are, with respect to advantages and disadvantages, usable in the Department of large-scale testing in the National institute for nuclear, chemical and biological protection in Kamenna.

Key words: decontamination, large-scale facility, B-agens, microbial contamination

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	12
ÚVOD.....	13
1 TEORETICKÁ ČÁST	15
1.1 Kontaminace.....	15
1.2 Mikrobiální kontaminace.....	15
1.2.1 Původci infekčních onemocnění.....	16
1.2.2 Mechanizmy šíření biologických agens	19
1.2.3 Nejpravděpodobněji zneužitelní biologičtí původci a onemocnění.....	21
1.2.4 Metody laboratorní detekce	24
1.3 Dekontaminace	26
1.3.1 Fyzikální postupy dezinfekce a sterilizace	27
1.3.1.1 Teplo.....	27
1.3.1.2 Záření a vlnění.....	29
1.3.1.3 Plazma	30
1.3.1.4 Filtrace	30
1.3.1.5 Úklid a mechanická očista.....	31
1.3.2 Chemické postupy dezinfekce a sterilizace	31
1.3.2.1 Oxidační činidla.....	33
1.3.2.2 Halogeny.....	35
1.3.2.3 Alkylační činidla.....	36
1.3.2.4 Cyklické sloučeniny	37
1.3.2.5 Alkálie a kyseliny	39
1.3.2.6 Sloučeniny těžkých kovů.....	40
1.3.2.7 Alkoholy	41
1.3.2.8 Povrchově aktivní látky	41
1.3.2.9 Ostatní látky.....	42
1.3.2.10 Kombinované přípravky	42
1.4 Normy popisující účinnost dekontaminačních přípravků.....	43
1.4.1 Hodnocení dekontaminace dle norem	43
1.4.2 Reálné podmínky	45
1.5 Velkoobjemové prostory	45
1.5.1 Dekontaminace velkoobjemových prostor	46

1.5.2	Popis experimentálních laboratoří	47
2	VÝZKUMNÉ OTÁZKY A METODIKA VÝZKUMU	49
2.1	Výzkumné otázky	49
2.2	Metodika výzkumu	49
2.2.1	Způsoby aplikace dekontaminačních přípravků	49
2.2.2	Testované dekontaminační přípravky.....	50
2.2.3	Experimentální prostory	56
2.2.4	Testované B-agens a jejich kultivační podmínky.....	58
2.2.5	Příprava B-agens a stanovení počtu v bakteriální suspenzi pro testy.....	59
2.2.6	Metodika testování účinnosti dezinfekčních prostředků – modifikovaný povrchový test (upraveno dle ČSN EN 13697 a ČSN EN 14347)	60
2.2.7	Metodika testování účinnosti dezinfekčních prostředků – modifikovaný suspenzní test (upraveno dle ČSN EN 1276).....	62
2.2.8	Metodika testování účinnosti dezinfekčních prostředků – agarový test.....	63
3	VÝSLEDKY	64
3.1	Analýza vhodnosti použitých způsobů dekontaminace.....	64
3.1.1	Dekontaminace za použití generátoru aerosolu.....	64
3.1.2	Dekontaminace odparem	64
3.1.3	Dekontaminace manuálním rozprašovačem.....	65
3.1.4	Dekontaminace motorovým rozprašovačem	65
3.2	Testování účinnosti dezinfekčních prostředků na vybraných bakteriích.....	66
3.2.1	Testovaný mikroorganismus: <i>B. anthracis</i>	69
3.2.2	Testovaný mikroorganismus: <i>B. atrophaeus</i>	70
3.2.3	Testovaný mikroorganismus: <i>Escherichia coli</i>	71
3.2.4	Testovaný mikroorganismus: <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	72
3.2.5	Testovaný mikroorganismus: <i>Streptococcus pneumoniae</i>	73
4	DISKUZE	74
4.1.1	Zvolené způsoby aplikace dekontaminačních roztoků.....	74
4.1.2	Dekontaminační přípravky	75
4.1.3	Použitá metodika testování a hodnocení dekontaminační účinnosti	77
5	ZÁVĚR.....	79
6	SEZNAM INFORMAČNÍCH ZDROJŮ.....	80
7	SEZNAM ILUSTRACÍ.....	85
8	SEZNAM TABULEK	86

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ATP	Intracelulární adenosintrifosfát
B-agens	Biologické agens
BBL	Bojová biologická látka
BSL	Biosafety level
CBRN	Chemical, Biological, Radiological and Nuclear
CDC Atlanta	Centers for Disease Control and Prevention
ČSN EN	Převzatá evropská norma
ČSN	Česká státní norma
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
GMO	Geneticky modifikované organismy
KAS	Kvarterní amoniové sloučeniny
MML	Mobilní laboratoře
NATO	North Atlantic Treaty Organization
PAA	Kyselina peroxyoctová
PCR	Polymerová řetězová reakce
pH	Vodíkový exponent
ppm	Parts per million
RNA	Ribonukleová kyselina
STANAG	Standardization Agreement
SÚJCHBO, v. v. i.	Státní ústav jaderné, chemické a biologické ochrany, v. v. i.
TBC	Tuberkulóza
TSA	Trypton-sojový agar
ÚTZ	Úroveň technického zabezpečení
UV-zářen	Ultrafialové záření
VZ	Velkoobjemové zkušebnictví

ÚVOD

Odborná aplikace dekontaminačních látek a postupů se začala objevovat zhruba před 150 lety, avšak empirické praktikování se objevuje již mnohem dříve. Prvotní zmínky lze nalézt v Bibli, v dílech řeckého básníka Homéra, filozofa Aristotela aj. Za klíčový milník v oblasti dekontaminace lze označit rok 1438, kdy byl v Benátkách založen Magistrát zdravotnictví, jehož hlavní funkcí bylo provádění fumigace nákladů přivážených do přístavu. Vznikem této instituce byl položen základ prevence a aktivní ochrany proti nejrůznějším infekčním onemocněním, parazitům a jiným možným znečištěním. Za další milník této problematiky lze považovat 20. století, které znamenalo zásadní pokroky v oblasti chemie, především organické, což vedlo k objevu celé řady nových chemických dezinfekčních látek, směřovaných na nejrůznější odvětví či oblasti lidské činnosti.

Obecně lze kontaminaci rozdělit na chemickou, biologickou a radiologickou. Prostředí může být kontaminováno úmyslně například použitím nebezpečných látek při teroristickém útoku, či neúmyslně zapříčiněním vzniku nějaké havárie nebo následkem přírodní katastrofy. Avšak nastane-li již takováto situace, která má za příčinu únik kontaminantu do prostředí, je nutné provést jeho eliminaci na přijatelnou úroveň právě již zmíněnou dekontaminací.

Tato práce se zabývá především dekontaminací biologických agens, jež v sobě zahrnuje širokou škálu postupů a metod, počínaje prostým úklidem a konče dezinfekcí popř. sterilizací. Do současné doby byla navržena a do praxe zavedena celá řada dekontaminačních technik, sloužících k likvidaci biologických agens z kontaminovaných povrchů. Na trhu se vyskytuje několik ověřených dezinfekčních přípravků, nicméně jejich účinnost je testována v laboratorních podmínkách. Účinnost dezinfekčních prostředků je dána zavedením závazných mezinárodních a národních norem, které jsou úzce zaměřené na jednu analýzu, popisují provedení, hodnocení a požadavky. Jelikož se tato práce zabývá dekontaminací velkoobjemových prostor, jako jsou například operační sály, laboratoře nebo veřejné prostory jako např. nádraží, kina či školy, je hodnocení dekontaminace dle daných norem relativně problematické.

Práce si proto kladla za cíl vybrat vhodné dekontaminační techniky pro velkoobjemové prostory a prověřit účinnost vybraných dezinfekčních prostředků

v podmínkách blížících se reálnému prostředí. Pro potřeby této práce byl vybrán prostor nejprve kontaminován mikroorganismy a následně byla provedena dekontaminace. Výsledky dekontaminační účinnosti byly vyhodnoceny standardními mikrobiologickými metodami. Výsledky této práce budou využity při tvorbě standardních operačních postupů dekontaminace velkoobjemových prostor Státního ústavu jaderné, chemické a biologické ochrany, v. v. i.

Cílem této práce bylo:

- zpracovat aktuální literární přehled k dané problematice se zaměřením na mikrobiální kontaminaci,
- navrhnout a vybrat vhodné dekontaminační přípravky pro dekontaminaci velkoobjemových prostor tj. laboratoří, nemocničních prostor hal apod.,
- vybrané přípravky a způsoby dekontaminace experimentálně ověřit.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Kontaminace

Jelikož je tato práce zaměřena na dekontaminaci, je víc než vhodné vymezit nejdříve pojem samotné kontaminace. Z odborného hlediska, lze pojem kontaminace definovat jako znečištění životního prostředí, osob, zvířat, techniky, potravin, krmiv, budov apod. škodlivými látkami. Pod škodlivými látkami si můžeme představit látky chemického, biologického a radiologického původu, které nazýváme pojmem CBRN agens (z ang. Chemical, Biological, Radiological and Nuclear). Jako ekvivalentní výraz k pojmu kontaminace je zamoření. V moderní době je tento výraz však již méně používán.

CBRN agens mohou ve velké míře kontaminovat prostředí únikem při haváriích, vojenském použití a využitím teroristy při teroristických útocích. Škodlivé látky mohou kontaminovat povrchy ve formě par, aerosolů, dýmů, mlh, kapek a ve větších množstvích i ve formě kapalin či pevných látek. V nebezpečí zasažení CBRN agens jsou především osoby v bezprostřední blízkosti místa úniku či havárie nebo útoku a osoby podílející se na záchranných a likvidačních pracích (1).

1.2 Mikrobiální kontaminace

Mikroorganismy nalezneme všude v životním prostředí, kde se nachází alespoň malé stopy vlhkosti. Působení mikroorganismů jsme neustále vystaveni, avšak většina těchto agens není schopna vyvolat nemoci, mj. i proto, že jako vyšší forma organismu vlastníme přirozený obranný mechanismus (2).

Setkáváme se však také s mikroorganismy, které jsou schopny tento obranný systém překonat, vniknout do organismu hostitele, rozmnožit se v něm a vyvolat onemocnění nebo smrt (3). Aby se tyto mikroorganismy mohly uplatnit jako biologická agens, musí být pro člověka resp. organismus tzv. patogenní, tedy schopné vniknout do organismu a vyvolat onemocnění. Onemocnění vyvolané tímto patogenem pak nazýváme infekcí.

Nicméně vzhledem ke skutečnosti, že práce byla cíleně řešena pro potřeby Státního ústavu jaderné, chemické a biologické ochrany veřejné výzkumné instituce (dále jen SÚJCHBO, v. v. i.) resp. pro biologickou sekci tohoto ústavu je práce zaměřena na biologickou kontaminaci.

1.2.1 Původci infekčních onemocnění

Vzhledem k zaměření Laboratoře biologického monitorování a ochrany SÚJCHBO, v. v. i. lze B-agens zařadit např. dle níže uvedeného rozdělení. Jedná se o B-agens s vlastnostmi, jež je předurčují k použití jako bojové biologické látky (dále jen BBL).

Původci infekčních onemocnění mohou být rozděleny do šesti základních skupin:

- bakterie
- rickettsie
- viry
- plísňe (houby)
- toxiny

- geneticky modifikované organismy (2)

Bakterie

Bakterie jsou nejmenší jednobuněčné prokaryotní (předjaderné) živé organizmy o velikosti v rozmezí od 0,1 do 10 μm podle tvaru, schopné reprodukce. Tvoří koky, diplokoky, tyčky, vlákna nebo mají spirálovitý tvar. Rozmnožují se přímým dělením, kde rychlost dělení závisí na dostupnosti živin (4). U lidí a zvířat mohou vyvolat onemocnění přímým napadnutím tkání, ve kterých se značně pomnoží, produkováním toxinů nebo stimulací zánětlivé reakce s uvolněním cytokinů. Při nepříznivých podmínkách se určité typy bakterií mohou přeměnit ve spory, které jsou více odolné k chladu, horku, suchu nebo chemickým lákám a záření, než vlastní bakterie. Ve formě spor může bakterie přežít dlouhá období a pak za příznivých podmínek klíčí a vstupuje do normální růstové fáze (5) (6).

Příkladem onemocnění vyvolaných patogeními bakteriemi jsou např. tularemie (bakterie *Francisella tularensis*), sněť/antrax (*Bacillus anthracis*), mor (*Yersinia pestis*)

a cholera (*Vibrio cholerae*). Pro léčbu onemocnění vyvolaných bakteriemi lze použít antibiotik s výjimkou zvláštních případů jako např. rezistentní kmeny bakterií apod. (2).

Rickettsie

Jedná se o zvláštní typ bakterie, která se není schopna rozmnožovat mimo hostitelské buňky. Tyto bakterie jsou nepohyblivé, mají tvar tyčinek nebo koků a většinou jsou málo odolné proti působení chemických prostředků. Některé však mohou být vůči fyzikálním a chemickým vlivům prostředí stálé.

Jsou většinou přenášeny hmyzem a vyvolávají obvykle nákazy, které mají charakter horečnatých onemocnění spolu s kožními vyrážkami. Příkladem onemocnění, které vyvolávají rickettsie je např. Q-horečka způsobená rickettsií *Coxiella burnetii*. Pro léčbu onemocnění vyvolaných rickettsiemi lze stejně jako u bakterií většinou použít antibiotik (7).

Viry

Viry jsou jedny z nejjednodušších typů živé hmoty, které reprezentují mikroorganismy s acelulární (nebuněčnou) formu života. Jejich velikost je mnohem menší než u bakterií, pohybuje se v rozmezí od 0,02 do 0,2 μm . Viry nemají vlastní metabolismus, a proto jsou zcela závislé na infikovaných buňkách hostitele. Pro svou reprodukci využívají syntetický aparát infikovaných buněk daného organismu.

Rozdělení virů, stejně tak jako jiných mikroorganismů, lze třídit dle různých hledisek. Podle druhu infikovaných buněk se viry rozdělují na živočišné – zootropní viry, rostlinné – fytotropní viry (fytoviry) a bakteriální viry (bakteriofágy). Živočišné viry se dále dělí na viry bezobratlých organismů, obratlovců a člověka. Dle struktury genetického materiálu lze viry dělit na DNA a RNA viry nebo ještě podrobněji na jednořetězcové a dvou řetězcové DNA nebo RNA viry atd. (1).

Příkladem virových onemocnění jsou pravé neštovice (*Poxvirus variolae*), hemoragické (krvácivé) horečky (Lassa, Marburg, Dengue) nebo Ebola (virus čeledi *Filoviridae*). Onemocnění vyvolané viry nelze většinou léčit antibiotiky a jejich léčba je celkově z různých důvodů komplikovanější. V malé míře existují protivirové prostředky, které však účinkují jen omezeně (2).

Plísně (houby)

Plísně jsou mikroskopické organismy vytvářející jemné vláknité povlaky na různých přírodních substrátech, jako jsou např. rostlinné produkty, potraviny a krmiva. Jsou to jednobuněčné nebo případně vícebuněčné heterotrofní organizmy, které většinou nejsou schopny růstu bez kyslíku. Z botanického hlediska se řadí mezi houby (*Mycota*).

Plísně jsou odolné proti obvyklým dezinfekčním přípravkům a slunečnímu záření. Z přírodního hlediska se plísně dělí na vodní, půdní a rostlinné patogeny způsobující choroby rostlin. Některé plísně se mohou množit i ve tkáních člověka a být pro něj patogenní. Za nepříznivých podmínek vytvářejí spory (4).

Určité plísně mohou produkovat extrémně toxické toxiny, jako jsou např. alfaroxiny. Alfatoxiny jsou produkovány řadou druhů plísni z rodu *Aspergillus*. Plísně rodu *Aspergillus* produkují alfatoxin, jsou běžně a široce v přírodě rozšířené. Jejich přirozeným místem výskytu je půda, rozkládající se vegetace, seno a zrní podléhající mikrobiální zkáze. Příznivé podmínky pro růst těchto plísni jsou vysoká vlhkost a vyšší teplota. Toxin lze často nalézt v mléce zvířat, která jsou krmena kontaminovanou potravou. Tyto plísně mohou být zneužity k výrobě biologických a chemických zbraní. Další druhy plísni, které by mohly být využity pro vedení biologické války je rez obilná a plíseň bramborová. Onemocnění vyvolaná plísněmi tzv. mykózy lze léčit antimikrobiálními prostředky (2).

Toxiny

Toxiny jsou jedovaté sloučeniny, které produkují mikroorganismy, rostliny i živočichové. Toxicita těchto látek bývá většinou velmi vysoká a toxický účinek se projevuje již při malých dávkách. Intoxikace organismu se projevuje po krátké době, jejíž délka závisí na typu použitého toxinu (2). Toxiny dělíme např. z pohledu působení na buňku na toxiny cytolytické a toxiny s intracelulárním účinkem.

Toxiny cytolytické jsou bakteriální toxiny působící přímo na membrány buněk živočichů, čímž vyvolávají jejich rozpad či destrukci. Mezi tyto toxiny patří cytolytické toxiny charakteru fosfolipáz hydrolyzující fosfolipidy v buněčných membránách na fosfatidylcholin a sfingomyelin (*Staphylococcus aureus*), oxigenlabilní hemolyziny

způsobující po vazbě na cholesterol vznik malých otvůrků v buněčné membráně (*Streptococcus pneumoniae*), povrchově aktivní hemolyziny (*Staphylococcus aureus*) a toxiny začleňující se do lipidové buněčné dvojvrstvy živočišných buněk (*Staphylococcus aureus*).

Toxiny s intracelulárním účinkem mají realizovaný mechanismus patologického působení ve třech stupních. V prvním stupni je vazba toxinu na specifické receptory nacházející se v membráně citlivých buněk. Druhým stupněm je translokace, přestup toxinu přes buněčnou membránu. Třetím posledním stupněm je interakce s určitým substrátem v cytoplazmě postižené buňky. Mezi tyto toxiny patří např. botulotoxin, cholerový toxin nebo tetanospazmin (4).

Geneticky modifikované organismy

Biotechnologie zahrnuje úpravu použití buněk nebo buněčných komponent kontrolovaným způsobem, aby se dosáhl technicky použitelný cíl. Zvyšující znalost buněk a jejich genomů umožňuje ovlivňovat procesy v živých buňkách, např. přenos vlastností od jednoho organismu k druhému. Touto problematikou se zabývá genetické inženýrství.

Oblast výzkumu genetického inženýrství pro možné použití v biologických zbraních se zaměřuje na modifikace biologických původců nemocí a má za cíl změnit jejich vlastnosti z hlediska zvýšení patogenity a odolnosti proti vnějšímu prostředí. Má také za úkol znesnadnit jejich detekci a identifikaci, a tím zkomplikovat diagnózu a následné léčení, zjednodušit výrobu a dobu skladování (2). Ve Vyhlášce 474/2002 Sb. jsou mimo jiné geneticky modifikované organismy (dále jen GMO) definovány jako organismy nebo genetický materiál obsahující sekvence nukleových kyselin izolovaných z organismů nebo obsahuje sekvence nukleových kyselin, které se podílejí na patogenitě organismů nebo obsahují sekvence nukleových kyselin, které se podílejí na tvorbě toxinů (8).

1.2.2 Mechanizmy šíření biologických agens

Biologická agens mohou vnikat do lidského organismu několika způsoby a cestami.

Inhalace

Při vniknutí B-agens do lidského organismu inhalací hraje hlavní roli vzdušná cesta. Uskutečňuje se v různých formách, avšak nejreálnější se ukazuje forma šíření v podobě aerosolu. Aerosol představuje v ovzduší či jiných plynech rozptýlenou suspenzi tekutých nebo tuhých částic obsahující živé patogenní organismy. Velikost částic se pohybuje v průměru od několika stovek nm do 5 μm . Tyto částice pronikají hluboko do dolních dýchacích cest, kde se usazují (9).

