

Kvalitativní analýza vybraných čisticích prostředků pomocí plynové chromatografie a jejich antimikrobiální účinek

Bc. Jana Němcová

Diplomová práce
2020

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Jana Němcová**
Osobní číslo: **T18361**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie tuků, detergentů a kosmetiky**
Forma studia: **Kombinovaná**
Téma práce: **Kvalitativní analýza vybraných čisticích prostředků pomocí plynové chromatografie a jejich antimikrobiální účinek**

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši se zaměřením na vybranou skupinu čisticích prostředků a obsah účinných složek.
2. Popište vybrané vzorky.
3. Charakterizujte vzorky pomocí plynové chromatografie s využitím techniky headspace.
4. Stanovte a srovnajte antimikrobiální účinek vybraných vzorků.
5. Získaná data přehledně zpracujte a kriticky zhodnoťte s ohledem na obsah účinné složky či kombinaci účinných složek.

Forma zpracování diplomové práce: **Tištěná/elektronická**

Seznam doporučené literatury:

1. PAULSON, Daryl S. Handbook of topical antimicrobials: industrial applications in consumer products and pharmaceuticals. New York: Marcel Dekker, c2003, x, 452 s. ISBN 0-8247-0788-5. Dostupné také z: <http://www.loc.gov/catdir/enhancements/fy0647/2002031088-d.html>.
2. MITSUI, T. New Cosmetic Science. Amsterdam: Elsevier, 1997, x, 499 s. ISBN 978-0-444-82654-1. Dostupné také z: <https://www.sciencedirect.com/book/9780444826541/new-cosmetic-science#book-info>.
3. FLICK, Ernest W. Cosmetics Additives – An Industrial Guide. Noyes: William Andrew Publishing, 1991, x, 886 s. ISBN 0-8155-1255-4 Dostupné také z: <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpCAAIG00W/cosmetics-additives-an/cosmetics-additives-an>.
4. CHOI, Na R. Identification and quantification of seven volatile n-nitrosamines in cosmetics using gas chromatography/chemical ionization mass spectrometry coupled with head space-solid phase micro-extraction. TALANTA. Amsterdam: Elsevier, 2016, 148, 69-74 s. ISSN 0039-9140. Dostupné také z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914015304112?via%3Dihub>.
5. Časopisecké a knižní zdroje dostupné prostřednictvím knihovny UTB ve Zlíně.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Martina Pummerová, Ph.D.**
Centrum polymerních systémů

Datum zadání diplomové práce: **2. ledna 2020**

Termín odevzdání diplomové práce: **15. května 2020**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

doc. Ing. Marián Lehocký, Ph.D.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 20. února 2020

PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

- diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – diplomovou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování diplomové práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem diplomové práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Prohlašuji,

- že jsem diplomové práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá problematikou dezinfekčních prostředků určené pro dezinfekci povrchů a dezinfekci pokožky. Teoretická část práce obsahuje vymezení pojmů týkající se této problematiky se zaměřením na hygienickou čistotu především z hlediska mikrobiální kontaminace. Dále jsou teoreticky popsány techniky dezinfekce a použité metodiky testování dezinfekčních prostředků.

Praktická část se zabývá kvalitativní analýzou komerčně dostupných přípravků a jejich porovnání s recepturou dezinfekčního přípravku dle doporučení světové zdravotnické organizace. Antimikrobiální účinnost zkoumaných dezinfekčních prostředků byla zkoumána pomocí diskové difúzní metody a ČSN EN 1040. V rámci praktické části diplomové práce byla v laboratoři zavedena jednak metodika na plynovém chromatografu a také testování podle normy zmíněné výše.

Výsledky analýzy modelových vzorků dezinfekčních prostředků plynovou chromatografií ukázaly, že vhodné kombinovat více technik pomohou přesnější identifikaci většího počtu látek obsažených ve výrobcích. Všechny testované vzorky vykazovaly dezinfekční účinnost. Porovnáním výsledků plynové chromatografie a antimikrobiálního účinku vzorků bylo zjištěno, že nejvýhodnější z hlediska antimikrobiálního účinku je kombinace etanol, propan-2-olu a kvarterní amoniové sloučeniny.