Díky vysoké prokrvenosti plic se biologické agens může po průniku do krevního řečiště dále šířit krví v celém organismu. Mají-li částice více jak 5 mikrometrů, usazují se na povrchu okolního prostředí nebo jsou zachyceny na sliznici horních cest dýchacích. Ve formě aerosolu lze uměle šířit i takové mikroorganismy, které se za přirozených podmínek tímto způsobem šíří minimálně nebo vůbec.

Ingesce

K požití neboli k alimentárnímu způsobu vniknutí B-agens do lidského organismu dochází nejčastěji konzumací potravin nebo vody. Nebezpečná může být nejenom pitná voda, ale i voda používána ke koupání, mytí apod. Ve vodě mohou některá B-agens přežívat i několik měsíců. Vzhledem k tomu, že ve vodě dochází většinou k velkému naředění agens, šíří se tímto způsobem zejména infekční onemocnění, kde ke vzniku nákazy stačí malá koncentrace mikroorganismů. Touto cestou se nejčastěji šíří střevní infekce. Potraviny mohou zároveň sloužit jako pomnožovací půda pro mikroorganismy.

Inokulace

Biologická agens se mohou šířit také pomocí infikovaných vektorů, mezi které patří zejména členovci, zvláště hmyz, jako jsou komáři, klíšťata, vši, mouchy apod. Agens se mohou v přenašeči dále rozmnožovat, a pak jde o tzv. biologicky aktivní způsob přenosu nebo jde o prosté mechanické šíření agens, například cestou kontaminovaných končetin hmyzu. K vlastnímu biologickému přenosu dochází vyprázdněním obsahu trávicího ústrojí hmyzu do místa přísátí, kontaminací místa vpichu slinami hmyzu při sání krve nebo vetřením výkalů hmyzu do poškozené pokožky.

1.2.3 Nejpravděpodobněji zneužitelní biologičtí původci a onemocnění

Podle CDC Atlanta (Centers for Disease Control and Prevention) lze biologická agens, jenž mohou být zneužita rozdělit do tří kategorií:

Kategorie A - nejnebezpečnější, snadno šířitelná nákaza, interhumánně přenosné agens, těžká a obtížně léčitelná onemocnění s vysokou mortalitou.

Kategorie B - méně nebezpečné patogeny, bez interhumánního přenosu, existuje možnost léčby.

Kategorie C - méně běžná agens, jejich zneužití je málo pravděpodobné, ale mají vysokou morbiditu nebo mortalitu nebo se obtížně léčí.

Tab. 1 – Nejpravděpodobněji zneužitelní biologičtí původci a onemocnění (10).

Původci kategorie A	
<i>Orthopoxvirus variolae</i>	pravé neštovice
<i>Bacillus anthracis</i>	antrax
<i>Yersinia pestis</i>	mor
<i>toxin Clostridium botulinum</i>	botulismus
<i>Francisella tularensis</i>	tularemie
<i>Flaviviridae/Arenaviridae</i>	hemoragické horečky
Původci kategorie B	
<i>Coxiella burnetii</i>	Q-horečka
<i>Brucella spp.</i>	brucelóza
<i>Burkholderia mallei</i>	vozhřivka
<i>Alphaviridae</i>	syndrom alfavirové encefalidity
původci běžných chorob	salmonelóza, shigelóza, E. coli (průjmová onemocnění)
Původci kategorie C	
<i>Nipah virus</i>	hemoragické horečky
hantaviry	hemoragické horečky
viry klíšťových hemoragických horeček	hemoragické horečky
polyrezistentní <i>Mycobacteria tuberculosis</i>	tuberkulóza

Pravé neštovice

Neštovice jsou způsobeny virem varioly. V současné době již není tento nebezpečný vir v lidské populaci přítomen. Virus pravých neštovic je snadno přenosný z člověka na člověka, a to zejména kapénkovou infekcí (kašel, mluvení či kýchání), při přímém kontaktu s nemocným nebo kontaminovanými předměty (osobní či ložní

prádlo). Inkubační doba je 7 – 14 dnů. Po intoxikaci dochází během několika dní k rozsevu viru krví. Smrt je způsobená toxikémií vyvolanou přemnožením viru. Po nakažení virem je vysoká smrtnost 20-40 %. Dnes představují pravé neštovice velmi obávanou biologickou zbraň, neboť účinné léky proti této nemoci neexistují (11).

Antrax

Antrax, neboli sněť slezinná je vysoce infekční onemocnění. Přenos probíhá z kontaminovaného např. uhynulého zvířete (koně, krávy, ovce a kozy), které obsahuje bakterie nebo je vylučuje svými výkaly. U býložravců se zvířata mohou nakazit, pasou-li se na kontaminované pastvině. Přenos na člověka se uskutečňuje nejčastěji přímým kontaktem s nemocným zvířetem. Původcem této nemoci je bakterie *Bacillus anthracis*. Infekce, která bývá zpravidla způsobená sporama, proniká do organismu inhalací, požitím nedostatečně tepelně zpracovaného masa, trhlinami v kůži. Možný je i přenos bodavým hmyzem. Inkubační doba je 12 hodin až 5 dnů.

Rozeznáváme tři formy onemocnění: kožní, inhalační a střevní. V současné době patří mezi nejdokonalejší biologické zbraně, a to díky vlastnostem spor. Tyto spory jsou středně rezistentní ke slunečnímu svitu, tepelnému zpracování a desinfekčním prostředkům. Toto jsou podstatné vlastnosti pro použití antraxu jako biologické zbraně. Podle posledních výzkumů je smrtelná dávka pro člověka v inhalační formě 2500-55000 spor. Proti antraxu je možné očkovat a léčba antibiotiky je účinná. (2)

Mor

Yersinia pestis je nepohyblivá bakterie, která vyvolává onemocnění černého moru. Jedná se o onemocnění přenosné ze zvířat (krys a dalších hlodavců, nejčastěji prostřednictvím blech) na lidský organismus. Mor se vyskytuje v několika formách, a to dýmějové (bubonické) – nejčastější, kousnutí infikovanou blechou. Plicní - (plicní forma je zajímavá tím, že k vyvolání nemoci stačí méně než 10 mikroorganismů, což je velmi vhodné pro teroristické zneužití. Tato forma má vysokou smrtnost a masivně se šíří do populace při kašli do vzduchu). Septické - (rozsev krví), kožní a meningeální - (způsobuje zánět pleny mozkové) (2).

Botulismus

Botulotoxin dříve nazýván také jako „klobásový jed“, je znám díky intoxikovaným zkaženým konzervám. Tyto toxiny jsou produkovány anaerobní gram-pozitivní bakterií *Clostridium botulinum*. Mají neurotoxické účinky, které blokují nervosvalový přenos. Cesta přenosu je nejčastěji fekálně-orální. Zdrojem nákazy je kontaminovaná potrava, obzvláště nedostatečně zpracované zeleninové nebo masové konzervy. Klinické příznaky se objeví již po 18-36 hodinách. Rychlá smrt nastává selháním srdečních nebo dýchacích svalů, do 24 hodin po objevení prvních příznaků. Toxicita tohoto toxinu je extrémní. Pro člověka se udává jako smrtící dávka 1 mikrogram. Léčba je velice nákladná (12).

Tularémie

Tato nemoc, dříve označována jako zaječí nemoc, je akutní infekční onemocnění způsobené bakterií *Francisella tularensis*. Přenos na člověka je z infikovaného zvířete (tkáň, tělní tekutiny). Inkubační doba je 1-21 dní. Pro možné teroristické zneužití připadá šíření bakterie ve formě aerosolu, kdy dochází ke vzniku primární plicní formy tularémie (10).

Hemoragické horečky

Hemoragické horečky jsou exotické infekční choroby virového původu, charakterizované horečnatým průběhem, se sklonem ke krvácení a nezhoubka končí smrtí. Předpokládá se, že mají zvířecího hostitele a jako vektor působí členovci. Každé onemocnění má svůj charakteristický průběh, ale společně končí difúzním krvácením.

Jako příklad tohoto onemocnění lze např. uvést *Ebolu* a *Marburg*. Přirozený hostitel virů není přesně znám, ale snadno se přenáší infikovanou krví, tkáněmi, sekrety a exkrety. Inkubační doba u Eboly je 2-21 dnů, u horečky Marburg 3-9 dnů. Pozdní fáze se projevuje plošným difúzním krvácením s tvorbou rozsáhlých hematomů. Onemocnění vykazuje vysokou smrtnost, u horečky Ebola 50-90 % a u horečky Marburg kolem 25 % (11).

Brucelóza

Toto infekční onemocnění je vyvolané bakterií rodu *Brucella*. Přenos na člověka je buď přímým kontaktem se sekrety infikovaných zvířat (nejčastěji hovězí dobytek a

vepři) přes poraněnou kůži, sliznici (spojivka), infikovaným aerosolem nebo po požití nepasterizovaných mléčných výrobků. Inkubační doba je od 5 dnů do několika měsíců (11).

Břišní tyfus

Břišní tyfus je infekční onemocnění vyvolané bakterií *Salmonella typhi abdominalis*. Zdrojem nákazy je nemocný člověk nebo bacilonosič. Nemoc se přenáší fekálně-orální cestou a nejčastějším vehikulem je kontaminovaná voda, mléko a potraviny. Z tohoto důvodu se tato bakterie může jevit jako vhodná zbraň pro možné teroristické použití (10).

Cholera

Jedná se o akutní střevní onemocnění vyvolané pohyblivou gramnegativní bakterií *Vibrio cholerae*. Zdrojem nákazy je nemocný člověk, který se nakazil po požití kontaminované vody. Mikroorganismus je přenášen fekálně-orální cestou. Inkubační doba je až 5 dnů. Onemocnění je zajímavé pro teroristy především pro rychlý průběh nemoci (12).

Tuberkulóza

Tuberkulóza nebo-li TBC je infekční onemocnění způsobené bakteriemi ze skupiny *Mycobacterium tuberculosis*. Většinou napadá plíce, ale může postihnout i jiné části těla. Šíří se vzduchem tak, že osoba s aktivní formou tuberkulózy kašle, kýchá nebo jiným způsobem rozšiřuje své sliny vzduchem. Většina infekcí je asymptomatická. Zhruba jedno z deseti onemocnění přejde v aktivní tuberkulózu. Pokud se neléčí, způsobuje úmrtí ve více než 50 % případů. Mezi běžné symptomy patří chronický kašel s krvavým sputem, horečka, noční pocení a ztráta tělesné hmotnosti. Infekce dalších orgánů způsobuje velkou škálu symptomů (11).

1.2.4 Metody laboratorní detekce

Komplexní diagnostika infekčních onemocnění způsobených mikroorganismy se opírá o typické klinické příznaky onemocnění, o vyhodnocení aktuální epidemiologické

situace v napadeném místě či regionu a v neposlední řadě o výsledky laboratorních vyšetření.

Z laboratorních vyšetření zde budou uvedeny pouze kultivační metody, které byly použity v této práci pro zjištění přeživších B-agens v prostředí.

Kultivační metody

Na vhodných kultivačních médiích můžeme zachytávat téměř všechny druhy bakterií, ale i většinu prvoků a hub. Tyto tradiční metody jsou již velmi dobře propracované a využívají se ve všech pracovištích mikrobiologického charakteru. Kultivační metody jsou navíc velmi spolehlivé, a proto jsou často označovány jako tzv. zlatý standard. Zejména je třeba zmínit skutečnost, že kultivační metody vyhodnocují pouze živý materiál. Jejich nevýhodou je relativně velká složitost a vystavení pracovníků a okolí nákaze. U vybraných B-agens je další nevýhodou dlouhá doba zjištění výsledků tj. dlouhý časový úsek od inokulace po zjiitelný nárůst.

Další vybrané metody detekce B-agens

Jako slibná se ukazuje metoda založená na poznacích molekulární biologie, tzv. polymerová řetězová reakce (PCR), která je rychlá, citlivá a specifická při průkazu infekčních agens. Touto metodou se dají dokázat jak bakterie, tak viry. Identifikace je založena na detekci specifické části deoxyribonukleové kyseliny (DNA). U virů, které obsahují ribonukleovou kyselinu (RNA), je zapotřebí nejprve reverzní transkripce konvertovat na DNA. Tuto metodu lze využít při důkazu B-agens použitých v případě užití biologických zbraní. Určitou nevýhodou je, že zachytává i neživé agens, které již nejsou schopny vyvolat onemocnění.

Stejně tak imunochemické metody se používají pro detekci bakterií a virů, resp. jejich produktů, neboť jsou založeny na principu detekce specifických bílkovin. Těmito metodami se dají detekovat např. i toxiny bílkovinné povahy.

Naopak při imunoenzymových heterogenních ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) testech se chromogenní substráty nahrazují chemiluminiscenčními substráty. Při této reakci markerové enzymy katalyzují světlo vytvářející reakci, přičemž toto emitující světlo je pak kvantifikované fotodetektorem. Výhodou této reakce je její vysoká citlivost, rychlost a jednoduchost provedení.

Při hmotnostní spektrometrii se nejprve extrahovaný zkoumaný vzorek rozdělí separační technikou (plynovou nebo kapalinovou chromatografií) na jednotlivé komponenty. Ty ionizují v celém spektrometru, jsou nabourány elektrony a prochází detektorem. V detektoru se snímá jejich hmotnostní spektrum, které je porovnáváno s předlohami a látka je přesně identifikována. Metoda je náročná na přípravu, odseparování příměsí a vyhodnocení výsledků (11).

1.3 Dekontaminace

Pojem dekontaminace lze definovat jako soubor metod, postupů a prostředků k odstranění kontaminantů nebo jeho eliminace na přijatelnou úroveň a následná likvidace odstraněného kontaminantu (13). Obecně lze dekontaminaci definovat jako popis ošetřujícího procesu, který umožňuje bezpečně používat zařízení, instrumenty nebo povrchy a to zejména ve zdravotnickém, potravinářském, farmaceutickém a v neposlední řadě ve vojenském prostředí.

Dekontaminační procesy v sobě zahrnují širokou škálu postupů a metod, počínaje prostým úklidem a konče dezinfekcí popř. sterilizací. Zatímco sterilizací rozumíme odstranění všech mikroorganismů z předmětů nebo z prostředí, tak dezinfekcí se snažíme přerušit cestu šíření nákazy, a tudíž jde jen o odstranění původců nákazy (infekce). Výsledek má být 100 % nebo blízký této hodnotě (6).

Dekontaminace však není spjata pouze s odstraňováním biologických agens, ale rovněž se používá pro popis postupů vedoucích k detoxikaci (odstraňování chemických látek) a dezaktivaci (odstraňování radioaktivních látek) (14). Dekontaminaci tak nalezneme všude, kde hrozí možnost vzniku či přítomnosti nadlimitního množství kontaminantu, který by měl vliv na člověka a na ostatní živé organismy obecně. Pro potřeby této práce se však budeme zabývat především dekontaminačními procesy vedoucími k odstraňování mikroorganismů.

Neexistuje žádný universální postup odstraňování mikroorganismů, který se hodí pro všechny situace. Volba příslušného způsobu závisí především na účinku, kterého chceme dosáhnout, zda chceme zničit všechny zárodky nebo jen skupinu patogenních, zda nám stačí snížit jen jejich počet, anebo pouze zastavit jejich množení. Po posouzení

dané situace a na základě znalostí a zkušeností přistupujeme k volbě správného postupu (5). V podstatě lze způsoby dekontaminace rozdělit na fyzikální a chemické postupy.

1.3.1 Fyzikální postupy dezinfekce a sterilizace

1.3.1.1 Teplo

Na užití tepla je zřetelně vidět, že nemůže existovat univerzální postup pro odstraňování mikroorganismů. Sterilizace plamenem je sice blesková a účinná, ale bohužel většinu sterilizovaných předmětů ničí.

Plamen

Bakteriologické kličky se v bakteriologii sterilizují vyžháním v plameni Bunsenova kahanu. Pájecí lampou můžeme opalovat zdivo kontaminované dřevomorkou. Spalování (incinerace) drobných předmětů ve spalovacích pecích je účinné u vysoce virulentních nákaz a využívá se k likvidaci infikovaných pokusných zvířat, obvazů a jiného biologického materiálu ze zdravotnických zařízení.

Horký vzduch

K horkovzdušné sterilizaci se obvykle využívá teplot mezi 160 °C až 180 °C. Přístroje k tomu určené se nazývají horkovzdušné sterilizátory. Výhodou je to, že jsou poměrně levné. Nevýhodou je to, že se dají sterilizovat jen předměty z odolných materiálů jako je např. sklo nebo porcelán. Kovové nástroje ztrácejí opakovaným používáním tohoto typu sterilizace tvrdost a tupí se. Dřevo, papír, textil, korek apod. se sterilizují jen při teplotě 160 °C, a stejně při tomto postupu ztrácejí svůj vzhled a mění vlastnosti.

Mechanismem účinku horkého vzduchu se zdá být denaturace bílkovin. Při teplotě 180 °C jsou do 5 minut zabity prakticky všechny nesporeující mikroby. Viry jsou citlivější, s výjimkou viru hepatitidy B, která se v krvi inaktivuje až za 60 minut při teplotě 160 °C. Proti suchému teplu jsou nejodolnější spory, ty nejrezistentnější se zničí až za 15 minut při teplotě 180 °C.

Pára pod tlakem

S tlakem vodní páry stoupá téměř lineárně i její teplota, při tlaku 0,2 MPa má teplotu 121 °C, při tlaku 0,3 MPa přibližně 134 °C. Ke sterilizaci parou pod tlakem se používá přístroj, který se nazývá parní sterilizátor neboli autokláv. Parní sterilizátor lze použít na kov, sklo, porcelán, obvazový materiál, bavlněné a lněné prádlo, některé roztoky a jen zřídka na plasty. Gumové předměty lze tímto způsobem sterilizovat, jen pokud se nedotýkají. V autoklávu nelze sterilizovat např. termolabilní roztoky nebo endoskopy.

Použití páry pod tlakem je z praktického hlediska nejspolehlivější a poměrně i ekonomické. Pára při styku s chladnějšími předměty kondenzuje na vodu, přitom předá ohromné množství výparného tepla, které usmrtí přítomné mikroorganismy tepelnou denaturací bílkovin, rozkladem nukleových kyselin a porušením buněčných membrán. Protože se při této metodě jedná o tzv. vlhké teplo, je jeho působení na mikroorganismy daleko účinnější než za použití suchého tepla, a proto jsou i expoziční doby daleko kratší než jen při horkovzdušné sterilizaci.

Proudící pára

Za normálního tlaku má proudící pára teplotu 100 °C a prakticky se používá jen k přípravě některých mikrobiologických kultivačních půd nebo lékařských substancí. Pro tento způsob je určený přístroj, který se nazývá Arnoldův přístroj nebo Kochův hrnec. V tomto případě nejde o sterilizační postup, neboť odolné spory tuto teplotu vydrží mnoho hodin. Tento způsob dekontaminace se v domácnosti blíží opakovanému žehlení přes mokrý hadr.

Var

V každém případě var nelze považovat za sterilizační postup, i když většina bakterií, virů a kvasinek bývá varem zničena přibližně kolem dvou minut. *Clostridium botulinum* a *Clostridium tetani* mu odolávají 5 i více hodin, virus hepatitidy B mu může odolávat až 30 minut a spory termofilních mikrobů ho přežijí úplně. Sterilizace varem za normálního tlaku je ve zdravotnictví zakázána.