Klíčová slova: Čisticí prostředek, dezinfekce, plynová chromatografie, antimikrobiální účinek

ABSTRACT

This diploma thesis connected with the issue of disinfectants intended for surfaces and skin disinfection, respectively. The theoretical part of the work contains the definitions of terms related to this issue. It is focused on hygienic cleanliness, especially in terms of microbial contamination. Furthermore, disinfection techniques and used methods of testing disinfectants are theoretically described.

The practical part deals with the qualitative analysis of commercially available products and their comparison with the disinfectant formulation prepared according to the recommendations of the World Health Organization. The antimicrobial efficacy of the investigated disinfectants was evaluated using the disk diffusion method and ČS EN 1040. The methodology of gas chromatograph and testing according to the standard mentioned above were introduced in the laboratory.

The results of the analysis of model disinfectant samples by gas chromatography demonstrated that it is appropriate to combine few techniques to help accurately identify a larger number of substances contained in products. All tested samples showed disinfectant efficiency. The comparison of the gas chromatography results and the antimicrobial effect of the samples confirmed that the most advantageous composition, in terms of antimicrobial effect, is the combination of ethanol, propan-2-ol and the quaternary ammonium compound.

Keywords: Detergent, disinfectant, gas chromatography, antimicrobial effect

Ráda bych poděkovala Ing. Martině Pummerové, Ph.D., za vedení a odborné rady, a Ing. Daniele Veselé a Ing. Haně Pištěkové za pomoc s praktickou částí v laboratoři. Velké poděkování patří i celé mojí rodině, která se mnou prožívala mé studijní úspěchy i neúspěchy a měli se mnou trpělivost.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD.....	10
I TEORETICKÁ ČÁST.....	11
1 PROBLEMATIKA HYGIENICKÉ ČISTOTY	12
1.1 SANITACE.....	12
1.2 DEZINFEKČNÍ ÚČINEK NA MIKROORGANISMY	14
1.2.1 Obranný mechanismus mikroorganismů proti dezinfekčnímu účinku	14
1.2.2 Odolnost mikroorganismů vůči dezinfekčním prostředkům.....	15
1.2.3 Růst a množení mikroorganismů	16
1.2.4 Významné druhy mikroorganismů.....	17
1.3 REDUKCE POČTU MIKROORGANISMŮ.....	20
1.3.1 Mechanismus dezinfekčního účinku na mikroorganismy.....	21
2 DEZINFEKČNÍ PROSTŘEDKY	22
2.1 NEČISTOTY.....	23
2.2 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ DEZINFEKČNÍ PROCES	24
2.3 ROZDĚLENÍ DEZINFEKČNÍCH PROSTŘEDKŮ	25
2.3.1 Formy dezinfekčních prostředků.....	25
2.3.2 Způsoby aplikace dezinfekčních prostředků.....	26
2.4 SPEKTRUM DEZINFEKČNÍ ÚČINNOSTI	27
2.5 LEGISLATIVA DEZINFEKČNÍCH PROSTŘEDKŮ	27
2.6 TESTOVÁNÍ ÚČINNOSTI DEZINFEKČNÍCH PROSTŘEDKŮ	28
3 METODY DEZINFEKCE.....	30
3.1 FYZIKÁLNÍ METODY DEZINFEKCE	30
3.1.1 Fyzikální metody využívající mokré (vlhké) teplo	30
3.1.2 Fyzikální metody využívající suché teplo.....	31
3.1.3 Ultrafialové záření.....	31
3.1.4 Filtrace.....	31
3.2 CHEMICKÉ METODY DEZINFEKCE.....	32
3.2.1 Dezinfekce na bázi alkoholu	33
3.2.2 Dezinfekce na bázi halogenů a látek uvolňující „aktivní halogeny“	34
3.2.3 Aldehydy	35
3.2.4 Kvartérní amoniové sloučeniny	36
3.2.5 Peroxygeny.....	36
4 METODY TESTOVÁNÍ DEZINFEKČNÍCH PROSTŘEDKŮ	38
4.1 PLYNOVÁ CHROMATOGRRAFIE.....	38
4.1.1 Mobilní fáze	38
4.1.2 Dávkovací zařízení.....	39
4.1.3 Chromatografická kolona.....	40
4.1.4 Detektor.....	40
4.2 STANOVENÍ ANTIMIKROBIÁLNÍ ÚČINNOSTI.....	41
4.2.1 Princip diskové difúzní metody	41