Frakcionovaná sterilizace

Tento způsob se používá ke zničení spor v termolabilních roztocích, které nelze autoklávovat. Jde o trojnásobné opakované zahřívání po dobu 30 minut při teplotě 100 °C, jež je proloženo inkubací přes noc při teplotě 37 °C. Předpokladem je, že první zahřátí zničí vegetativní formy mikrobů, přítomné spory pak přes noc vyklíčí, vzniklé vegetativní buňky se zlikvidují dalším zahřátím. Třetím zahřátím po druhé inkubaci zmizí případné zbylé spory.

Pasteurizace

Tímto pojmem se označují tepelné technologické postupy sloužící ke snížení počtu mikrobů v potravinách a nápojích. Rozeznáváme krátkodobé (mžítkové) postupy, což je několikavteřinové zahřátí na teplotu 75 °C a dlouhodobou pasterizaci, což je zahřátí na teplotu 62 °C po dobu 30 minut.

Tyndalizace

Postup je obdobný jako při frakcionované sterilizaci, ale zahřívá se až šestkrát na nižší teploty, a to i na pouhých 60 °C. Tento postup se používá u extrémně termolabilních roztoků (5).

1.3.1.2 Záření a vlnění

Infračervené záření

Infračervené záření působí proti mikroorganismům pouze svým tepelným účinkem. Záření se vystavují odolné předměty, dosáhnou-li po dobu 20 minut teploty kolem 180 °C, tak splní parametry potřebné pro horkovzdušnou sterilizaci.

Ultrafialové záření

UV-záření je teoreticky poměrně účinné, avšak v praxi s jeho uplatněním nelze příliš počítat, neboť neproniká do hloubky a na zastíněné straně předmětu se tedy nemůže uplatnit. Ultrafialové záření lze užít k doplňkové dezinfekci relativně čistých a prázdných pracovních ploch v bezpečnostních boxech nebo v aseptických provozech (15).

Ionizační záření

Ionizačního záření se využívá k tzv. radiační sterilizaci. K tomuto postupu se využívá pronikavého gama-záření například radioizotopu kobaltu (^{60}Co). Tímto postupem se standardně sterilizují laboratorní nebo zdravotnické potřeby pro jedno použití zhotovené z některých typů pryže a plastů (kanyly, injekční stříkačky apod.) nebo obvazy a šicí materiál.

Výhodou této metody je, že ionizační záření proniká jak obaly, tak sterilizovaným materiálem. Doporučenou dávkou záření je 25 kGy, tato dávka zaručí snížení počtu bakterií alespoň o 10^8 . Některé typy virů tuto dávku přežívají, a proto je před radiační sterilizací vhodné nejprve provést dezinfekci materiálu, například parami Persterilu. Tímto postupem nelze sterilizovat předměty, které mohly být kontaminovány HBV nebo HIV (5).

1.3.1.3 Plazma

Využití nízkoteplotního plazmatu patří k novějším způsobům sterilizace. Ve sterilizační komoře se nejprve vytvoří vakuum, ve kterém se odpaří vhodná chemikálie (peroxid vodíku nebo kyselina peronová), pak se molekuly plynu pomocí energie vysokofrekvenční vln v komoře rozloží na vysoce reaktivní částice. Částice plazmatu reagují s molekulami organických látek, rozkládají je a usmrcují tak mikroorganismy.

Teplota při tomto postupu nepřekročí $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ a lze tak sterilizovat většina lékařských pomůcek a nástrojů. Sterilizační cyklus trvá zhruba jednu hodinu. Plazmatem nelze sterilizovat tekutiny, vlhké a savé předměty, prášky a materiály obsahující buničinu.

1.3.1.4 Filtrace

Filtrace se v praxi využívá ke snížení mikrobiální kontaminace choulostivých roztoků a vzduchu. Filtrací se dekontaminují termolabilní složky některých kultivačních půd, média pro tkáňové kultury a především mnohá léčiva. Tento postup je velmi rozšířen pro filtrování mikrobů ve vodárenství a v potravinářském průmyslu. Jako filtrační materiál slouží porcelán, slinuté sklo, infusoriová hlinka, umělohmotné náhražky azbestu a další. Tyto filtry jsou v poslední době nahrazovány membránovými filtry, které jsou vyrobeny z nitrocelulózy a jiných syntetických materiálů (15).

Nejspolehlivějším systémem filtrace vzduchu jsou tzv. HEPA-filtry, které jsou schopny odstranit až 99,97 % částic o velikosti 0,3 mikrometru. Tyto filtry se využívají například v laminárních bezpečnostních boxech, které jsou určeny pro práci s materiálem o vyšším stupni infekčnosti. Obličej pracovníka je chráněn šikmým sklem a do boxu vsouvá pouze paže. Otvor boxu je uzavřen usměrněným svislým proudem filtrovaného vzduchu, který chrání jak pracovníka před infekčním aerosolem z pracovní plochy, tak materiál uvnitř boxu před kontaminací zvenčí (16).

Přístroje ke sterilizaci formaldehydem nebo etylenoxidem jsou rovněž vybaveny HEPA-filtry, které slouží k tomu, aby na závěr sterilizačního cyklu nepronikl do sterilizační komory žádný kontaminovaný vzduch.

1.3.1.5 Úklid a mechanická očista

Do těchto postupů můžeme zařadit vytřepávání, vyklepávání a vysávání, které jsou důležité pro zbavení prachu z předmětů a tím i mikrobů, je však třeba dohlédnout, aby nesloužily spíše ke kontaminaci ovzduší a k šíření původců infekce do okolního prostředí.

V běžném zdravotnickém zařízení může docela dobře nahradit i nákladnou dezinfekci denní čištění prostorů pomocí obyčejných detergentů, horké vody a opakované větrání.

Před sterilizací či dezinfekcí usnadní mechanické odstranění nečistot účinek těchto postupů. Existují však situace, kde si předběžnou mechanickou očistu nemůžeme dovolit a například použitý lékařský nástroj musíme okamžitě podrobit tzv. předdezinfekci, která spočívá v ponoření celého nástroje nejméně na dobu 30 minut do protivirově účinného dezinfekčního prostředku (15).

1.3.2 Chemické postupy dezinfekce a sterilizace

Dezinfekční látky je z pohledu využití v praxi nejvhodnější třídít podle chemické struktury.

Pro účinnost chemických látek je charakteristická závislost mezi koncentrací a dobou působení. Při chemické dezinfekci dochází ke specifickému účinku chemických látek na mikroorganismy v prostředí, ale i naopak, počet mikroorganismů a charakter

prostředí působí na dezinficiens. Teplota a ochranný vliv prostředí se řadí k dalším faktorům uplatňujícím se u většiny chemických postupů. Všeobecně platí, že se účinnost dezinfekčních látek dobou působení a stoupající koncentrací zvyšuje. Avšak prostředky použité ve zbytečně vysoké koncentraci nebo zbytečně dlouho dezinfekci prodražují, protahují a poškozují materiál, případně mohou dráždit až leptat pokožku.

Odolnost jednotlivých typů mikroorganismů se výrazně liší u různých typů dezinfekčních látek. Vegetativní formy běžných bakterií a kvasinky jsou poměrně citlivé. Rozdíly jsou mezi grampozitivními a gramnegativními bakteriemi. Gramnegativní (především pseudomonády) jsou dosti odolné proti cyklickým sloučeninám a zejména proti povrchově aktivním látkám. Dobře na ně působí alkoholy, těžké kovy, některé organické kyseliny a hlavně alkálie. U grampozitivních se za odolnější považují stafylokoky a enterokoky.

Chemickým látkám výrazně odolávají mykobakteria, zvláště pak podmíněné patogenní druhy jako např. *Mycobacterium avium*. Sloučeniny těžkých kovů a látky snižující povrchové napětí na ně prakticky nepůsobí. Při vyšší koncentraci a delší expozici na ně spolehlivě účinkují některé deriváty fenolu, aldehydy, oxidační činidla a halogeny.

Také bakteriální spory jsou proti dezinfekci vysoce odolné. Účinně sporicidní jsou pouze alkylační činidla, silné kyseliny a alkálie. Ve velkých koncentracích a po delší době expozice též oxidační činidla a halogeny.

Na obalované viry, které jsou choulostivější než bakterie, lze použít téměř každý dezinfekční přípravek. Oproti tomu viry bez obalu a virus hepatitidy B jsou výrazně rezistentní. Spolehlivě na ně působí oxidační činidla, halogeny, aldehydy, koncentrované kyseliny a louhy. Na plísňe neboli mikroskopické vláknité houby s jistotou působí Persteril, halogeny, aldehydy a kvarterní amoniové soli.

Při výběru dezinfekčního přípravku se musíme zajímat, zda je účinný nejen na vegetativní formy bakterií a na kvasinky, ale i na bakteriální spory, na neobalené viry, na mykobakteria a na plísňe. Přehled vybraných dezinfekčních látek a spektrum jejich účinku je patrný z obrázku 1.

SPEKTRUM ÚČINKU DEZINFEKČNÍCH LÁTEK							
skupina resp. příklad	bakterie a kvasinky	vláknité houby	obalené viry	neobalené viry	komplex <i>Myc. tbc</i>	ostatní mykobakt.	bakteriální spory
oxidační činidla Persteril	+	+	+	+	+	±	±
halogeny chloramin B	+	+	+	+	±	±	±
alkylační činidla formaldehyd	+	+	+	+	+	±	+
cyklické sloučeniny lysol chlorhexidin	+	± +	+	0 0	+	+	0 0
alkálie louh sodný	+	+	+	+	+	+	+
kyseliny kys. sírová kys. benzoová	+	+	+	+	+	+	+
těžké kovy prep. stříbra	+	±	±	0	0	0	0
alkoholy ethanol propanol	± +	± +	+	± ±	± ±	± ±	0 0
tenzidy Ajatin	±	±	+	0	0	0	0

Legenda: + spolehlivý účinek, ± účinek ne vždy spolehlivý, 0 nepůsobí vůbec, příp. prakticky nepůsobí

Obr. 1 – Spektrum účinku dezinfekčních látek (5).

Některé chemické látky mohou být natolik účinné, že výsledkem jejich působení je prakticky sterilita. K chemické sterilizaci se v praxi užívají některé plyny, jako například etylenoxid, formaldehyd a páry kyseliny peroctové. Při splnění určitých podmínek mohou mít sterilizační efekt i silné kyseliny a louhy, halogeny, alkylační činidla a kombinované roztoky.

Chemické dezinfekční látky se většinou aplikují namočením, otíráním, postřikem nebo odpařováním par. V suchém stavu se chemikálie mohou použít jen k dezinfekci tekutých materiálů (5).

1.3.2.1 Oxidační činidla

Mechanismus účinku oxidačních činidel působí tak, že odštěpují atomární kyslík ve stavu zrodu, který porušuje molekulární vazby, a tak nevratně inaktivuje enzymy. Jejich výhodou je, že jsou většinou velmi účinné a univerzální. Působí nejen na vegetativní formy bakterií, ale i na spory a na neobalené viry. Oproti tomu nevýhodou je, že jejich účinek výrazně snižuje přítomnost bílkovin. Oxidační činidla se musí používat čerstvé a

v dostatečném objemu, neboť použijí-li se v malém množství, stačí je někdy inaktivovat i samotná hmota mikrobů.

Peroxosloučeniny

Mezi nejdůležitější patří kyselina peroctová (*peroxooctová*), která účinkuje poměrně spolehlivě a rychle, a to i za nízkých teplot kolem 0 °C a přítomností organických látek není příliš ovlivňována. V kombinaci s některými detergenty a alkoholy se její účinek zvyšuje. V České Republice se vyrábí pod názvem *Persteril*.

Povrch ponořeného předmětu po dobu 1 minuty do 2,5 % Persterilu lze považovat za sterilní. Koncentrace 0,7 – 1 % Persterilu se používá k běžné povrchové dezinfekci, 0,5 – 0,7 % k chirurgické dezinfekci rukou a 0,5 – 0,7 % k běžné hygienické dezinfekci rukou.

Ozon

Účinnost ozonu je dobrá i za chladu, avšak jen v relativně čistém prostředí. V praxi se proto používá nanejvýš k dezinfekci pitné vody ve vodárenských provozech.

Peroxid vodíku

V přítomnosti organických látek se snadno rozkládá na vodu a molekulární kyslík, proto nezatěžuje prostředí, ale o to snáz ztrácí účinnost. Jeho 3 % roztok slouží jako antiseptikum, případně desodorans hnisavých ran. Ve vyšší koncentraci dráždí, až leptá.

Peroxid vodíku působí i na viry a spory, avšak pro svou labilitu není k dezinfekci předmětů příliš vhodný. Dříve se jako 30 % roztok dobře uplatňoval k dezinfekci plexisklových serologických destiček (15).

Manganistan draselný

Zředěné roztoky manganistanu draselného (*hypermanganu*) se využívají především ke koupelím, výplachům a ke kloktání. Dobře působí na viry, nikoli však v bílkovinném prostředí.

Další peroxidy a persírany

Peroxid hořčíku, peroxid zinku, benzoylperoxid, perboritan sodný, perkarbonát sodný, peroxidsulfát draselný a peroxidsulfát sodný se občas používají jako mírná

antiseptika. V dermatologii se používá benzoylperoxid k místní léčbě některých forem akné.

1.3.2.2 Halogeny

Mechanismus účinku jejich působení, zejména pak chloru, je založen na oxidačních procesech, takže by bylo možné tyto látky řadit mezi oxidační činidla. V praxi je však zvykem pojednávat o halogenech jako o samostatné skupině. U jodu je však zřejmé, že působí přímo na buněčné bílkoviny. Přesný mechanismus oxidačního působení není s jistotou doposud znám, u chlorových preparátů se předpokládá, že jako aktivní složka působí kyselina chlorná (HOCl), jejímž rozkladem vzniká volný atomární kyslík. Účinek halogenových preparátů je rychlý a univerzální, přítomnost organických látek v prostředí ho snižuje. Přísunem dostatečného množství volného halogenu lze tento nepříznivý efekt překonat. Halogenaminy jsou méně citlivé na přítomnost organických látek, účinkují však znatelně pomaleji.

Chlor a jeho deriváty

Chlor se používá nejčastěji k dezinfekci pitné vody a odpadních vod, kde je ovšem zapotřebí použití daleko vyšší dávky. Přidáním amonných solí se zrychluje účinek všech chlorových preparátů. Železo jejich účinek snižuje a zároveň je jimi korodováno.

Chlornany (*hypochlority*) jsou dezinfekční preparáty využívané převážně k hrubé dezinfekci. Chlorové vápno (směs Ca(OCl)_2 s CaCl_2 s Ca(OH)_2) se užívá například k dezinfekci žump, výkalů a stájí. Chlornan sodný lze užít i k dezinfekci choulostivějších materiálů. Jejich výhodou je nízká cena.

Chloraminy, hlavně benzenchloramin (*Chloramin B*), patří k nejběžnějším dezinfekčním prostředkům a mají všestranné použití. Likvidují i neobalené viry, avšak v porovnání s ostatními chlorovými preparáty působí pomaleji. Chloramin B se k běžné dezinfekci používá v koncentraci 2 % po dobu 30 minut. Spory nebo mykobakteria vyžadují obvykle koncentraci 5 % po dobu 2-6 hodin. Ruce se dezinfikují 0,2-0,5 % roztokem 2-3 minuty.

Dichlorisokyanurát sodný obsahuje velké množství aktivního chloru (chloru schopného chemické reakce). I přesto, že se používá v nižších koncentracích než

chloramin, působí rychleji a dobře zasahuje i mykobakteria. Pro přípravu dezinfekčních roztoků se nesmí používat horká voda, neboť vsypání přípravku do ní by přivedlo jeho rozpad provázený silným uvolňováním chloru.

Jodové preparáty

Svým intenzivním a především rychlým působením na všechny mikroorganismy při celkem nízké toxicitě má jod ojedinělé postavení mezi dezinfekčními přípravky. Jeho nevýhodou je poměrně malá rozpustnost ve vodě.

Jodová tinktura patří mezi nejspolehlivější kožní antiseptika, protože velmi rychle zabíjí mikroby a snadno proniká kůží do hloubky. Jedná se o lihový roztok, který kromě jodu obsahuje ještě jodid draselný.

Jodofory patří mezi nejdůležitější organické sloučeniny jodu, který je v nich vázán na vysokomolekulární, povrchově aktivní sloučeniny, a ty svými mycími vlastnostmi zvyšují jeho dezinfekční účinek. Jsou netoxické, vysoce účinné a všestranně použitelné. Po kyselině peroctové jsou údajně nejúčinnější. Jejich nevýhodou je, že vyžadují dvouetapové postupy (mechanické očištění a pak dezinfekci), korodují železo a barví pokožku a textilie.

Deriváty bromu a fluoru

Brom a jeho sloučeniny mají i výrazný antimykotický účinek, v praxi se využívají například k dezinfekci vod v bazénech. Účinek fluoridů se využívá převážně v průmyslových odvětvích. Organické sloučeniny fluoru působí výrazně virucidně a antimykoticky (5).

1.3.2.3 Alkylační činidla

Ethylenoxid

Jedná se o jedovatou prchavou kapalinu, jejíž páry ve směsi se vzduchem vybuchují, a proto se mísí se oxidem uhličitým nebo freonem. Používá se ve speciálních přístrojích za zvýšeného tlaku a vlhkosti při teplotě mezi 37 až 55 °C. Proniká většinou umělých hmot, a tím lze s výhodou použít ke sterilizaci předmětů balených

v umělohmotných foliích kombinovaných s papírem. Takto sterilizované předměty se však musejí někdy i mnoho dnů nechávat odvětrávat ve zvláštních prostorách. Účinkuje na všechny formy organismů. Pozoruhodná je zejména jeho schopnost ničit spory. Ethylenoxid se používá ke sterilizaci zdravotnických pomůcek z termolabilních umělých hmot, jemných nástrojů, šicího materiálu, textilu, kožešin a různých jiných porézních materiálů.

Formaldehyd

Formaldehyd je dráždivý plyn ostře štiplavého zápachu. Rozpouští se ve vodě na téměř 40 % roztok, který se nazývá formalin. Jako redukční a alkylační činidlo reaguje s citlivými skupinami na molekulách organických látek, což se projevuje výtečným mikrobicidním účinkem. S jistotou ničí bakterie spory, plísně i viry. Nevýhodou je zápach, dráždění spojivek, pálení na sliznicích, vysoký teplotní koeficient, takže roztoky nelze použít při teplotách pod 8 °C, páry pak pod 15 °C.

Ve formě par lze využít k prostorové dezinfekci a k povrchové dezinfekci prádla, polštářů a matrací. Problémem je však takto dezinfikovaný textil odvětrat. Jedno až tříprocentní koncentrace formalinu je součástí dezinfekčních prostředků se spolehlivým baktericidním a virucidním účinkem (15).

Glutaraldehyd

Jedná se o olejovitou ve vodě rozpustnou kapalinu, méně dráždivou a rychleji účinkující než formalin. Účinkuje dobře a rychle na vegetativní formy mikrobů a viry, pomaleji i na spory. Protože nepoškozuje kov, plasty, gumu a ani optické systémy, používá se jako 2 % roztok stabilizovaný pomocí NaHCO₃ především k dezinfekci až sterilizaci endoskopů a choulostivých nástrojů.

Nevýhodou je nutnost opláchnutí sterilizovaných předmětů sterilní destilovanou vodou. Spolu s jinými látkami je součástí mnoha účinných komerčních dezinfekčních přípravků.