4.2.2	Princip metody ČSN EN 1040	41
II	PRAKTICKÁ ČÁST	43
5	CÍL PRÁCE	44
6	MATERIÁL A METODIKA	45
6.1	POPIS VZORKŮ DEZINFEKČNÍCH PROSTŘEDKŮ	45
6.2	KVALITATIVNÍ ANALÝZA	51
6.2.1	Přístrojové vybavení.....	51
6.2.2	Analýza dezinfekcí – kapalný nástřik	52
6.2.3	Analýza dezinfekcí – headspace	52
6.3	STANOVENÍ ANTIMIKROBIÁLNÍ ÚČINNOSTI.....	53
6.3.1	Použité mikroorganismy	53
6.3.2	Inokulace použitých mikroorganismů	54
6.3.3	Disková difúzní metoda	54
6.3.4	Mikrobiologické testování podle ČSN EN 1040	55
7	VÝSLEDKY A DISKUZE	62
7.1	KVALITATIVNÍ ANALÝZA GC/MS	62
7.1.1	Kapalný nástřik	62
7.1.2	Headspace	66
7.2	STANOVENÍ ANTIMIKROBIÁLNÍ ÚČINNOSTI.....	69
7.2.1	Disková difúzní metoda	69
7.2.2	ČSN EN 1040.....	72
	ZÁVĚR	76
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	77
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	85
	SEZNAM OBRÁZKŮ	87
	SEZNAM TABULEK.....	88

ÚVOD

V současné době jsou nejen v nemocnicích, ale i v potravinářských a kosmetických provozech kladeny vysoké nároky na hygienu přípravy výrobku, sanitárního zařízení i společných prostor. V době epidemických nebo pandemických onemocnění se klade velký důraz na hygienu rukou. Mytí rukou je nejdůležitějším a nejúčinnějším preventivním opatřením ovlivňujícím přenos infekčních agens. Gely na bázi alkoholu nebo jiné dezinfekce na ruce jsou vynikajícími virucidy a baktericidy proti gastrointestinálním i respiračním patogenům. Systematické přezkoumání účinnosti alkoholových roztoků pro hygienu rukou ukázala, že eliminace výskytu mikroorganismů těmito přípravky vyžaduje kratší dobu účinku a méně dráždí pokožku než mytí rukou mýdlem a vodou nebo jinými antiseptickými detergenty. [1]

Etanol je sloučenina široce používaná na některých pracovištích (např. v nemocnicích) a je přítomna ve značném množství kosmetických výrobcích, např. v ústní vodě či dezinfekcích na ruce.

Dezinfekční prostředky na bázi alkoholu se běžně používají jako chirurgická antiseptika rukou, ale také na rychlou dezinfekci povrchů a malých předmětů. Většina těchto dezinfekčních prostředků obsahuje buď propan-2-ol, etanol, n-propanol, nebo jejich kombinaci. Obsah alkoholu v těchto dezinfekčních prostředcích je obvykle mezi 60 % a 95 %, protože bylo prokázáno, že mají nejvyšší míru antimikrobiální účinnosti. [2; 3]

Na trhu je velká řada různých dezinfekčních prostředků, ale trendy vedou k používání šetrných čisticích prostředků pro životní prostředí.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 PROBLEMATIKA HYGIENICKÉ ČISTOTY

1.1 Sanitace

Pojem **sanitace** je definován jako spojení čištění, dezinfekce, dezinfekce, deratizace a dalších opatření (péče o čistotu pracovního prostředí atd.), které zabezpečují plnění hygienických a protiepidemických požadavků daných platnými právními předpisy. Sanitace je nedílnou součástí protiepidemického režimu ve zdravotnictví a v dalších oborech (potravinářství a farmacii), kde se provádí činnost epidemiologicky závažná. Zákon č. 258/2000 Sb., o ochraně veřejného zdraví v aktuálním znění vymezuje epidemiologicky závažné činnosti. Sanitace se provádí především proto, aby se zajistila mechanická a mikrobiální čistota prostředí, nástrojů, ploch. Sanitační úkony musí být poprány v sanitačním řádu. Sanitaci provádí pouze odborně zaškolený personál, který je vybavený vhodnými pomůckami, ochrannými a účinnými prostředky. [4; 5; 6]