1.3.2.4 Cyklické sloučeniny

Mezi cyklické sloučeniny s dezinfekčním účinkem se řadí deriváty fenolu, bifenyly a trifenylmethanová a akridinová barviva. Některé působí i na mikobakreia a plísně,

prakticky však jen na vegetativní formy bakterií. Na spory nepůsobí vůbec, na viry je účinek velmi spolehlivý. Mechanismus účinku spočívá v inaktivaci enzymů a také koagulaci cytoplazmy. Organické látky silně ruší působení jejich dezinfekčních účinků.

Fenol a jeho deriváty

Fenol (*kyselina karbolová*) je klasické desinficiens užívané jako standart ke srovnání jiných fenolových derivátů. Tzv. fenolový koeficient fenolu je roven jedné, pokud je látka účinnější než fenol, má fenolový koeficient vyšší. Fenol je přítomen také v některých konzervačních a dezinfekčních roztocích.

Lysol (*Liquor cresoli saponatus*) je roztok tří isomerů kresolu (orto-, meta-, para-) v draselném mýdle, který se mísí s vodou, ethanolem a glycerínem. Usmrcuje poměrně rychle všechny bakterie, a to i mikobakteria. Používá se k dezinfekci kontaminovaného prádla, k dezinfekci stolice, k hrubé povrchové dezinfekci a čištění. Má dobré mycí účinky. Nevýhodou je intenzivní charakteristický zápach, který dlouho ulpívá. Nyní se Lysol k běžné hrubé dezinfekci nahrazuje 2-benzyl-4-chlorfenolem, prodávaným pod názvem *Orthosan BF12*, který má rovněž dobré mycí účinky, ale nepáchne.

Trikresol je 2,5 % vodný roztok všech tří isomerů kresolu s trochou fenolu, který se používá jako antiseptikum ve stomatologii. Často používaným prostředkem k mytí a dezinfekci podlah je přípravek obsahující 10 % trikresolu, který se prodává pod názvem *Kresosan*. Jeho výhodou je nízká cena.

Polykresulen je polykondensát kyseliny metakresolsulfonové a formaldehydu, který se používá jako místní antibakteriální léčivo v gynekologii.

Amylmetakresol je výrazně účinkující slizniční antiseptikum, které je přítomno v přípravcích proti bolestem v krku, jako je např. Neoangin a Strepsils.

Difenyly

Hexachlorofen býval součástí dezinfekčních mýdel, na pokožce vytvářel protibakteriálně působící film účinný zvláště na stafylokoky. Bylo od něj odstoupeno pro jeho určitou toxicitu při nadměrném používání u kojenců. Nadále se používá jako součást některých přípravků pro léčbu akné.

Chlorhexidin má poměrně dobré fungicidní a bakteriální účinky, napadá hlavně cytoplasmatickou membránu bakterií, kvasinek a prvoků. Je citlivý na přítomnost organických látek, mikobakteria mu odolávají, na spory nepůsobí. Jeho virucidnost je omezena jen na obalené viry. Je hlavně využíván jako antiseptikum na sliznicích a k dezinfekci rukou. Výhodou je, že zůstává na pokožce dlouho aktivní. Je součástí mnoha komerčních dezinfekčních přípravků.

Triclosan je účinný na grampozitivní mikroby, v kombinaci s dalšími látkami i na gramnegativní tyčinky a na kvasinky. Je častou složkou zubních past a jiných kosmetických přípravků (5).

1.3.2.5 Alkálie a kyseliny

Alkálie

Silné zásady s pH nad 12 jsou velmi spolehlivé a levné dezinfekční přípravky. Přítomnost organických látek jim příliš nevádí, organickým materiálem pronikají do hloubky. Tuhy zmýdelňují a z bílkovin tvoří měkké rozpustné albumináty. Působí na všechny typy mikrobů včetně virů a spor. Mechanismem účinku je destrukce buněčných struktur, teploty nad 40 °C výrazně zvyšují jejich účinek. Jejich nevýhodou je velká žíravost a schopnost poškozovat kovy a textilie. Mezi alkálie patří např. louh sodný a draselný, nehašené vápno, vápenné mléko, čpavek, horká soda a vodní sklo.

Kyseliny

Dostatečně koncentrované silné kyseliny na rozdíl od louhů nemusí působit tak spolehlivě v prostředí zatíženém organickými látkami, jsou však dobrými biocidy. Vysoká leptavost a silná korozivnost znemožňuje jejich širší praktické využití.

Koncentrované roztoky kyseliny sírové a solné se používaly ve veterinární praxi k likvidaci spor antraxu. Kyselina chromsírová se v laboratořích používá na čištění a sterilizaci skla. Kyselina boritá bývá součástí očních kapek a mastí na rány (15).

V potravinářství se jako konzervační činidla používají organické kyseliny, které dobře působí proti plísním. Ke konzervaci potravin se často používá např. kyselina octová, mléčná, citronová a sorbová.

1.3.2.6 Sloučeniny těžkých kovů

Ionty těžkých kovů přecházejí v nepatrném množství do roztoku a působí bakteriostaticky až baktericidně, tento jev se nazývá tzv. oligodynamický účinek. Takto účinkují především stříbro, měď a jejich slitiny. Převážně všechny sloučeniny těžkých kovů účinkují lépe na gramnegativní bakterie než na grampozitivní. Na mikobakteria, některé plísně, spory a viry nepůsobí vůbec.

Sloučeniny stříbra

Jsou poměrně málo jedovaté, působí zejména na gramnegativní mikroorganismy. K profilaxi oční kapavky u novorozenců se v praxi osvědčil 2% dusičnan stříbrný. K dezinfekci studní se používá nepáchnoucí preparát *Sagen*, což je komplexní chlorid sodnostříbrný. Koloidních sloučenin stříbra se využívá také k dezinfekci sliznic.

Sloučeniny rtuti

Ve zdravotnictví se setkáváme s organickou sloučeninou rtuti *thiomersalem* používanou jako konzervační činidlo a s *fenylrtuťnatými sloučeninami* sloužícími jako dezinficiencia a antiseptika. Jejich účinek však není dostatečně spolehlivý.

Sloučeniny mědi

Používají se spíše v zemědělství a průmyslu jako fungicidy, modrá skalice (CuSO_4) se uplatňuje v sadařství a vinohradnictví. V plaveckých bazénech ji lze využít k likvidaci řas.

Sloučeniny cínu

Některé organické sloučeniny tohoto kovu mají výborné účinky i na spory, mykobakteria a plísně včetně dřevokazných hub. *Incidiny* byly kombinované preparáty určené k běžné dezinfekci, avšak ve složení nejnovějších přípravků s těmito názvy již sloučeniny cínu nejsou uvedeny. Incidiny mají reziduální dezinfekční účinek (5).

1.3.2.7 Alkoholy

Jejich dezinfekční účinek spočívá v rychlé denaturaci bílkovin a projeví se jen v přítomnosti vody. Stafylokoky a malé viry jsou proti účinku alkoholů poměrně odolné, na spory prakticky nepůsobí vůbec. Zesilují sporicidní účinek kyseliny solné a formaldehydu.

Ethanol

Koncentrovaný ethanol mikroby spíše konzervuje, než zabíjí. Nejvyšší dezinfekční účinek má přibližně 70% alkohol. Ethanol je součástí spousty preparátů určených k hygienické a chirurgické dezinfekci rukou. Poměrně rychle ničí běžné bakterie, mykobakteria a stafylokoky pomaleji. Spory v něm většinou přežívají, k inaktivaci virů je zapotřebí hodinové expozice. Zesiluje působení oxidačních činidel, aldehydů, kyselin a povrchově aktivních látek.

Propanoly

Propanoly, *n-propanol* a *isopropanol* se používají převážně k dezinfekci rukou a to v koncentraci 50 – 60%. Jsou účinnější, levnější a také méně vysušují pokožku než ethanol. Účinek na malé viry je jen slabší. K hygienické dezinfekci rukou bývá expoziční doba 1 minutu, k chirurgické dezinfekci rukou dvakrát 5 minut po sobě. Propanoly jsou přítomné v celé řadě dezinfekčních prostředků.

Triethylenglykol

Jedná se o vícemocný alkohol, jehož páry výborně působí na bakterie a viry vznášející se volně ve vzduchu. Je netoxický a nepáchne, a proto s ním lze provádět dezinfekci ovzduší v místnostech i za přítomnosti osob (15).

1.3.2.8 Povrchově aktivní látky

Povrchově aktivní látky nazývané *tenzidy*. Snižují povrchové napětí rozpouštědel. Patří mezi ně například mýdla vyráběná z přírodních zdrojů a synteticky vyráběné saponáty. Přípravky užívané k praní a čištění se obecně nazývají *detergenty*. Prakticky

použitelné dezinfekční účinky má ze všech povrchově aktivních látek jen skupina kationaktivních tenzidů, označovaná *kvarterní amoniové sloučeniny (KAS)*.

Tyto látky jsou netoxické a nepáchnou, jejich antimikrobní účinek se vysvětluje porušením buněčné stěny a cytoplasmatické membrány. Mají mycí účinek a pro nízké povrchové napětí dobře pronikají do štěrbin. Jejich účinek však ruší mýdlo.

Nevýhodou těchto látek je úzké spektrum účinku, dobře působí na grampozitivní bakterie a většinou i na plísně. Na mykobakteria a spory prakticky nepůsobí vůbec, neobalené viry jsou vůči nim zcela rezistentní. K nejznámějším KAS patří naše preparáty *Ajatin* a *Septonex*.

1.3.2.9 Ostatní látky

Například síra má dobré dezinfekční účinky, *Kysličník siřičitý* se využívá ve vlnařství. Z organických sloučenin síry mají dobré antibakteriální a antimykotické účinky *dithiokarbamáty*. Ze sloučenin fosforu má praktické využití *kyselina fosforečná* a *trinatriumfosfát*, jako detergenty s mírným dezinfekčním účinkem určené k vyvařování prádla a laboratorního skla. Z dusíkatých sloučenin se používá například *azid sodný* jako konzervans.

1.3.2.10 Kombinované přípravky

Tyto dezinfekční přípravky využívají synergického působení různých chemických látek. Většina komerčních dezinfekčních přípravků je směsí vhodně zkombinovaných látek. Oxidační činidla a deriváty halogenů se s výhodou mísí těsně před použitím s běžnými detergenty.

Aldehydy se kombinují s KAS, čímž se u preparátů docílí mycích a čistících účinků. Alkoholy ve směsi s KAS, chlorhexidinem, peroxidem vodíku apod. se používají k dezinfekci rukou, dále pak zesilují působení účinku oxidačních činidel a aldehydů.

Oproti tomu nelze navzájem mísit například oxidační činidla nebo halogeny s deriváty těžkých kovů, ani obyčejné mýdlo s kvarterními amoniovými sloučeninami (5).

1.4 Normy popisující účinnost dekontaminačních přípravků

Nutnost zajistit standardní hodnocení účinnosti dezinfekčních prostředků vedlo k zavedení závazných mezinárodních a národních norem. Jednotlivé normy, které jsou úzce zaměřené na jednu analýzu, popisují provedení, hodnocení a požadavky. I přes mnohé pokroky v mikrobiologii jsou normy založeny na tradičních postupech, které jsou pracovně a časově velmi náročné. V případě použití dostupných norem pro hodnocení velkoobjemové dekontaminace je jejich použití relativně problematické, problematika je popsána níže.

1.4.1 Hodnocení dekontaminace dle norem

Vybrané normy popisující různé typy zkoušek pro hodnocení účinnosti dezinfekčních přípravků.

Normy *ČSN EN 1040 Chemické dezinfekční přípravky a antiseptika - Kvantitativní zkouška s použitím suspenze ke stanovení základního baktericidního účinku chemických dezinfekčních přípravků a antiseptik - Metoda zkoušení a požadavky (fáze 1)* a *ČSN EN 1276 Chemické dezinfekční přípravky a antiseptika - Kvantitativní zkouška s použitím suspenze ke stanovení baktericidního účinku chemických dezinfekčních přípravků a antiseptik používaných v potravinářství, průmyslu, domácnostech a veřejných prostorech - Metoda zkoušení a požadavky (fáze 2/ stupeň 1)* popisují provedení zkoušky s použitím suspenze buněk a dekontaminačního činidla. Po daném časovém úseku je suspenze buněk a dekontaminačního činidla neutralizována a je provedena inokulace suspenze na živný agar. Výsledky jsou vyhodnoceny na základě počtu kolonií (17) (18).

Podobně pro mykobakterie v oblasti veterinární péče *ČSN EN 14204 Chemické dezinfekční přípravky a antiseptika - Kvantitativní zkouška s použitím suspenze ke stanovení mykobaktericidního účinku chemických dezinfekčních přípravků a antiseptik používaných v oblasti veterinární péče - Metoda zkoušení a požadavky (fáze 2, stupeň 1)*.

Normy *ČSN EN 14347 Chemické dezinfekční přípravky a antiseptika - Základní sporicidní aktivita - Metoda zkoušení a požadavky (fáze 1)* a *ČSN EN 13704 Chemické dezinfekční přípravky - Kvantitativní zkouška s použitím suspenze ke stanovení*

sporidického účinku chemických dezinfekčních přípravků používaných pro potraviny, průmysl, domácnosti a veřejné prostory – Zkušební metoda a požadavky (fáze 2/ stupeň 1) jsou používány k hodnocení sporidické aktivity.

Stanovení virucidního účinku je prováděno např. dle ČSN EN 14476 *Chemické dezinfekční přípravky a antiseptika - Kvantitativní zkouška s použitím suspenze ke stanovení virucidního účinku chemických dezinfekčních přípravků a antiseptik používaných v humánním lékařství - Metoda zkoušení a požadavky (fáze 2/ stupeň 1)* (19).

Materiálovou dekontaminaci řeší normy ČSN EN 13697 *Chemické dezinfekční přípravky a antiseptika - Kvantitativní zkouška na neporézním povrchu k vyhodnocení baktericidního a/nebo fungicidního účinku chemických dezinfekčních prostředků používaných pro potraviny, průmysl, domácnosti a veřejné prostory - Zkušební metoda a požadavky bez mechanického působení (fáze 2/stupeň 2)* a v oblasti veterinární norma ČSN EN 14349 *Chemické dezinfekční přípravky a antiseptika - Kvantitativní povrchová zkouška ke stanovení baktericidního účinku chemických dezinfekčních přípravků a antiseptik používaných v oblasti veterinární péče na neporézních površích, bez mechanického působení - Metoda zkoušení a požadavky (fáze 2/stupeň 2)*.

Namátkově se týkají dekontaminační účinnosti také normy ČSN EN 12740 *Biotechnologie - Laboratoře pro výzkum, vývoj a analýzu - Pokyny pro nakládání s odpady, jejich zneškodňování a zkoušení* nebo ČSN EN 1499 *Chemické dezinfekční přípravky a antiseptika - Dezinfekční mytí rukou - Zkušební metoda a požadavky (fáze 2/stupeň 2)*, ČSN EN 12791 *Chemické dezinfekční přípravky a antiseptika - Dezinfekce rukou v chirurgii - Metoda zkoušení a požadavky (fáze 2/stupeň 2)* nebo ČSN EN 1500 *Chemické dezinfekční přípravky a antiseptika - Hygienická dezinfekce rukou - Zkušební metoda a požadavky (fáze 2/stupeň 2)*.

Zkušební metodu účinku dekontaminace lze dohledat i v NATO armádním dokumentu *STANAG AEP-58-Ed2-Vol1*. V tomto dříve neveřejně dostupném dokumentu, nyní již částečně odtajněném, je vhodně popsán postup s použitím suspenze. Navíc je v dokumentu popsán i postup pro stanovení dekontaminační účinnosti na materiálu resp. na cca 5 cm² kupónech (20). I když existuje jak pro chemické bojové látky, tak pro BBL mnoho simulantů (21) je protokol navrhnout pro

použití *B. anthracis*. Z tohoto dokumentu vychází i Český obranný standard - dekontaminační látky a směsi (22). Zde jsou mj. uvedeny zavedené dekontaminační směsi v Armádě České republiky, ale také specifický požadavek na rychlost dekontaminace a to do 30 min.

1.4.2 Reálné podmínky

Za předpokladu reálných podmínek lze nalézt mnoho bodů, kde je komplikované nebo dokonce téměř nemožné zajistit dekontaminaci. Nicméně volbou správné metodiky existuje možnost přiblížit se ideálním výsledkům a provést tak kvalitní dekontaminaci pracovních prostor. Za možné příklady např. tyto: mikrobiologické laboratoře, operační sály nebo přednáškové místnosti jsou vždy prostory nebo zařízení, která lze jen velice komplikovaně dekontaminovat.

Mikrobiologické laboratoře by měly být již z principu koncipované a vybavené tak, aby bylo co možná nejjednodušší provádění dekontaminace. Každopádně je vždy nutné nebo alespoň vhodné přihlídnout k pracovní náplni laboratoře resp. k používanému spektru B-agens (23) (24).

Další z příkladu tj. operační sály a vybavení jsou naopak vystaveny velice aktuální problematice tzv. nosokomiálních infekcí (25). Nosokominálními infekcemi rozumíme infekce získané v souvislosti s pobytem v nemocnici. Ověření a zajištění kvalitní dekontaminace je v tomto případě především nutná prevence (26).

Příklad přednáškového sálu by mohl být uveden i jako příklad bioteroristického činu. I když to tak nemusí nutně být, jako se to stalo např. s B-agens *Legionella pneumophila* 1976 ve Filadelfii v USA (27).

1.5 Velkoobjemové prostory

Za velkoobjemové prostory lze považovat prostory o velikosti od cca 30 m³. Tento objem odpovídá tzv. velkoobjemovému dvacetistopému kontejneru, který se využívá v intermodální dopravě nákladů (28). Velkoobjemové kontejnery byly navrženy

v padesátých letech minulého století, přičemž již v létech šedesátých došlo k jejich sjednocení a zařazení do skupiny přepravních ISO standardů (29).

Z tohoto pohledu lze za velkoobjemový prostor považovat prostory od bytových místností přes kanceláře nebo operační sály až po např. přednáškové posluchárny. Teoreticky lze za velkoobjemové prostory považovat jakékoli uzavřené prostory, které mohou být zamořeny BBL. Nicméně zamoření celých budov nebo komplexů místností hrají v neprospěch dekontaminace i další faktory. Jen namátkově lze zmínit dostatek dekontaminačního přípravku, vysoká spotřeba elektrické energie pro provoz přístrojů. Navíc fyzické vlastnosti aerosolu resp. vlastní rozptyl a sedimentace aerosolu se budou uplatňovat v prostorách s vysokou výškou. V neposlední řadě je třeba zmínit vysoké finanční náklady na dekontaminaci rozsáhlých a segmentovaných prostor. Příkladem mohou být vynaložené náklady cca 1 miliardy dolarů na dekontaminaci poštovních stanic zasažených antraxovými zásilkami v roce 2001 (30) nebo sanace základních škol v Českých Budějovicích od nebezpečného azbestu za 12 mil. Kč (31).

1.5.1 Dekontaminace velkoobjemových prostor

V případě použití dostupných norem nelze získat dostačující informaci o účinnosti dekontaminace ve skutečném prostředí. V reálném prostředí nelze provádět neutralizaci činidlem apod. Naopak kontaminovaný prostor může být členitý a obsahující mnoho typů materiálů, přičemž každý z těchto materiálů může, ale i nemusí vytvářet částečnou ochranu pro B-agens. Zejména jsou problematické porézní materiály, jako je guma, matné kovy nebo beton. B-agens může perzistovat v roztoku, na vlhké podlaze, ve spárách atd.

Z výše uvedených důvodů, nebylo cílem práce následovat postup z dostupných norem zabývajících se testováním dezinfekčních přípravků, ale naopak přiblížit se co možná nejvíce skutečným podmínkám experimentálních laboratoří Státního ústavu jaderné, chemické a biologické ochrany, v. v. i. (dále jen SÚJCHBO v. v. i.).