Čištění je odstranění kontaminace z povrchu v míře nezbytné pro další zpracování nebo pro zamýšlené použití. Požadavky na čisticí prostředky se liší podle oblasti a zařízení, které má být čištěno. Proto se čisticí prostředky vyrábí pro speciální účely, jako je čištění výrobních zařízení, podlah, stěn a další účely. Při výběru čisticí směsi je třeba vzít v úvahu povahu čištěného povrchu, který se má vyčistit, dále způsob aplikace a oblast a druh zařízení, které se má vyčistit. Čisticí prostředky musí být hospodárné, netoxické, nekorozivní, nespékavé, neprašné, snadno měřitelné, stabilní během skladování a snadno rozpuštěné. [4; 5; 6]

Dezinfekce je definována jako soubor opatření zaměřených na zneškodnění vegetativních forem mikroorganismů pomocí fyzikálního, chemického nebo kombinovaného (fyzikálně-chemického) postupu. Cílem dezinfekce je přerušit cestu nákazy od zdroje k vnímanému jedinci. Dezinfekce je součástí technologických postupů, protiepidemického režimu ve zdravotnictví a hygienických režimů v provozech vykonávajících epidemiologicky závažnou činnost. To je například potravinářská, zemědělská, kosmetická a farmaceutická výroba a oblast služeb. Dezinfekci dělíme podle vztahu ke konkrétní epidemiologické situaci, a to na běžnou ochrannou a speciální ochrannou dezinfekci. [4; 6; 7; 8]

Běžná ochranná dezinfekce předchází vzniku infekčních onemocnění. Je součástí běžného čištění, technologických a pracovních postupů. Provádí se v době, kdy se infekční

onemocnění nevyskytuje. Běžná ochranná dezinfekce je součástí komplexních hygienických opatření. [6]

Speciální ochranná dezinfekce nebo také nazývána jako ohnisková dezinfekce je odborná činnost zaměřená na likvidaci původců nákaz v ohnisku nákazy. Cílem této dezinfekce je zabránit dalšímu šíření infekce. Pro dosažení cíle dezinfekce se vychází ze znalosti cest a mechanismů přenosu infekčních nemocí. Důležité je stanovit účinnost dezinfekčních prostředků a způsob dezinfekce na usmrcení původců infekčních onemocnění. Musí se brát v potaz i vedlejší nepříznivé účinky dezinfekčního zásahu na dezinfikovaný materiál. Speciální ochranná dezinfekce se rozděluje podle časového sledu na průběžnou a konečnou ohniskovou dezinfekci. [6]

Průběžná ohnisková dezinfekce, se zaměřuje na zneškodňování infekčních činitelů, které jsou vylučované infekčně nemocným člověkem, zvířetem nebo nosičem do okolí. Provádí se systematicky v okolí infekčně nemocného jedince od počátečních projevů infekčního onemocnění, až do ukončení vylučování infekčních činitelů. [6]

Konečná (závěrečná) ohnisková dezinfekce je jednorázovou akcí, kterou má být prostředí zbaveno mikroorganismů po kontaminaci nemocným nebo nosičem. Tento typ dezinfekce bývá širší a důkladnější než průběžná ohnisková dezinfekce a provádí se po ukončení pobytu nemocného nebo nosiče. [6; 7]

Dezinsekce je soubor opatření, jejichž záměr je potlačení obecně škodlivých a epidemiologicky významných členovců. Mezi nejrozšířenější epidemiologicky významné členovce v našich podmínkách řadíme štěnice domácí (*Cimex lectularius*), švábový hmyz (rus domácí – *Blattella germanica*) a mravence faraon (*Monomorium pharaonis*). Dezinsekce je aplikována způsobem mechanickým, fyzikálním, chemickým, biologickým a také kombinací biologického a mechanického způsobu. [9]

Deratizace je soubor opatření, jejichž záměrem je potlačení obecně škodlivých a epidemiologicky významných hlodavců a dalších živočichů. Mezi nejrozšířenější epidemiologicky významné živočichy v našich podmínkách řadíme především potkana obecného (*Rattus norvegicus*), myš domácí (*Mus musculus*) a holuba domácího (*Columba livia f. domestica*). Hlodavci mohou přenášet některé infekce, např. leptospirózy, salmonelózy, tularémie. Deratizace se provádí způsobem mechanickým, fyzikálním, chemickým nebo biologickým. [9]