1.5.2 Popis experimentálních laboratoří

Jako experimentální prostory byly určeny prostory Pracoviště velkoobjemového zkušebnictví (dále jen VZ), které se nacházejí v areálu SÚJCHBO, v.v.i.

Pracoviště velkoobjemového zkušebnictví se skládá ze dvou hal. První hala je koncipována jako vzduchotěsný kontejnment o objemu 3800 m³, v němž je umístěna soustava dvou mobilních laboratoří (dále jen MML) s příslušnými ventilačními jednotkami a zařízením na transport odpadních vod z MML do sběrných jímek. Součástí této haly je zázemí s vybavením určeným jak pro obsluhu haly (velín) tak i pro pracovníky provádějící testy v MML (šatny, hygienické smyčky pro vstup a výstup z kontejnmentu). Součástí zázemí je rovněž vzduchotechnika ventilující prostory samotného kontejnmentu a hygienických smyček (vstupní a výstupní). Ve výstupní smyčce je umístěna další jímka pro záchyt odpadních vod vzniklých při dekontaminaci personálu opouštějícího kontejnment. Druhá hala slouží jako technické zázemí pro samostatnou halu VZ. Tato hala je umístěna odděleně a je využívána k centrálnímu záchytu odpadních vod, před jejich konečnou úpravou a kontrolou parametrů např. pH a nakonec i likvidaci na čističce odpadních vod, jež je rovněž součástí areálu SÚJCHBO, v. v. i.



Obr. 2 - Pracoviště velkoobjemového zkušebnictví

V České republice se jedná o unikátní systém kombinovatelných laboratoří s napojením na hygienickou smyčku. MML resp. celá hala, v níž jsou MML umístěny odpovídá požadavkům dle *ČSN EN 12128 Biotechnologie - Laboratoře pro výzkum, vývoj a analýzu - Stupně zabezpečení mikrobiologických laboratoří, zóny rizika, prostory a technické požadavky na bezpečnost* (31) a úroveň technického zabezpečení 3 (ÚTZ 3) nebo také BSL-3 z ang. biosafety level.

Cílem práce bylo vybrat vhodné způsoby dekontaminace a specifickým způsobem otestovat u vybraných přípravků jejich dekontaminační účinnost v níže uvedených laboratořích.

Pracoviště VZ umožňuje provádět unikátní testování v podmínkách blížících se reálným situacím s užitím vysoce rizikových biologických agens, vysoce nebezpečných chemických i radioaktivních látek. Zároveň splňuje náročné podmínky pro bezpečnou práci s těmito látkami a i jejich bezpečnou likvidaci po ukončení testů.

2 VÝZKUMNÉ OTÁZKY A METODIKA VÝZKUMU

Cílem práce bylo především vytvořit vlastní metodiku testování účinnosti dekontaminačních přípravků, kde byl kladen důraz na simulaci reálných podmínek prostředí laboratoře.

2.1 Výzkumné otázky

Na základě vymezených cílů práce byly stanoveny následující výzkumné otázky:

- Existují vhodné způsoby dekontaminace velkoobjemových prostor?
- Je dekontaminace odparem využitelná pro dekontaminaci velkoobjemových prostor?
- Je aerosolizace dekontaminačních přípravků využitelná pro dekontaminaci velkoobjemových prostor?

2.2 Metodika výzkumu

2.2.1 Způsoby aplikace dekontaminačních přípravků

Generátoru aerosolu

Generátor AGK 2000 (Palas GmbH, Německo) založený na principu proudícího vzduchu zúženou tryskou kolem dávkovacího ventilu. Při průtoku stlačeného vzduchu dochází k odtrhávání roztoku a v následném cyklonu jsou náhodně generovány částice o velikosti 5 nm – 15 µm. Další charakteristiky přístroje:

- použitelné materiály: roztoky, suspenze, B-agens
- maximální koncentrace 1×10^7 částic/cm³ rozprašovač
- objem nádrže: 500 ml
- regulovatelný průtok vzduchu: 3 – 10 l/min

Prostý odpar

Pro odpar byla použita přenosná nerezová nádoba o velikosti 80,5 × 30,7 cm tj. s plochou 0,25 m².

Manuální rozprašovač

Pro dekontaminaci lze také použít běžný zahradní rozprašovač s nádobou 3-10 l. V našem případě byl použit rozprašovač zn. Gardena Art. 822 (Gardena, Německo) o celkovém objemu 5 l (32).

- délka hadice: 175 cm
- provozní tlak: 3 bar

Motorový rozprašovač

Pro dekontaminaci velkokapacitních objemů byl použit motorový rozprašovač STIHL SR 420 s kuželovou mřížkou (STIHL, Německo) (2).

- objem nádrže: 15 l
- regulovatelné dávkování roztoku: 0,13 – 2,78 l/min (na plný plyn)

2.2.2 Testované dekontaminační přípravky

Chirosan Plus (BOCHEMIE a.s., ČR)

Chirosan Plus je práškový dezinfekční prostředek určený k dezinfekci operačního instrumentaria, pro druhý a vyšší stupeň dezinfekce nástrojů, rigidních i flexibilních endoskopů a povrchů zdravotnických prostředků.

Aktivní látkou je generovaná kyselina peroxyoctová (dále jen PAA), která je vysoce účinným antimikrobiálním činidlem. Způsobuje oxidaci buněčných membrán mikroorganismů a deaktivuje široké spektrum patogenních mikroorganismů, včetně virů a spor. Princip systémů generujících PAA spočívá v chemické reakci nosiče aktivního kyslíku s látkou, od které se mohou odštěpovat acetylové skupiny.

- Přípravek obsahuje vyvážený komplex tří enzymů, které svým účinkem štěpí a rozkládají bílkoviny, tuky a cukry.
- Enzymy umožňují rychlou destrukci organické zátěže a zpomalují růst biofilmů. Tenzidové složky rozpouštějí a odstraňují nečistoty, čímž tak usnadňují čištění nástrojů a povrchů.
- Inhibitory koroze chrání nástroje v průběhu dezinfekce, a tak prodlužují jejich životnost.

Tab. 2 - Doba expozice přípravku ChiroSan Plus na mikroorganismy v závislosti na koncentraci.

Mikroorganismus	Doba působení / Koncentrace		
	5 min	15 min	60 min
Baktericidní	2%	1%	0,5%
C. albicans, A. niger	2%	1%	0,5%
M. terore. M avium	2%	1%	0,5%
Adeno, Palio virus		2%	1%
HIV, HBV, ROTA		1%	0,5%
B. subtilis		2%	1%

Incidin OxyDes (Ecolab Hygiene s.r.o., Česká republika)

Kapalný koncentrovaný prostředek k dezinfekci a čištění ploch a povrchů. Je vhodný na podlahy, omyvatelné stěny a předměty, kachlíky, WC, nábytek apod.

Obsah účinných látek ve 100 g Incidinu OxyDes: 10,0 g peroxidu vodíku; 7,5 g alkydimethylbenzylamonium-chloridu

Tab. 3 - Doba expozice přípravku Incidin OxyDes na mikroorganismy v závislosti na koncentraci.

Doporučené ředění pro použití	Koncentrace (%)	Doba expozice
plošná dezinfekce v nemocniční profylaxi a ve všeobecné praxi	1,0	15 min
	1,5	5 min
virucidní (obalené viry)	1,0	15 min
fungicidní	1,0	15 min
tuberkulocidní	4,0	15 min
dezinfekce van	1,0	5 min
	2,0	2 min

Kohrsolin® FF (BODE CHEMIE, Německo)

Vlastnosti přípravku: Kohrsolin® FF je čistící dezinfekční přípravek na bázi synergické kombinace aldehydů a kvartérních amoniových sloučenin, výsledkem čehož je bezpečný, účinný a jednoduše použitelný přípravek. Kohrsolin® FF zanechává jen malé množství reziduí a je vhodný k použití pro centrální i decentrální dávkovací systémy.

Složení, 100 g roztoku obsahuje: účinné látky: glutaral (=glutaraldehyd) 5,0 g, benzyl-C12-18-alkyldimethylammoniumchlorides (=benzalkoniumchlorid) 3,0 g, didecyldimethylammoniumchloride 3,0 g

Mikrobiologická účinnost: Sporicidní, baktericidní, fungicidní, tuberkulocidní, mykobaktericidní, virucidní, virucidní na obalené viry (vč. HBV, HCV, HIV), FCV, MNV, SARS a rotaviry.

Tab. 4 - Doba expozice přípravku Kohrsolin® FF na mikroorganizmy v závislosti na koncentraci.

Dezinfekce povrchů Dezinfekce otřením	Doba působení / Koncentrace						
	3 min.	5 min.	15 min.	30 min.	1 h	2 h	6 h
v nemocnicích a primární zdravotnické péči - baktericidní a fungicidní			1%		0,5%	0,25%	
MRSA		1%		0,5%			
TBC (<i>Mycobacterium terrae</i>)				3%	1,5%		
Virucidní na obalené viry (vč. HBV, HIV, HCV)		0,5%					
Virucidní					4%	2%	
Sporicidní - Spóry <i>Clostridium difficile</i> (ribotyp 027)							2%
SARS				0,5%			
FCV1)				1%		0,5%	
MNV2) - čisté podmínky - špinavé podmínky			1%	0,5% 1%			
Rota virus		0,5%					
Dezinfekce koupacích van	2%						

Korsolex® basic (BODE CHEMIE, Německo)

Korsolex® basic je dezinfekční přípravek na bázi aldehydu se širokým spektrem účinnosti včetně plného virucidního a sporicidního účinku. Přestože je velmi účinný, tak je i jemný k povrchům, je také charakterizován krátkými časy působení a nízkou koncentrací pracovních roztoků.

Složení, 100 g roztoku obsahuje: účinné látky: 15,2 g glutaral (glutaraldehyde), 19,7 g (ethylendioxy)dimethanol (1,6-dihydroxy-2,5-dioxahexane). Pomocné látky: surfaktanty, inhibitory koroze, soli, barviva, vonné přísady.

Tab. 5 - Doba expozice přípravku Korsolex® basic na mikroorganismy v závislosti na koncentraci.

Mikroorganismus	Doba působení / Koncentrace				
	5 min.	15 min.	30 min.	1 h	4 h
bakterie a plísň, vč. Mycobacterium terrae		4%	3%	2%	
Helicobacter pylori		4%	3%	2%	
MRSA, EHEC			0,5%		
Virucidní na obalené viry (vč. HBV, HIV, HCV)	1%				
Adeno virus	1%				
Papova virus		2%	1%		
Polio virus			4%	2%	
Rota virus	1%				
Virucidní			4%	2%	
SARS		4%	3%	2%	
HAV			4%	2%	
Bakteriální spóry					5%

Persteril 36 (EURO - Šarm spol. s r.o., Česká republika)

Persteril s definovaným obsahem PAA jako hlavní aktivní složky má výrazný vliv na kontrolu obsahu bakterií vytvářejících biofilmy na částech chladicího systému a zhoršujících tak podmínky pro přestup tepla. Působí jako výrazné okysličovadlo. Prahová hodnota pro řasy a organismy tvořící sliz je 1 -2 ppm PAA. Přípravek působí při pH až 9,5, optimální hodnota je do 8,6.

Charakteristika: Stabilizovaná rovnovážná směs kyseliny peroxyoctové, peroxidu vodíku, kyseliny octové a vody. Má charakteristický zápach. Je nepěňivý.

Vlastnosti: Persteril® má význačné dezinfekční a oxidační vlastnosti. Působí v celém spektru mikroorganismů v širokém teplotním rozmezí. Účinnost přípravku: baktericidní, sporicidní, virucidní, fungicidní

Složení: kyselina peroxyoctová % hm 32,0 – 36,0; peroxid vodíku % hm 5,0 – 12,0; kyselina sírová % hm max. 1.

Tab. 6 - Doba expozice přípravku Persteril® na mikroorganismy v závislosti na koncentraci.

Aplikace	Forma aplikace	Koncentrace apl. roztoku (%)			Doba působení (min)	Pozn.
		Persteril 4	Persteril 15	Persteril 36		
Ohnisková dezinfekce	postřikem	40 - 100	10 - 30	5 - 15	90 - 180	bez předchozího čištění
SLAK, ptačí chřipka	postřikem	2 - 4	0,5 - 1,2	0,1 - 0,5	4	
TBC	postřikem	4 - 8	1 - 2	0,5 - 1	10	
Lab. boxy, komory pro chov bezmikrobních zvířat	postřikem výpary	10	4	2	180	dobře vyvětrat
Bazény, nádrže, sádky	postřikem výpary	4	1,2	0,5	60 - 180	
WC, vany, sprchy	postřikem	4	1,2	0,5	60 - 180	
Stájové prostory	výpary postřikem	15	4	1,5	120 - 180	250 - 500 ml/m ³ následně vyvětrat
Povrchová dezinfekce pokožky, kůže	ponoření postřikem	2	0,5	0,2	1	bez oplachu
Plísňová onemocnění	ponoření postřikem brodění	4	1,2	0,5	30	pravidelně do vyléčení onemocnění
Ošetření vemen, prevence zánětů	omytí	2	0,5	0,2	1	

Sanosil super 25 AG (Sanosil Ltd, Švýcarsko)

SANOSIL® SUPER 25 Ag je univerzální antivirový dezinfekční prostředek.

Použití: Povrchová dezinfekce, dezinfekce aerosolem, prostorová dezinfekce, dezinfekce sprejem. Dezinfekce vody, potrubí a vodních tanků, aplikace v chladících věžích.

Účinnost: Bacterie, viry, kvasinky a plísňe, bakteriální endospory, biofirmy - Dezinfekční produkty Sanosil byly testovány odbornými pracovníky více než 200 testy a byla potvrzena spolehlivá účinnost proti patogenům uvedených na: <http://www.sanosil.cz/sanosil-super-25-ag>.

Účinné látky: 50% Peroxid vodíku, 0,05% stříbro

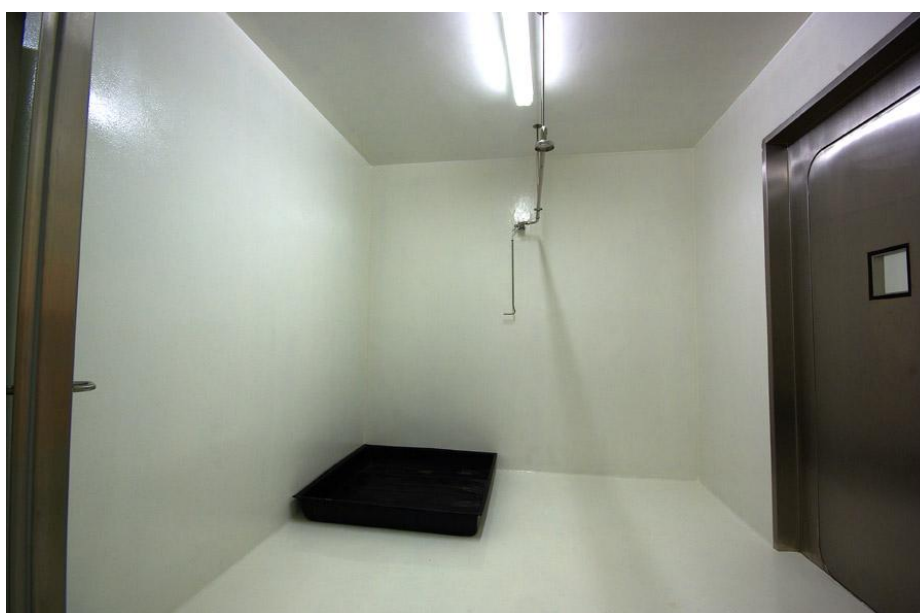
Tab. 7 - Testované dekontaminační přípravky

Dekontaminační přípravky	Používaná koncentrace (%)	Doba expozice
Chirosan Plus	4%	60 min.
Incidin OxyDes	5%	60 min.
Kohrsolin® FF	8%	60 min.
Korsolex® basic	10%	60 min.
Persteril 36	5%	60 min.
Sanosil super 25 AG	10%	60 min.

2.2.3 Experimentální prostory

Místnost bezpečnostní smyčky

Pro simulaci menších laboratorních prostor byla vybrána jedna z místností v koridoru bezpečnostní smyčky. Místnost o velikosti 3×3 m a celkovém objemu cca 30 m³ s intaktní povrchovou úpravou sloužila zejména pro provádění předběžných testů.



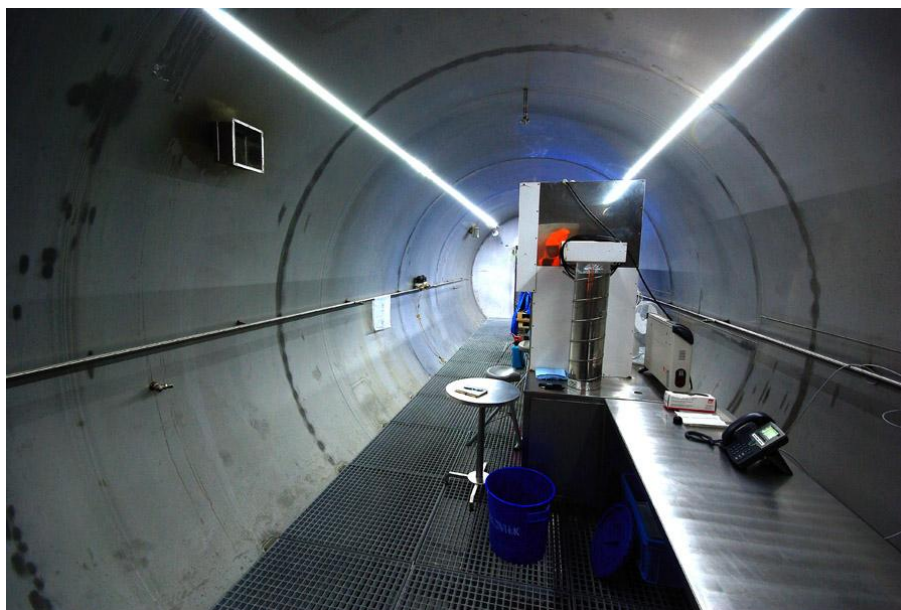
Obr. 3 – Místnost bezpečnostní smyčky

Mobilní modulární laboratoř 6

Jedná se o menší segment MML o délce 6 m s celkovým objemem 60 m³. Laboratoř je vyrobena z nerezové oceli a je vybavena hermeticky uzavíratelnými dveřmi, vlastní ventilační jednotkou, která je schopna vyměnit objem MML za 2 minuty dvojitým systémem trysek určených k aplikaci dekontaminantu i k následnému oplachu vodou, odnímatelným podlahovým roštem pod kterým se nachází jímací prostor s výpustí, ve kterém může docházet k hromadění a perzistenci B-agens.

Mobilní modulární laboratoř 6,6

Vybavení laboratoře je shodné s MML6 s tím rozdílem, že celková délka je 12 m a celkový objem je 120 m³. Dvojnásobný objem prodlužuje výměnu vnitřního objemu MML na 4 minuty.



Obr. 4 – Mobilní modulární laboratoř 6,6

2.2.4 Testované B-agens a jejich kultivační podmínky

Bacillus anthracis NCTC 10340T (Original Strain Reference: Vollum)

Kultivační médium: Trypton-sojový agar (TSA); ref. číslo výrobce (MKM kód): 10208 (TRIOS, spol. s r. o., ČR)

Kultivační médium sporulační: AK Agar # 2 Sporulating agar (BBL, Becton Dickinson, Francie), příprava agaru dle návodu výrobce (33). Po inokulaci byla Petriho miska umístěna v inkubátoru při 20 °C po dobu 14 dní.