1.2 Dezinfekční účinek na mikroorganismy

Dezinfekce zneškodňují různé druhy mikroorganismů pomocí různých mechanismů. Mikroorganismy se nachází na všech nesterilizovaných materiálech. Jsou to biologické substance, které mohou být přínosem nebo potencionálním nebezpečím pro člověka. Mikroorganismy mohou kontaminovat potraviny i kosmetické výrobky. Mikrobiologická kontaminace je určitá forma znečištění, při které se mění zdravotní nezávadnost. Kontaminované potraviny mohou způsobit alimentární onemocnění (otrava z potravin). Kontaminace může být primární nebo sekundární. Mikroorganismy při **primární kontaminaci** jsou přítomny v surovině již před započítím vlastní výroby výsledného produktu. **Sekundární kontaminace** vzniká v průběhu vlastního výrobního procesu, například z prostředí, z rukou pracovníka nebo ze strojů a výrobních zařízení. [5; 10; 11]

Procesy dezinfekce lze životní funkce mikroorganismů ovlivnit buď reverzibilně, což znamená dočasnou ztrátu schopnosti množení buněk a pokles růstové aktivity mikroorganismů, nebo ireverzibilně, to je trvalé usmrcení mikroorganismů. [12]

1.2.1 Obranný mechanismus mikroorganismů proti dezinfekčnímu účinku

Mikroorganismy tvoří mikrobiální společenství (biofilm), kterým se chrání před nepříznivými vlivy vnějšího prostředí. Biofilmy jsou jednodruhová nebo vícedruhová společenství obalená extracelulární polymerní matrix a jsou nevratně přichycená k povrchu či mezifázovému rozhraní. Mohou obsahovat bakterie *Pseudomonas fragi*, *Enterococcus spp.* a *Pseudomonas fluorescens*, i patogeny, jako je *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* nebo *Salmonella*. Mikrobiální buňky biofilmu se fyziologicky odlišují od planktonických buněk stejného organismu. Planktonické buňky jsou jednotlivé buňky, které se mohou vznášet nebo plavat v kapalném médiu. Buňky v biofilmu mají změněný fenotyp (růstové vlastnosti) oproti planktonickým buňkám. Povlak bakterií nebo plochá kolonie není považována za biofilm, pokud nemají tyto buňky změněný fenotyp. Mikrobiální látky obsažené v biofilmu jsou odolnější vůči chemické dezinfekci a ovlivňují tak dezinfekční proces. [13; 4; 14; 15; 16]

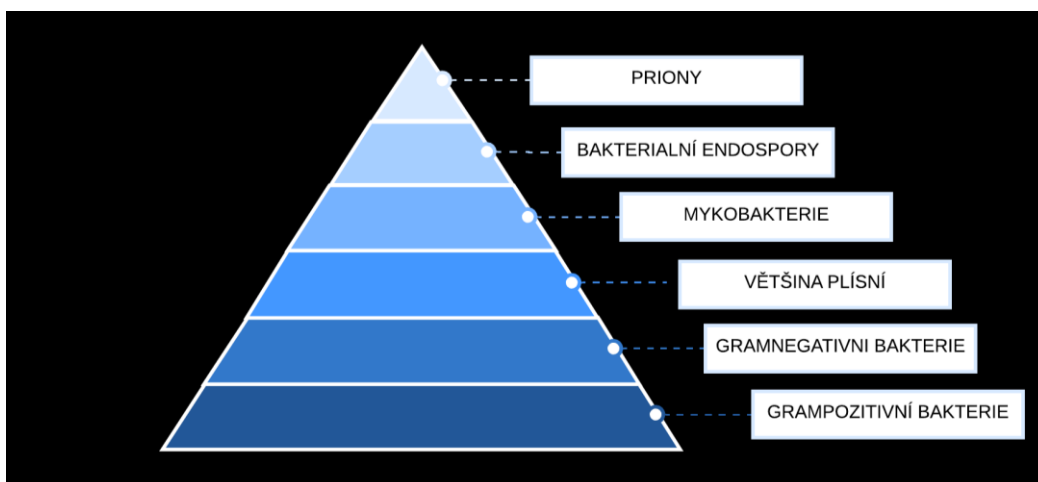
Další obranný mechanismem mikroorganismů (zejména bakterií) proti dezinfekčním prostředkům je rezistence, což je schopnost bakteriální populace přežít účinek inhibiční koncentrace příslušné antimikrobiální látky. Přírozená rezistence proti dezinfekčním prostředkům mohou vznikat například mutací. Získaná rezistence vzniká příjmem

genetického materiálu ve formě plazmidů či transpozonů. Z tohoto důvodu je nutné obměňovat dezinfekční prostředky a kontrolovat účinnost dezinfekčních procesů. [15]