Kultivační podmínky: aerobní kultivace, 37 °C/24 hod.

Kultivační podmínky pro sporulaci: aerobní kultivace, 20 °C/14 dní.

Bacillus atrophaeus CNCTC 6216

Kultivační médium: TSA; ref. číslo výrobce (MKM kód): 10208 (TRIOS, spol. s r. o., ČR)

Kultivační médium sporulační: AK Agar # 2 Sporulating agar (BBL, Becton Dickinson, Francie), příprava agaru dle návodu výrobce (33). Po inokulaci byla Petriho miska umístěna v inkubátoru při 20 °C po dobu 14 dní.

Kultivační podmínky: aerobní kultivace, 30 °C/24 hod.

Kultivační podmínky pro sporulaci: aerobní kultivace, 20 °C/14 dní.

Escherichia coli CNCTC 6859T

Kultivační médium: TSA; ref. číslo výrobce (MKM kód): 10208 (TRIOS, spol. s r. o., ČR)

Kultivační podmínky: aerobní kultivace, 37 °C/24 hod.

Staphylococcus aureus subsp. aureus CNCTC 5670T

Kultivační médium: TSA; ref. číslo výrobce (MKM kód): 10208 (TRIOS, spol. s r. o., ČR)

Kultivační podmínky: aerobní kultivace, 37 °C/24 hod.

Streptococcus pneumoniae CNCTC 5809

Kultivační médium: Columbia krevní agar; ref. číslo výrobce (MKM kód): 01011 (TRIOS, spol. s r. o., ČR),

Kultivační podmínky: aerobní kultivace, 37 °C/24 hod.

2.2.5 Příprava B-agens a stanovení počtu v bakteriální suspenzi pro testy

Přístroje a vybavení

Autokláv FOB2S (Fedegari Autoclavi Spa, Itálie), inkubátor 37, 30 a 20 °C TCH 100 (Laboratorní přístroje Praha, ČR), stopky, vortex (Biosan, Litva), třepačka (LabNet, USA), denzitometr Densi2 (Emo Brno, ČR), pipetman accu-jet (Brand, Německo), zkumavky, kultivační nádoby, ověřené nastavitelné mikropipety 10-1000 µl (Finnpipette, Finsko), Petriho misky o průměru 90-100 mm, skleněné kuličky o průměru 3-4 mm.

Příprava suspenze bakterií

Uchování zamražených kultur mikroorganismů: kultury jsou uchovávány při -80 °C, jako kryoprezervační médium slouží 50% glycerol (Sigma).

Oživení zamražených kultur: Zamražená suspenze bakterií byla pozvolna rozmrazena a inokulována bakteriologickou kličkou na Petriho misku obsahující příslušné kultivační médium. Inkubace probíhala v inkubátoru při 37 °C (pro *B. atrophaeus* při 30 °C) po dobu 24 hod.

Pracovní kultura: následující den bylo z této subkultury odebráno několik kolonií testované bakterie, které byly inokulovány na novou Petriho misku s příslušným kultivačním médiem, inkubace probíhala za shodných podmínek.

Příprava pracovní bakteriální suspenze: postup pro přípravu bakteriální suspenze byl dodržen dle normy ČSN EN 1276. Za účelem orientačního zjištění koncentrace daného agens bylo provedeno měření zákalu na denzitometru. Dle

zjištěných hodnot bylo provedeno dekadické ředění, ze kterého bylo inokulováno 100 µl na příslušné kultivační médium. Dle ČSN EN 1276 byla pro zjištění přesné koncentrace kolonie tvořících jednotek KTJ/ml (nebo z ang. colony forming unit CFU/ml) použita rovnice 2.1.

$$(2.1) \quad N = \frac{c}{(n_1 + 0,1n_2) \times d}$$

N – koncentrace bakteriální suspenze v KTJ/ml

c – celkový počet kolonií z misek zahrnutých do počítání

n₁ – počet misek zahrnutých do 1. ředění (počítaných)

n₂ – počet misek zahrnutých do 2. ředění (počítaných)

d – diluční faktor korespondující s prvním (nižším) zředěním

Příprava suspenze spor bakterií *B. anthracis* a *B. atropaeus*

Oživená kultura buněk z prvního dne kultivace na TSA byla inokulována na tzv. sporulační agar s ozn. AK Agar # 2 Sporulating agar (BBL, Becton Dickinson, Francie), příprava agaru dle návodu výrobce (33). Po inokulaci byla Petriho miska umístěna v inkubátoru při 37 resp. 30 °C po dobu 24 hod, následně byly misky přemístěny do podmínek 20 °C po dobu 14 dní. Vlastní příprava a postup odpovídal normě ČSN EN 14347.

Vytvořené spory, ale také dosud živé buňky, byly odebrány mikrobiologickou škrabkou a rozsuspendovány do destilované vody. Pro inaktivaci živých buněk byla suspenze inkubována ve vodní lázni při 62,5 °C po dobu 15 min. Pro zhodnocení efektivity sporulace byla provedena kultivace kontrolních vzorků před a po tepelné inaktivaci. Kontrola již probíhala na TSA při 37 resp. 30 °C.

2.2.6 Metodika testování účinnosti dezinfekčních prostředků – modifikovaný povrchový test (upraveno dle ČSN EN 13697 a ČSN EN 14347)

Modifikovaný povrchový test, by měl simulovat ulpění agens na různých površích v laboratoři. Protože většina parametrů vychází z norem ČSN EN 13697 a ČSN EN

14349, bude na normy odkázáno níže a postup bude popisován jen pro odlišný postup nebo hodnoty.

Na vybraných materiálech ohraničit definované terčíky, průměr terčíku 2,5 cm tj. cca 5 cm², pomocí polyuretanového tmelu PU 40 FC, produktové číslo: 31422BD (Den Braven, Zwaluw) min. 6 hod před použitím (34). Před aplikací B-agens okolí a plochu terčíku ošetřit 70% etanolem, nechat oschnout.

Pokud to umožňuje terčík, plocha nebo prostor, umístit terčík na dno prázdné Petriho misky. Na plochu terčíku aplikovat 100 µl B-agens o koncentraci 5×10⁸ KTJ/ml což odpovídá koncentraci 1×10⁷ KTJ/cm². Misku nezakrývat a nechat oschnout 1 hod v laminárním boxu.

Pro odebrané vzorky byla provedena kontrola tj. vzorky inkubované, ale bez kontaktu s dekontaminačním roztokem.

Po uplynutí definovaného času pro účinek dekontaminantu byl každý terčík dvakrát opláchnut 250 µl destilované vody.

Na Petriho misku s příslušným kultivačním médiem se z každého vzorku inokulovaly dva vzorky po 100 µl suspenze.

Inkubace probíhá za optimálních podmínek po dobu 24 hod., poté probíhá hodnocení. Vzorky byly z důvodu možného inhibičního efektu inkubovány ještě dalších 24 hod. tj. celková inkubace je 48 hod. Po uplynutí 48 hod. byly misky sledovány a nové kolonie byly zaznamenány.

Výpočet byl očištěn a přepočítán na 100% efektivitu odběru pro každý materiál a sledované B-agens dle rovnice 2.2 a 2.3.

$$(2.2) \quad E = \frac{k}{N}$$

E – efektivita odběru z povrchu materiálu

k – průměr KTJ/ml pozitivních kontrol

N – skutečný počet KTJ/ml v bakteriální suspenzi

$$(2.3) \quad N_e = \frac{Na}{E}$$

N_e – je počet přežilých buněk na ml ve zkušební směsi přepočítaný na 100% efektivitu odběru z povrchu testovaného materiálu

Na – je počet přežilých buněk na ml ve zkušební směsi po době kontaktu

E – efektivita odběru z povrchu materiálu

Pro vyhodnocení výsledků modifikovaného povrchového testu byly dodrženy obecné podmínky ověření metodik dle ČSN EN 13697 a dle ČSN EN 14347.

2.2.7 Metodika testování účinnosti dezinfekčních prostředků – modifikovaný suspenzní test (upraveno dle ČSN EN 1276)

Modifikovaný suspenzní test, simuluje perzistenci agens v roztoku na ploše např. rozlitý vzorek nebo ve vlhkém prostředí. Protože většina parametrů vychází z normy ČSN EN 1276, bude na normu odkázáno níže a postup bude popisován jen pro odlišný postup nebo hodnoty.

Na dno malé Petriho misky (průměr 60 mm) bez agaru je max. 10 min. před započítím dekontaminace ověřenou pipetou napipetováno 100 μ l suspenze B-agens o koncentraci 1×10^8 KTJ/ml. Miska je zakryta víčkem a otevřena až bezprostředně před započítím testu.

Po aplikaci a inkubaci dekontaminačního roztoku je vzorek několikrát opláchnut 900 μ l destilované vody a veškerý objem je z misky odebrán do sterilní zkumavky.

Na dvě Petriho misky s příslušným kultivačním médiem se z každého odebraného vzorku inokuluje 100 μ l suspenze.

Inkubace probíhá za optimálních podmínek po dobu 24 hod., poté probíhá hodnocení. Vzorky byly z důvodu možného inhibičního efektu inkubovány ještě dalších 24 hod. tj. celková inkubace je 48 hod. Po uplynutí 48 hod. byly misky sledovány a nové kolonie byly zaznamenány.

Výpočet byl očištěn a přepočítán na 100% efektivitu odběru pro každý materiál a sledované B-agens dle rovnice 2.2 a 2.3.

Pro vyhodnocení výsledků modifikovaného povrchového testu byly dodrženy obecné podmínky ověření metodik dle ČSN EN 1276.

2.2.8 Metodika testování účinnosti dezinfekčních prostředků – agarový test

Je bezpochyby, že kultivační agar vytváří pro B-agens jisté ochranné prostředí. Test považovaný jako dodatečný byl použit za účelem zjištění schopnosti dekontaminačního přípravku dezintegrovat agens i za ideálních podmínek, tedy čerstvě inokulovaného vzorku.

Na dno Petriho misky s příslušným kultivačním médiem je 20-40 min. před započítáním dekontaminace pipetou napipetováno 100 μ l suspenze B-agens o koncentraci 1×10^3 , 1×10^5 a 1×10^7 KTJ/ml. Miska je zakryta víčkem a otevřena až bezprostředně před započítáním testu.

Inkubace probíhá za optimálních podmínek po dobu 24 hod., poté probíhá hodnocení. Vzorky byly z důvodu možného inhibičního efektu inkubovány ještě dalších 24 hod. tj. celková inkubace je 48 hod. Po uplynutí 48 hod. byly misky sledovány a nové kolonie byly zaznamenány.

Pro vyhodnocení výsledků modifikovaného povrchového testu byly dodrženy obecné podmínky ověření metodik dle ČSN EN 1276.

3 VÝSLEDKY

Výsledky jednotlivých analýz jsou rozděleny do kapitol, které odpovídají jak zaměření práce, tak položeným výzkumným otázkám.

3.1 Analýza vhodnosti použitých způsobů dekontaminace

Prvním krokem této diplomové práce bylo ověřit vhodné způsoby rozptýlení dekontaminačního přípravku v prostoru. Pro tento účel bylo vytipováno několik možných způsobů. V případě způsobů dekontaminace byly položeny následující výzkumné otázky:

- Existují vhodné způsoby dekontaminace velkoobjemových prostor?
- Je dekontaminace odparem využitelná pro dekontaminaci velkoobjemových prostor?

3.1.1 Dekontaminace za použití generátoru aerosolu

Analýzy probíhaly od nejmenších po největší experimentální prostory VZ. Místnost bezpečnostní smyčky sloužila pro předběžné testy způsobu dekontaminace. Byla zde zkoušena aplikace ověřeného dekontaminačního roztoku Persteril 36 v 5% koncentraci pomocí generátoru aerosolu AGK 2000 (Palas GmbH, Německo).

I přes maximální možný průtok generátoru nebylo dosaženo dostatečného odběru dekontaminačního přípravku. V průběhu 1 hod bylo generováno do prostředí pouze cca 20 ml dekontaminačního roztoku což přibližně odpovídalo dávce $0,7 \text{ ml/m}^3$. Nicméně doporučené hodnoty výrobce uvádí 10-15 ml/m^3 . V tomto případě se tedy nepodařilo zajistit v krátké době dostatečné množství přípravku do prostředí.

3.1.2 Dekontaminace odparem

Testování schopnosti odparem byl záměr postaven na možnosti použití např. roztoku formaldehydu pro dekontaminaci. Pro odpar z plochy byla použita nerezová vana s plochou 80,5 x 30,7 cm tj. $0,25 \text{ m}^2$. Do vany bylo nalito vždy 1 l od každého

dekontaminačního roztoku. V místnosti bezpečnostní smyčky byla kontrolována teplota v rozmezí 18-20 °C.

Ani přes zajištění laboratorní teploty nebylo dosaženo takového odparu, který by měl dekontaminační vlastnosti. Přípravky, které neměly vlastnosti odparu nebyly testovány. Na druhou stranu nebyla dekontaminační účinnost prokázána ani u přípravků na bázi kys. peroxyoctové, konkrétně ChiroSan Plus, Korsolex® basic a Persteril 36. Vzorky odebrané za 60 min. od aplikace roztoku, byly stejně pozitivní, jako kontroly. Navíc nedošlo ani k redukci počtu kolonií v agarovém testu, jako se podařilo prokázat u testů s rozprašovači.

3.1.3 Dekontaminace manuálním rozprašovačem

Další způsob aplikace bylo použití manuálního agronomického rozprašovače. Použitím manuálního rozprašovače lze dekontaminační roztok pomocí trysky snadno aplikovat do celé místnosti. Místnosti do cca 30 m³ tak lze bezproblémově dekontaminovat a aplikovat tak 1 l za cca 15 min.

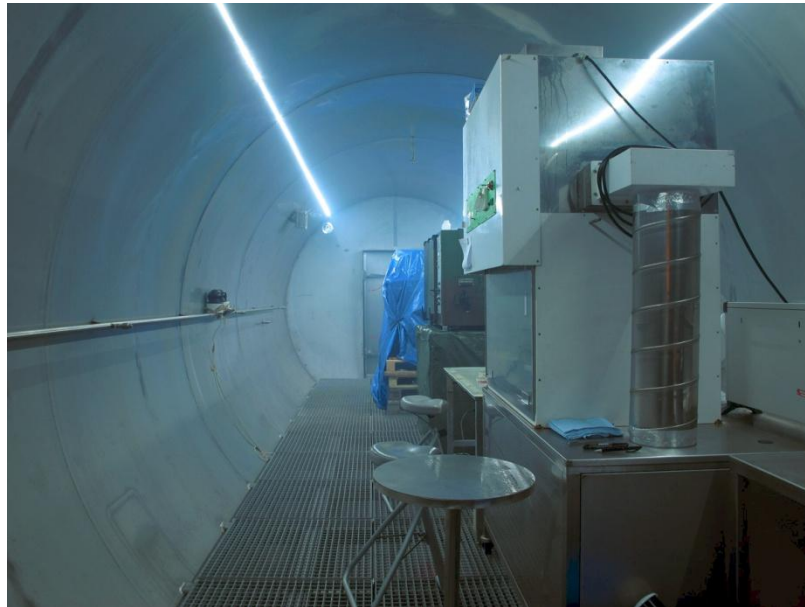
Manuálním rozprašovačem lze v malé místnosti roztok šetrně aplikovat a v porovnání s motorovým rozprašovačem, který vyrábí silný proud vzduchu, nedochází k „odfoukávání“ laboratorního zařízení ze stolů apod.

3.1.4 Dekontaminace motorovým rozprašovačem

Posledním zkoušeným způsobem byl motorový rozprašovač, někdy také nazývaný rosič. U motorového rozprašovače je používáno vzduchu jako dopravního média pro účinnou látku. Motorem poháněný ventilátor vyrábí silný proud vzduchu, do kterého dávkovacím systémem přidává, v našem případě dekontaminační roztok. Přitom je roztok rozprašován do nejjemnějších kapiček a proudem vzduchu je za vysoké rychlosti vynášen z aplikační pistole ven. Dochází tak k tvorbě jemné mlhy o velikosti kapek cca 50 až 250 μm (35).

V prostorách větších než 60 m³ je vhodné použití motorového rozprašovače. Zde je výhoda rychlého rozprašení a tvorba kvalitního aerosolu, který v prostoru zůstává ještě

dlouho po aplikaci roztoku. Při udržování rozprašovače v mírných otáčkách, nejsou exhalace z motorového spalování nesnesitelné. Za podmínek nastavení třetího stupně dávkování a pod mírným plynem je 5 l dekontaminačního roztoku aplikováno za cca 6-7 min (viz Obr. 5). Při používání bylo v každém případě užíváno ochranné polomasky s kombinovanými filtry, takže motorové zplodiny neohrožovali obsluhující osobu.



Obr. 5 – Mlýný opar v laboratoři, kde bylo aplikováno 5 l dekontaminačního roztoku.

3.2 Testování účinnosti dezinfekčních prostředků na vybraných bakteriích

Druhou částí této diplomové práce bylo vytvořit vhodnou metodiku pro zjištění účinnosti dekontaminace. Pro testování dekontaminačních prostředků a účinnosti dekontaminace byla položena následující výzkumná otázka:

- Je aerosolizace dekontaminačních přípravků využitelná pro dekontaminaci velkoobjemových prostor?

Vzhledem ke skutečnosti, že testy byly prováděny pro potřeby VZ SÚJCHBO, v. v. i. byla kontaktní doba stanovena na max. 60 min. Tato doba je po diskusi s pracovníky VZ jako akceptovatelná. Ve standardním pracovním zatížení tato doba představuje konečnou část pracovního dne, tzn. plán běžného pracovního dne VZ by mohl být např.:

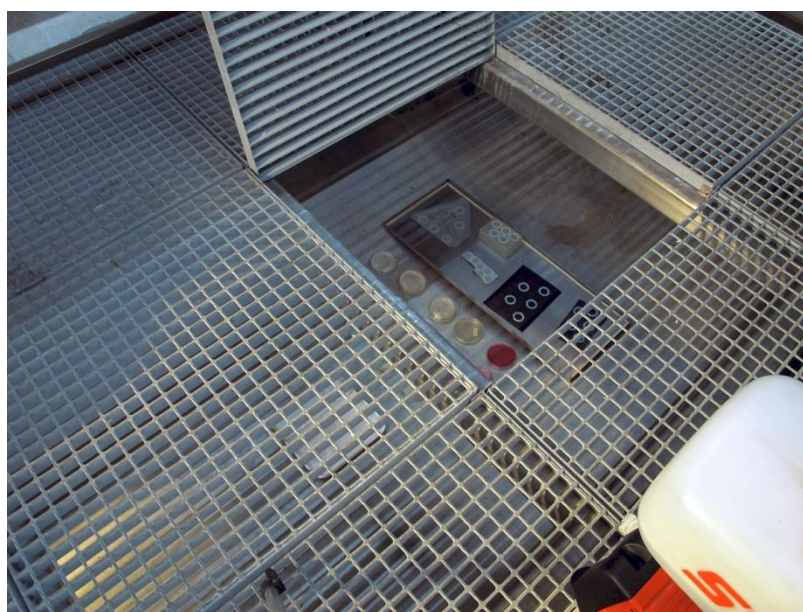
- 2 hod. – příprava testu (variabilní část dne)

- 4 hod. – provádění testů (variabilní část dne)
- 1 hod. – aplikace a kontaktní doba pro působení dekontaminačního roztoku
- 1 hod. – odběr kontrolních vzorků, popř. větrání apod.