1.2.2 Odolnost mikroorganismů vůči dezinfekčním prostředkům

Mikroorganismy mají různou úroveň (Obr. 1.) odolnosti vůči širokospektrálním dezinfekčním prostředkům. Buněčná membrána nebo typ proteinového obalu mikroorganismu primárně zvyšuje odolnost (rezistenci) proti dezinfekci. Obecně lze říct, že gram negativní bakterie jsou odolnější vůči dezinfekčním aplikacím než gram pozitivní bakterie. Důvod odolnosti gram negativních bakterií je ve složení buněčné membrány, která je tvořena hydrofobními lipopolysacharidy (LPS), zatím co membrána gram pozitivní bakterií je tvořena nepružnou vrstvou peptidoglykanu. Existují i gram pozitivní bakterie (např. *Bacillus*, *Clostridium* atd.), které produkují endospory odolnější o několik stupňů než sama bakterie. To je způsobeno nepropustností polypeptidů, které jsou součástí povlaku spor. [17]

I umístění mikroorganismu (v suspenzi nebo na povrchu) má vliv na odolnost mikroorganismu vůči dezinfekčním prostředkům. V suspenzi se bakterie snadněji usmrcují oproti bakteriím přichyceným na povrchu. Bakterie na povrchu se přichycují pomocí fimbrií anebo tvoří mikrobiální společenství (biofilm) a tím je složitější je z povrchu odstranit. Odstranění mikroorganismů, ovlivňuje i čas kontaktu dezinfekčních prostředků a mikroorganismu. [17]



Obrázek 1: Pyramida resistance mikroorganismů k běžným dezinfekčním prostředkům [17]

1.2.3 Růst a množení mikroorganismů

Mikrobiální růst, který kontaminuje výrobky je nežádoucí, proto se rozsáhlé studie zabývají růstovými křivkami a snaží se je popsat matematickými modely, protože se jedná o závažný přenos mikroorganismů. Typický růst v uzavřeném prostředí má čtyři rozeznatelné fáze a lze jej schematicky znázornit růstovou křivkou. První fáze je klidová a pak nastává fáze exponenciální, fáze stacionární a fáze odumírání. V klidové fázi se buňka ještě nemnoží tak rychle, zpravidla se enzymaticky připravují na růst v novém prostředí. Délka této fáze závisí na tom, jak jsou buňky enzymaticky připraveny na růst v novém prostředí. Nastává syntéza RNA, enzymů a ostatních molekul. Ve fázi exponenciální fáze (log fáze, logaritmická fáze) jsou buňky novému prostředí plně přizpůsobeny. Probíhá intenzivní množení bakterií a populace dosahuje exponenciálního růstu. Rychlost nárůstu počtu bakterií, je individuální vlastnost každého bakteriálního kmene, ale závisí i na vnějších podmínkách. Tato fáze trvá do té doby, dokud nejsou vyčerpány živiny. V předposlední fázi stacionární se postupně zpomaluje rychlost množení buněk, až do stádia rovnováhy, kdy se počet buněk zhruba nemění. Je vyčerpáno živné médium a akumulují se toxické produkty. Fáze odumírání má kultivační prostředí natolik zhoršené, že začíná převyšovat počet odumřelých buněk počet buněk vzniklých. [5; 18; 16; 19]

Faktory ovlivňující růst a množení mikroorganismů

Pro správnou volbu dezinfekce je nutné znát faktory ovlivňující růst a množení mikroorganismů. Mezi faktory patří dostupnost živin, pH, oxidačně redukční potenciál, vodní aktivita a přítomnost přirozených látek s antimikrobiálním účinkem. [16; 5]