Vlastní zkoušky probíhaly v prostorech VZ, konkrétně v laboratořích MML 6 a MML 6,6. MML 6 byla hodnocena z důvodu nezastavěné plochy a nižší kubatury, naopak MML 6,6 charakterizuje používanou laboratoř se standardním vybavením tj. stoly, digestoř, židle apod. V těchto laboratořích byla prováděna aplikace již jen pomocí motorového rozprašovače, který byl vybrán jako vhodný pro objemy prostorů nad 30 m³.

Pro testování byly vždy dva prostory, jeden prostor se nacházel pod rošty na dně jímacího prostoru (viz Obr. 6) a druhý prostor se nacházel na digestoři, tzn. velice blízko stropu tunelu. Každý vzorek určený ke kultivaci byl vždy inokulován na dvě Petriho misky. Hodnoty v tabulkách jsou přepočítané průměry s již zakalkulovanou efektivitou odběru z povrchu a suspenze. V laboratořích byla zajištěna po celou dobu běžná laboratorní teplota 18-20 °C.

Koncentrace dekontaminačních přípravků byla stanovena jako dvojnásobek doporučené koncentrace např. pro sporicidní aktivitu. Za předpokladu, že pro přípravek nebyla uvedena sporicidní aktivita, byla koncentrace stanovena dle dvojnásobku nejvyšší doporučené koncentrace.



Obr. 6 – Umístění testovaných vzorků pod rošt na dno jímací nádrže.

Výsledné hodnoty účinnosti dekontaminační přípravků jsou uvedeny v Tab. 8-12. Pro lepší orientaci jsou uvedeny i přepočítané hodnoty KTJ/ml. Baktericidní aktivita testovaných dekontaminačních činidel se pohybovala na hladině redukce ve většině případů o > 7 výjimečně > 6 nebo 5 logaritmických stupňů. Naopak dostatečná sporicidní aktivita byla prokázána pouze u dekontaminačních činidel Korsorex basic a Persteril 36. U těchto přípravků dosahovala sporicidní redukce > 7 logaritmických stupňů v případě modifikovaného povrchového testu. U modifikovaného suspenzního testu se podařilo prokázat dostatečná sporicidní účinnost pouze u Persterilu 36. Pokud bude přihlédnuto k požadavkům jednotlivých norem, tak je třeba konstatovat, že např. minimální požadavky pro normy upravující povrchovou dekontaminaci ČSN EN 14349 nebo ČSN EN 13697 je prokázání redukce nejméně o 4 logaritmické stupně. Dále např. norma ČSN EN 1276 popisující suspenzní test požaduje redukcí nejméně o 5 logaritmických stupňů. Norma popisující sporicidní aktivitu ČSN EN 14347 požaduje redukcí min. o 4 logaritmické stupně. Dle těchto parametrů budou podtržením zvýrazněny níže uvedené výsledky.

U agarového testu nebylo dosaženo zaznamenatečných výsledků.

3.2.1 Testovaný mikroorganismus: *B. anthracis*

Suspenze spor: $1,1 \times 10^8$ KTJ/ml a $4,3 \times 10^8$ KTJ/ml

Kultivace: 24 hod/37 °C

Kultivační médium: TSA

Tab. 8 - Testování účinku dezinfekčních přípravků na mikroorganismus *B. anthracis*

Mikroorganismus	Dekontaminační přípravek					
	Chirosan® Plus	Incidin OxyDes	Kohrsolin® FF	Korsolex® basic	Persteril® 36	Sanosil® super 25 AG
<i>B. anthracis</i> (spory)						
koncentrace (%)	4	5	8	10	5	10
doba expozice	60 min.					
Povrchový test ($\log_{10} R$)						
plast	2,14	< 1	< 1	<u>7,34</u>	≥ 8	2,91
nerezová ocel	1,62	< 1	< 1	<u>7,14</u>	≥ 8	2,10
koženka	1,34	< 1	< 1	≥ 8	≥ 8	2,49
nátěr barvy	1,72	< 1	< 1	<u>7,43</u>	≥ 8	1,63
guma	2,50	< 1	< 1	<u>7,06</u>	≥ 8	2,69
Suspenzní test ($\log_{10} R$)						
suspenze	1,36	< 1	< 1	< 1	<u>6,89</u>	2,99
Agarový test (KTJ/ml)						
1E7	0	0	0	0	0	0
1E5	0	0	0	0	0	0
1E3	0	0	0	0	0	0

koncentrace (%) – použitá koncentrace dekontaminačního přípravku

$\log_{10} R$ – redukce viability vyjádřená dekadickým logaritmem

KTJ/ml – kolonie tvořící jednotka/ml

Účinné povrchové sporicidní aktivity obstály pouze dekontaminační činidla Korsolex® basic a Persteril® 36. V těchto případech se jednalo o úplnou redukci životaschopnosti spor anebo zásadní redukci, která se projevila pouze jednotkami kolonií na živném agaru.

Korsolex® basic nevykazoval stejně účinnou sporicidní aktivitu u modifikovaného suspenzního testu.

3.2.2 Testovaný mikroorganismus: *B. atrophaeus*

Suspenze spor: $1,3 \times 10^8$ KTJ/ml a $4,8 \times 10^8$ KTJ/ml

Kultivace: 24 hod/20 °C

Kultivační médium: TSA

Tab. 9 - Testování účinku dezinfekčních přípravků na mikroorganismus *B. atrophaeus*

Mikroorganismus	Dekontaminační přípravek					
	Chirosan® Plus	Incidin OxyDes	Kohrsolin® FF	Korsolex® basic	Persteril® 36	Sanosil® super 25 AG
<i>B. atrophaeus</i> (spory)						
koncentrace (%)	4	5	8	10	5	10
doba expozice	60 min.					
Povrchový test ($\log_{10} R$)						
plast	2,00	< 1	< 1	<u>≥ 8</u>	<u>≥ 8</u>	2,94
nerezová ocel	1,64	< 1	< 1	<u>6,86</u>	<u>≥ 8</u>	2,31
koženka	1,52	< 1	< 1	<u>≥ 8</u>	<u>≥ 8</u>	2,42
nátěr barvy	1,73	< 1	< 1	<u>7,52</u>	<u>≥ 8</u>	1,63
guma	2,37	< 1	< 1	<u>6,91</u>	<u>≥ 8</u>	1,67
Suspenzní test ($\log_{10} R$)						
suspenze	1,45	< 1	< 1	1,06	<u>7,11</u>	3,05
Agarový test (KTJ/ml)						
1E7	0	0	0	0	0	0
1E5	0	0	0	0	0	0
1E3	0	0	0	0	0	0

koncentrace (%) – použitá koncentrace dekontaminačního přípravku

$\log_{10} R$ – redukce viability vyjádřená dekadickým logaritmem

KTJ/ml – kolonie tvořící jednotka/ml

Testování přípravků na sporicidní aktivitu dopadlo podobně pro *B. atrophaeus* jako pro *B. anthracis*. To se týká i neúčinné aktivity přípravku Korsolex® basic u modifikovaného suspenzního testu.

Stejně jako v Tab. 8 je i zde patrná, i když velice omezená, sporicidní aktivita u Chirosan® Plus a Sanosil® super 25 AG. Nicméně redukce o cca dva řády je považována za nedostatečnou.

3.2.3 Testovaný mikroorganismus: *Escherichia coli*

Bakteriální suspenze: $1,4 \times 10^8$ KTJ/ml a $5,3 \times 10^8$ KTJ/ml

Kultivace: 24 hod/37 °C

Kultivační médium: TSA

Tab. 10 - Testování účinku dezinfekčních přípravků na mikroorganismus *E. coli*

Mikroorganismus	Dekontaminační přípravek					
	Chirosan® Plus	Incidin OxyDes	Kohrsolin® FF	Korsolex® basic	Persteril® 36	Sanosil® super 25 AG
E. coli						
koncentrace (%)	4	5	8	10	5	10
doba expozice	60 min.					
Povrchový test (\log_{10} R)						
plast	≥ 8	<u>6,58</u>	<u>6,53</u>	≥ 8	≥ 8	≥ 8
nerezová ocel	≥ 8	<u>5,83</u>	<u>5,66</u>	≥ 8	≥ 8	≥ 8
koženka	≥ 8	<u>6,41</u>	<u>6,58</u>	≥ 8	≥ 8	≥ 8
nátěr barvy	≥ 8	≥ 8	<u>6,32</u>	≥ 8	≥ 8	≥ 8
guma	≥ 8	<u>6,40</u>	<u>6,76</u>	≥ 8	≥ 8	<u>7,35</u>
Suspenzní test (\log_{10} R)						
suspenze	<u>7,39</u>	<u>7,24</u>	≥ 8	≥ 8	≥ 8	≥ 8
Agarový test (KTJ/ml)						
1E7	0	0	0	0	0	0
1E5	0	0	0	0	0	0
1E3	0	0	0	0	0	0

koncentrace (%) – použitá koncentrace dekontaminačního přípravku

\log_{10} R – redukce viability vyjádřená dekadickým logaritmem

KTJ/ml – kolonie tvořící jednotka/ml

Redukce viability pro *E. coli* byla úspěšná u všech přípravků. U činidel Incidin OxyDes a Kohrsolin® FF byly pozorovatelné i rozdíly v rámci různých povrchů.

3.2.4 Testovaný mikroorganismus: *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*

Bakteriální suspenze: $1,2 \times 10^8$ KTJ/ml a $4,8 \times 10^8$ KTJ/ml

Kultivace: 24 hod/37 °C

Kultivační médium: TSA

Tab. 11 - Testování účinku dezinfekčních přípravků na mikroorganismus *Staphylococcus aureus*

Mikroorganismus	Dekontaminační přípravek					
	Chirosan® Plus	Incidin OxyDes	Kohrsolin® FF	Korsolex® basic	Persteril® 36	Sanosil® super 25 AG
Staphylococcus aureus						
koncentrace (%)	4	5	8	10	5	10
doba expozice	60 min.					
Povrchový test ($\log_{10} R$)						
plast	≥ 8	≥ 8	<u>7,74</u>	≥ 8	≥ 8	≥ 8
nerezová ocel	≥ 8	<u>6,12</u>	<u>5,85</u>	≥ 8	≥ 8	≥ 8
koženka	≥ 8	≥ 8	<u>6,50</u>	≥ 8	≥ 8	<u>7,67</u>
nátěr barvy	≥ 8	≥ 8	<u>7,01</u>	≥ 8	≥ 8	≥ 8
guma	≥ 8	<u>6,36</u>	≥ 8	≥ 8	≥ 8	≥ 8
Suspenzní test ($\log_{10} R$)						
suspenze	≥ 8	≥ 8	≥ 8	<u>7,97</u>	<u>7,97</u>	<u>7,97</u>
Agarový test (KTJ/ml)						
1E7	0	0	0	0	0	0
1E5	0	0	0	0	0	0
1E3	0	0	0	0	0	0

koncentrace (%) – použitá koncentrace dekontaminačního přípravku

$\log_{10} R$ – redukce viability vyjádřená dekadickým logaritmem

KTJ/ml – kolonie tvořící jednotka/ml

Podobně jako u *E. coli* nebyl pro testované přípravky v dostatečném účinku redukovat viabilitu *Staphylococcus aureus*.

3.2.5 Testovaný mikroorganismus: *Streptococcus pneumoniae*

Bakteriální suspenze: $1,1 \times 10^8$ KTJ/ml a $5,2 \times 10^8$ KTJ/ml

Kultivace: 24 hod/37 °C

Kultivační médium: Columbia krevní agar

Tab. 12 - Testování účinku dezinfekčních přípravků na mikroorganismus *Streptococcus pneumoniae*

Mikroorganismus	Dekontaminační přípravek					
	Chirosan® Plus	Incidin OxyDes	Kohrsolin® FF	Korsolex® basic	Persteril® 36	Sanosil® super 25 AG
Streptococcus pneumoniae						
koncentrace (%)	4	5	8	10	5	10
doba expozice	60 min.					
Povrchový test (\log_{10} R)						
plast	<u>7,84</u>	≥ 8	<u>7,97</u>	≥ 8	≥ 8	≥ 8
nerezová ocel	<u>7,30</u>	<u>7,97</u>	<u>5,68</u>	≥ 8	≥ 8	≥ 8
koženka	<u>6,97</u>	≥ 8	<u>5,90</u>	≥ 8	≥ 8	<u>7,84</u>
> 8nář barvy	≥ 8	≥ 8	<u>5,97</u>	≥ 8	≥ 8	≥ 8
guma	≥ 8	<u>7,84</u>	≥ 8	≥ 8	≥ 8	≥ 8
Suspenzní test (\log_{10} R)						
suspenze	≥ 8	≥ 8	<u>7,47</u>	<u>7,35</u>	≥ 8	<u>7,95</u>
Agarový test (KTJ/ml)						
1E7	0	0	0	0	0	0
1E5	0	0	0	0	0	0
1E3	0	0	0	0	0	0

koncentrace (%) – použitá koncentrace dekontaminačního přípravku

\log_{10} R – redukce viability vyjádřená dekadickým logaritmem

KTJ/ml – kolonie tvořící jednotka/ml

I v případě *Streptococcus pneumoniae* se podařilo prokázat dostatečnou dekontaminační účinnost testovaných přípravků.

4 DISKUZE

4.1.1 Zvolené způsoby aplikace dekontaminačních roztoků

Pro zjištění vhodného způsobů dekontaminace pro velkoobjemové prostory bylo původně navrženo několik způsobů.

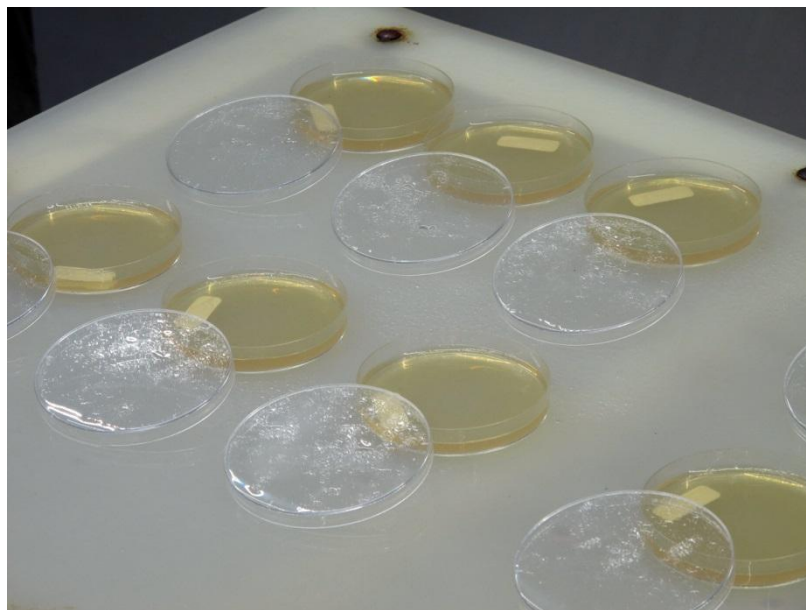
Prvním způsobem byla aplikace dekontaminačního roztoku generátorem aerosolu. K dispozici byl univerzální generátor AGK 2000 zn. Palas (36). V tomto případě bylo výhodou zařízení, že lze použít jakýkoli dekontaminační roztok s výjimkou zpěňujících dekontaminačních činidel. Aerosol jako vhodné nosné médium pro dekontaminační činidlo používá řada výrobců (25) (37). V uvedených příkladech se jedná o velice účinné rozprašovače, které jsou schopné za několik minut aplikovat desítky až stovky ml roztoku. Proto na rozdíl od uvedených zařízení AGK 2000 bylo určeno jako nevhodné pro tuto studii. Naopak pro prostory o kubatuře max. do 1 m³ je generátor schopný dodržet např. aplikační list pro Persteril 36 (38) a vygenerovat aerosol, který nasytí celý prostor.

Dalším způsobem bylo využití vlastností některých látek odpařovat se. Této vlastnosti se využívá v mikrobiologických laboratořích v kombinaci s exsikátorem, do kterého je nalit dekontaminační roztok a materiál tak zůstává pod poklopem sterilní. V tomto případě se nepodařilo zajistit dostatečné odpaření roztoků. Toto bylo zřejmě způsobeno naddimenzovaným prostorem vzhledem k ploše nádrže. Dále pravděpodobně nedostatečnou teplotou anebo uzavřeným prostorem bez proudícího vzduchu.

Naopak aplikace rozprašovači byla dostatečná, samozřejmě za předpokladu dostatečného množství dekontaminačního roztoku. Používaný objem 5 l byl zvolen z praktických důvodů, je to totiž maximální množství manuálního rozprašovače. Na Obr. 7 a 8 je dokumentováno, jak vlhký je celkový prostor 120 m³ po aplikaci 5 l. Pomocí rozprašovače byl do celého prostoru laboratoře vyfukován proudem vzduchu testovaný dekontaminační roztok. Při každém testování bylo dbáno zejména na to, aby byl roztok aplikován do celého prostoru a naopak nedocházelo k přímému ofukování testovaných vzorků. U vzorků umístěných pod roštem byl rošt pochozí a dekontaminační roztok byl aplikován na rošt v celé délce MML. Vzorky v blízkosti stropu byly zasaženy jen proudem dekontaminačního roztoku, který byl aplikován na strop a stěny MML.



Obr. 7 – Umístnění testovaných vzorků pod rošt na dno jímací nádrže.



Obr. 8 – Petriho misky používané k agarovému testu.

4.1.2 Dekontaminační přípravky

Výběr dekontaminačních činidel probíhal zejména dle údajů uvedených v aplikačních listech výrobců. V některých aplikačních listech lze i dohledat, dle jaké normy byly dané efektivity účinnosti testovány.

Dalším parametrem byl výběr rozdílných složení jednotlivých činidel. Test obsahoval přípravky založené na bázi peroxidu vodíku, různé kombinace glutaraldehydových preparátů až po kyselinu peroxyoctovou aj. Z pohledu účinnosti dekontaminace na bakterie se podařilo prokázat dostatečná účinnost pro všechny tyto přípravky.

V případě sporicidní účinnosti byly deklarované účinnosti v rozporu s našimi výsledky. Jako sporicidní byl dle aplikačních listů uveden ChiroSan® Plus (39), Kohrsolin® FF (40), Korsolex® basic (41), Persteril® 36 (38), Sanosil® super 25 AG (42). Vzhledem ke skutečnosti, že Incidin OxyDes (43) je založen na podobné bázi jako Sanosil super 25 AG, byl i u něho předpoklad, že bude vykazovat jistou sporicidní aktivitu. Tento předpoklad se ale nepodařilo potvrdit, viz Tab. 8 a 9. Dle uvedených výsledků je patrné, že měřitelnou aktivitu vykazují jen přípravky ChiroSan® Plus, Korsolex® basic, Persteril® 36, Sanosil® super 25 AG, přičemž jako dostatečně účinné lze hodnotit pouze Korsolex® basic a Persteril® 36. U přípravku Korsolex® basic navíc byla pozorována neschopnost inaktivovat spory v suspenzi.

Výše uvedené výsledky se neshodují s výsledky studie z roku 1996 (44) kde sporicidní aktivita klesá od peroxidu vodíku přes glutaraldehyd, kyselinu peroctovou, která má srovnatelnou aktivitu jako chlornan sodný a úplně nejnižší má fenol. V našem případě byla prokázána nejvyšší sporicidní aktivita pro kyselinu peroctovou, následoval přípravek na bázi glutaraldehydu. Přípravky na bázi peroxidu vodíku měly jen velice nízkou sporicidní efektivitu.

U některých dekontaminačních činidel mohla být jejich neúčinnost způsobena velmi krátkou kontaktní dobou. Jak již bylo uvedeno, z praktických důvodů byl požadován kontaktní čas 60 min. Z hodnot uvedených v aplikačních listech lze uvést, že např. sporicidní účinek u přípravku Kohrsolin® FF je uveden 2% roztok po dobu 6 hod. I když byl použit čtyřikrát koncentrovanější roztok, jeho účinnost byla přesto nedostačující. Naopak u přípravku Korsolex® basic, u kterého je sporicidní účinek popsán pro 5% roztok po dobu 4 hod., bylo dosaženo velice dobrou sporicidní aktivitu již za 60 min. při 10% koncentraci. Z tohoto příkladu je patrné, že nelze obecně aplikovat, vyšší koncentraci dekontaminačního roztoku na vrub zkrácení kontaktního času. Jak uvádí Šlitrová (45) lze toho za určitých podmínek dosáhnout, ale je třeba to vždy experimentálně ověřit.

V rámci diskuze je jistě třeba také zmínit finanční stránku dekontaminace velkoobjemových prostor. Pokud budeme považovat oba sporicidně účinné přípravky za rovnocenné, tak u Persterilu® 36 budou náklady na dekontaminaci MML 6,6 tj. 120 m³ přibližně 43 Kč. V případě použití 10% roztoku Korsolex® basic budou náklady přibližně 240 Kč. Pokud by byl požadavek na dekontaminaci celé haly VZ vzrostly by náklady přibližně na 1400 Kč resp. 7700 Kč. Pokud by bylo nutné halu dekontaminovat každý den, po dobu jednoho týdne, vzrostly by náklady přibližně na 7000 Kč resp. 38500 Kč, což je více jak pětinasobný rozdíl.

Tab. 13 – Orientační finanční rozpočet pro testované koncentrace

Dekontaminační přípravek	Koncentrace [%]	Cena/Litr [Kč]	Cena 1 l dek. roztoku [Kč]
Chirosan® Plus	4	137	5,5
Incidin OxyDes	5	448	22,4
Kohrsolin® FF	5	244	12,2
Korsolex® basic	10	476	47,6
Persteril® 36	5	170	8,5
Sanosil® super 25 AG	10	294	29,4

4.1.3 Použitá metodika testování a hodnocení dekontaminační účinnosti

Upravené a nově použité metodiky pro testování účinnosti dekontaminačních přípravků byly vytvořeny dle vybraných stávajících norem (46), které se týkají dekontaminace, sterilizace apod. Informace, za kterých lze vyčíst, podle jakých norem jsou účinky hodnoceny, jsou uváděny jen u některých dekontaminačních přípravků (47) (48).

Problematika hodnocení dekontaminační účinnosti v reálných podmínkách je již popsána v teoretické části této práce. Z mezinárodních norem bylo pro tvorbu metodik použito několik údajů jako např. aplikace na definovanou plochu a přepočet koncentrace na cm² (49). Stejně jako Severa *et al.* (18) byla i v našem případě použita vysoká koncentrace agens nanášených na jednotku plochy.

Metodika agarového testu se ukázala jako nevhodná. S největší pravděpodobností došlo k absorpci dekontaminačního přípravku do živného média (viz Obr. 8). Tím se

stalo, že živné médium obsahovalo dekontaminant, který mohl na buňky působit bez přerušení dalších min. 24 hod.

Naopak modifikace povrchového a suspenzního testu se ukázala jako vhodná pro simulaci reálných podmínek. V případě modifikovaného suspenzního testu nebyla sledovaná agens v přímém kontaktu s dekontaminačním roztokem, tzn. nedocházelo k poměrnému mísení části dekontaminačního roztoku a suspenze buněk. Navíc, stejně jako u modifikovaného povrchového testu nebyly vzorky po odběru vystaveny účinkům neutralizačního činidla. Možným rozšířením práce by mohlo být širší materiálové spektrum, které by zahrnovalo i materiály z běžného životního prostředí.

Zaměřením je práce určena do velkoobjemových prostor resp. definované laboratoře. Podobně jako práce (24), která zkoumá konkrétní agens, se kterými se v laboratoři pracuje. Podobně jako v našem případě ani Grare *et al.* (23) nezjistil zásadní rozdíly u různě umístěných vzorků v laboratoři ÚTZ-3.

5 ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo zpracovat aktuální literární přehled k dané problematice se zaměřením na mikrobiální kontaminaci, navrhnout a vybrat vhodné dekontaminační přípravky pro dekontaminaci velkoobjemových prostor a vybrané přípravky a způsoby dekontaminace experimentálně ověřit. Všechny stanovené cíle, které jsou vymezeny v úvodu diplomové práce, byly splněny.

Analýzou vhodnosti použitých způsobů dekontaminace bylo zjištěno, že existují vhodné způsoby dekontaminace velkoobjemových prostor. Pro tuto práci se osvědčila dekontaminace za použití manuálního a motorového rozprašovače. Avšak pro prostory nad objem cca 30 m³ je z časového hlediska vhodnější použít motorový rozprašovač. Z důvodu neúčinnosti byla dekontaminace odparem shledána jako nevhodná pro dekontaminaci velkoobjemových prostor.

Každopádně je třeba upozornit na skutečnost, že záleží na správné volbě dekontaminačního přípravku. Baktericidní schopnost testovaných přípravků byla na vysoké úrovni u všech testovaných přípravků. Dostatečná sporicidní aktivita byla prokázána jen u přípravků Korsolex® basic a Persteril® 36 a to na shodné úrovni. Nevýhodou Persterilu® 36 je jeho značná korozivní aktivita a to i na nerez, naopak jeho použití je cenově výhodné. Přípravek Korsolex® basic obsahuje inhibitory koroze, ale jeho cenová výhodnost je nižší.

Výsledky této práce budou sloužit jako podklad pro metodiku sledování dekontaminační účinnosti Pracoviště velkoobjemového zkušebnictví SÚJCHBO v. v. i. Získané informace budou rozšířeny a použity i pro sledování dekontaminační účinnosti v hale velkoobjemového zkušebnictví. Dále by bylo vhodné otestovat větší množství materiálů, popř. otestovat i vzorky s biologickou zátěží. V případě spolupráce s dalšími subjekty by bylo ideální veškeré postupy vyzkoušet i na jiných pracovištích, tzn. provést tzv. mezilaboratorní zkoušky.

6 SEZNAM INFORMAČNÍCH ZDROJŮ

1. **Beneš, Jiří.** *Infekční lékařství.* Praha : Galén, 2009. ISBN 978-80-7262-644-1.
2. **Středa, Ladislav.** *Šíření zbraní hromadného ničení - vážná hrozba 21. století.* Praha : MV-generální ředitelství Hasičského záchranného sboru ČR, 2003. ISBN 80-86640-03-5.
3. **Česko.** Zákon 281/2002 Sb. o některých opatřeních souvisejících se zákazem bakteriologických (biologických) a toxinových zbraní a o změně živnostenského zákona. Praha : Sběrka zákonů České republiky, 2002.
4. **Klaban, Vladimír.** *Ilustrovaný mikrobiologický slovník.* Praha : Galén, 2005. str. 654. ISBN 80-7262-341-9.
5. **Votava, Miroslav.** *Lékařská mikrobiologie obecná.* Brno : Neptun, 2001. ISBN 80-902896-2-2.
6. **Bednář, Marek.** *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie.* Praha : Marvil, 1999.
7. **Votava, Miroslav.** *Lékařská mikrobiologie speciální.* Brno : Neptun, 2003. ISBN 80-902896-6-5.
8. **Česko.** Vyhláška 474/2002 Sb. kterou se provádí zákon č. 281/2002 Sb., o některých opatřeních souvisejících se zákazem bakteriologických (biologických) a toxinových zbraní a o změně živnostenského zákona, ve znění vyhlášky č. 74/2013 Sb. Praha : Sběrka zákonů České republiky, 2013.
9. **Landlová, Linda.** Studium perzistentních organických populantů vázaných na prachové částice v atmosféře - jejich distribuce, osud a efekt. *Diplomová práce.* Brno : Masarykova univerzita v Brně, Přírodovědecká fakulta, Výzkumné centrum pro chemii životního prostředí a ekotoxikologii, 2008.
10. **Prymla, Roman et al.** *Biologický a chemický terorismus.* Praha : Grada, 2002. str. 152. ISBN 80-247-0288-6.
11. **Klement, Cyril a Mezencev, Roman et al.** *Biologické zbrane.* Bratislava : Bonus, 2008. ISBN 978-80-969733-2-3.
12. **Patočka, Jiří et al.** *Vojenská toxikologie.* 1. vydání. Praha : Grada, 2004. 180 s. ISBN 80-247-0608-3.
13. CO-3-1. *Speciální očista v civilní obraně.* Praha : Ministerstvo obrany, 1997.

14. Dekontaminace osob, zvířat a materiálu. *Požáry.cz*. [Online] 3. Březen 2011. [Citace: 10. Leden 2013]. Dostupné z URL: <<http://www.pozary.cz/clanek/39787-dekontaminace-osob-zvirat-a-materialu/>>
15. **Přívora, Miroslav**. *Dezinfekce, dezinfekce, deratitace*. Praha : AVICENUM, zdravotnické nakladatelství, n. p., 1980.
16. ČSN EN 12469. *Biotechnologie - Kritéria účinnosti mikrobiologických bezpečnostních boxů*. Praha : Český normalizační institut, 2001.
17. ČSN EN 13704. *Chemické dezinfekční přípravky - Kvantitativní zkouška s použitím suspenze ke stanovení sporicidního účinku chem dezinfekčních přípravků používaných pro potraviny, průmysl, domácnosti a veřejné prostory – Zkušební metoda a požadavky (fáze 2/stupeň1)*. Praha : Český normalizační institut, 2002.
18. **Severa, Jan et al**. Sporicidní činidla schopná s vysokou účinností inaktivovat spóry *Bacillus anthracis*. *Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie*. 59, 2010, Sv. 4.
19. ČSN EN 14476. *Chemické dezinfekční přípravky a antiseptika - Kvantitativní zkouška s použitím suspenze ke stanovení virucidního účinku chemických dezinfekčních přípravků a antiseptik používaných v humánním lékařství - Metoda zkoušení a požadavky (fáze 2/stupeň 1)*. Praha : Český normalizační institut, 2007.
20. **NATO**. COMBINED OPERATION CHARACTERISTICS, TECHNICAL SPECIFICATION AND TEST PROCEDURES AND EVALUATION CRITERIA FOR NBC DECONTAMINATION EQUIPMENT (DECONTAMINATION TRIPTYCH). *AEP-58*. Sv. Ed2, Vol I.
21. **Sagripanti, J-L et al**. Virulent spores of *Bacillus anthracis* and other *Bacillus*. *Journal of Applied Microbiology*. 102, 2007, Sv. 1.
22. Český obranný standart 681001. *Dekontaminační látky a směsi*. Praha : Úřad pro obrannou standardizaci, katalogizaci a státní ověřování jakosti, 2007.
23. **Grare, M et al**. Efficacy of Dry Mist of Hydrogen Peroxide (DMHP) against *Mycobacterium tuberculosis* and use of DMHP for Routine Decontamination of Biosafety Level 3 Laboratories. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*. 46, 2008, Sv. 9.
24. **Prodělalová, Jana**. Použití vybraných dezinfekčních prostředků k inaktivaci nebezpečných patogenních bakterií a živočišných virů. [online]. Brno :

- Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, 2008. Dostupné z URL:
<http://is.muni.cz/th/10717/prif_r/>
25. **Trackeny.** Validation of Sterinis. [Online] 2005. [Citace: 5. listopad 2012].
Dostupný z URL:
<http://www.diagnostics.fi/fileadmin/user_upload/liitteet/Ireland-Tallaght-Report-En-V01.pdf>
26. **Anderson, B. M et al.** Decontamination of rooms, medical equipment and ambulances using an aerosol of hydrogen peroxide disinfectant. *Journal of Hospital Infection.* 62, 2006, Sv. 2.
27. **Jernigan, Daniel et al.** Legionářská nemoc. *Legionella Pneumophylis - Legionella a vše o ni.* [Online]. 2012. [Citace: 5. listopad 2012]. Dostupný z URL: <<http://legionella.cz/legionarska-nemoc/>>
28. Intermodální přepravní systém. [Online] [Citace: 5. duben 2013]. Dostupný z URL:
<http://cs.wikipedia.org/wiki/Intermod%C3%A1ln%C3%AD_p%C5%99epravn%C3%AD_syst%C3%A9m>
29. ČSN ISO 6346. *Kontejnery - Kódování, identifikace a značení.* Praha : Český normalizační institut, 1997.
30. **Lengel, Allan.** Little Progress In FBI Probe of Anthrax Attacks. *The Washington Post.* [Online] 2005. [Citace: 18. červenec 2013]. Dostupný z URL:
<http://www.washingtonpost.com/wpdyn/content/article/2005/09/15/AR2005091502456_pf.html>
31. Firma začala odstraňovat azbest ze zamořených škol. *aktualně.cz.* [Online] [Citace: 21. březen 2013]. Dostupný z URL:
<<http://aktualne.centrum.cz/domaci/regiony/jihocesky/clanek.phtml?id=72975>>
32. Tlakový postřikovač - 5 l. *gardena.com.* [Online] [Citace: 2. srpen 2013].
Dostupný z URL:
<http://www.gardena.com/ddoc/GARO/GARO2013_EUcs/GARO2013_EUcs__00822.pdf>
33. AK Agar #2 (Sporulating Agar). *bd.com.* [Online] [Citace: 14. květen 2013].
Dostupný z URL:
<http://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/Difco_BBL/210912.pdf>
34. BOND FLEX PU 40 FC polyuretan. *denbraven.cz.* [Online] [Citace: 12. červen 2013]. Dostupný z URL:

- <<http://www.denbraven.cz/dokument-produkt/516/tl-04-22-bond-flex-pu-40-fc.pdf>>
35. Stihl SR 340, 420. *stihlusa.com*. [Online] [Citace: 2. srpen 2013]. Dostupný z URL:
<http://www.stihlusa.com/WebContent/CMSFileLibrary/instructionmanuals/SR340_420_Manual.pdf>
36. AGK 2000 - PALAS. *palas.de*. [Online] [Citace: 2. srpen 2013]. Dostupný z URL:
<<http://www.palas.de/file/NC843/application/octetstream/brochure+AGK+2000++solid+aerosols+from+suspensions%2C+solutions+and+biological+agents+%283%29>>
37. SWINGFOG. *Swingtec*. [Online] [Citace: 2. Srpen 2013]. Dostupný z URL:
<<http://www.swingtec.de/thermal-fogging-machines/swingfog.htm>>
38. Persteril. *eurosarm.cz*. [Online] [Citace: 2. srpen 2013]. Dostupný z URL:
<<http://www.eurosarm.cz/web/structure/katalog-produktu-persteril-36-313140401000-15.html>>
39. ChiroSan Plus - Bochemie. *Bochemie Group a. s.* [Online] 2013. [Citace: 12. červenec 2013]. Dostupný z URL:
<<http://www.bochemie.cz/download.aspx?dontparse=true&FileID=4683>>
40. Kohrsolin® FF. *Dezinfekce BODE*. [Online] 2013. [Citace: 12. červenec 2013]. Dostupný z URL:
<<http://www.bode.cz/dokumenty/produkty-dezinfekce-hygiena/inf-letak-kohrsolin-ff.pdf>>
41. Korsolex® basic. *Dezinfekce BODE*. [Online] 2013. [Citace: 12. červenec 2013]. Dostupný z URL:
<<http://www.bode.cz/dokumenty/produkty-dezinfekce-hygiena/inf-letak-korsolex-basic.pdf>>
42. surface-disinfection-sanosil-super-25.htm. *www.sanosil.com*. [Online] [Citace: 14. červenec 2013]. Dostupný z URL:
<<http://www.sanosil.com/pdf/desp66en-sanosil-super-25-manual-.pdf>>
43. Koncentrované dezinfekční prostředky na plochy. *www.ecolabcz.cz*. [Online] [Citace: 17. červen 2013]. Dostupný z URL:
<<http://www.google.cz/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&ved=0CDAQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.ecolabcz.cz%2Findex.php%2F>>

3Fdown%3DIncidin_OxyDes_2009_cz.pdf%26path%3DOTHER%2F&ei=st8J
UtGAD4THtQb83oHQBA&usg=AFQjCNGZMpgI1yTcirai1F3NrMj7qqlsPA&
sig2=wU>

44. **Sagripanti JL, Bonifacino A.** Comparative sporicidal effect of liquid chemical germicides on three medical devices contaminated with spores of *Bacillus subtilis*. *Am J Infect Control*. 24, 1996 , Sv. 5.
45. **B., Šlitrová.** POROVNÁNÍ CITLIVOSTI BACILLUS SUBTILIS A CLOSTRIDIUM DIFFICILE VUCI VYBRANÝM CHEMICKÝM LÁTKÁM. *BAKALÁRSKÁ PRÁCE*. Brno : Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2008.
46. Česká společnost pro sterilizaci . *Předpisy a normy pro sterilizaci - v.b.r.doc*. [Online] [Citace: 23. leden 2013]. Dostupný z URL: <http://hormart.cz/css/files/Predpisy_normy_sterilizace.pdf>
47. PERSTERIL. *Eurošarm* . [Online] [Citace: 16. červenec 2013]. Dostupný z URL: <http://www.eurosarm.cz/web/document/cms_library/uskvbl-persteril-es-91.pdf>
48. **s.r.o., CS Technologies.** Testy účinnosti. *www.sanosil.cz*. [Online] CS Technologies s.r.o. [Citace: 14. červenec 2013]. Dostupný z URL: <<http://www.sanosil.cz/testy-ucinnosti>>
49. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals . *oecd.org*. [Online] [Citace: 22. leden 2013]. Dostupný z URL: <<http://www.oecd.org/env/ehs/testing/oecdguidelinesforhetestingofchemicals.htm>>

7 SEZNAM ILUSTRACÍ

Obr. 1	Spektrum účinku dezinfekčních látek	33
Obr. 2	Pracoviště velkoobjemového zkušebnictví	47
Obr. 3	Místnost bezpečnostní smyčky	56
Obr. 4	Mobilní modulární laboratoř 6,6	57
Obr. 5	mlžný opar v laboratoři, kde bylo aplikováno 5 l dekontaminačního roztoku	66
Obr. 6	umístnění testovaných vzorků pod rošt na dno jímací nádrže	67
Obr. 7	umístnění testovaných vzorků pod rošt na dno jímací nádrže	75
Obr. 8	Petriho misky používané k agarovému testu	75

8 SEZNAM TABULEK

Tab. 1	Nejpravděpodobněji zneužitelní biologičtí původci a onemocnění	21
Tab. 2	Doba expozice přípravku ChiroSan Plus na mikroorganismy v závislosti na koncentraci	51
Tab. 3	Doba expozice přípravku Incidin OxyDes na mikroorganismy v závislosti na koncentraci	52
Tab. 4	Doba expozice přípravku Kohrsolin® FF na mikroorganismy v závislosti na koncentraci	53
Tab. 5	Doba expozice přípravku Korsolex® basic na mikroorganismy v závislosti na koncentraci	54
Tab. 6	Doba expozice přípravku Persteril® na mikroorganismy v závislosti na koncentraci	55
Tab. 7	Testované dekontaminační přípravky	56
Tab. 8	Testování účinku dezinfekčních přípravků na mikroorganismus <i>B. anthracis</i>	69
Tab. 9	Testování účinku dezinfekčních přípravků na mikroorganismus <i>B. atrophaeus</i>	70
Tab. 10	Testování účinku dezinfekčních přípravků na mikroorganismus <i>E. coli</i>	71
Tab. 11	Testování účinku dezinfekčních přípravků na mikroorganismus <i>Staphylococcus aureus</i>	72
Tab. 12	Testování účinku dezinfekčních přípravků na mikroorganismus <i>Streptococcus pneumoniae</i>	73
Tab. 13	Orientační finanční rozpočet pro testované koncentrace	77