Hodnota pH silně ovlivňuje růst mikroorganismů i jejich činnost. Každý mikroorganismus se může rozmnožovat pouze v určitém rozmezí pH, hnilobné a patogenní mikroorganismy rostou optimálně při pH 6,0 až 7,2, kvasinky rostou spíše v kyselém prostředí a plísně v neutrálním prostředí, ale mohou růst i v rozmezí pH od 2,0 do 11,0. [20]

Každé prostředí má určitý oxidačně redukční potenciál, který je dán přítomností oxidačního nebo redukčního činidla. Oxidačně redukční potenciál prostředí se vyjadřuje jako rozdíl potenciálů mezi platinovou elektrodou (umístěnou do daného prostředí) a normální vodíkovou elektrodou. Vztah mikroorganismů ke kyslíku je značně odlišný, a proto také vyžadují různé oxidačně redukční potenciál. Aerobní mikroorganismy vyžadují přítomnost rozpuštěného kyslíku, a tedy pozitivní oxidačně redukční potenciál a na anaerobní

mikroorganismy působí kyslík a pozitivní oxidačně redukční potenciál škodlivě, v některých případech má dokonce letální účinek [21]

Vodní aktivita (a_w) je míra využitelnosti vody v potravinech pro růst mikroorganismů a je definována jako poměr parciálního tlaku vodní páry nad potravinou ku parciálnímu tlaku vodní páry čisté vody za určité teploty. Hodnota a_w není totožná s celkovým obsahem vody v potravinách, který určuje obsah volné i vázané vody v potravinech. [22; 23]

Některé potraviny obsahují přirozené antimikrobiální látky (koření, minerální oleje, česnek, med a hořčice). [22; 23]

Mikroorganismy jsou do určité míry schopny se přizpůsobit vnějším podmínkám, aby byly odolnější vůči nepříznivým podmínkám vnějšího prostředí. Mají také schopnost měnit vnější podmínky ve svém nejbližším okolí (např. změna pH), ale pouze do určité míry. Pohyblivé druhy mikroorganismů se mohou pohybovat směrem ke zdroji živin nebo kyslíku a oddalují se od zdroje toxických látek. V dezinfekčních procesech se nepříznivé vlivy prostředí používají v boji proti nežádoucím mikroorganismům. [16; 5]

1.2.4 Významné druhy mikroorganismů

Různorodé skupiny mikroorganismů jsou schopné růst na potravinářských podkladech podél infrastruktur potravinářského průmyslu i na pokoze. Tento růst pak může vést k tvorbě biofilmů. Dezinfekční postupy jsou voleny podle složení mikrobiálního prostředí [12; 24]

Bakterie

Bakterie představují největší skupinu mikroorganismů a vyskytují se téměř všude v přírodě. Většina bakterií je neškodná a některé jsou dokonce i prospěšné. Člověk má na povrchu a uvnitř těla mnoho bakterií a s mnohými je v symbióze. Velikost bakteriálních buněk se mění podle rodů a někdy i podle druhu, závisí i na stáří kultury a kultivačních podmínkách. Většinu bakterií je možné pozorovat pod světelným mikroskopem. Bakteriální buňky mají rozmanité tvary, nejčastěji tvar tyčinkovitý nebo kulovitý (koky), někdy ohnuté nebo stočené do šroubovice. Tvar vláknitý mají převážně půdní bakterie. Bakteriální buňky se svým chemickým složením neliší od buněk živočišných nebo rostlinných. Skládá se z nukleových kyselin (DNA a RNA), bílkovin (stavebních a katalytických), lipidů, sacharidů a pigmentů. Struktura bakteriální buňky je tvořena jádrem, cytoplazmou, ribozomy, inkluzemi, cytoplazmatickou membránou, buněčnou stěnou a dále obsahuje slizový obalem, pouzdro, bičíky a fimbrie. Bakterie nemají ohraničené buněčné jádro jadernou membránou na rozdíl

od vyšších organismů. Genetický materiál se nachází v cytoplasmě ve formě nukleotidu. Buněčná stěna (BS) bakterií se až na malé výjimky nachází nad cytoplazmatickou membránou. BS je pevná, elastická a propustná pro soli a nízkomolekulární sloučeniny a plní funkci skeletu buňky, uděluje tvar buňce a mechanicky chrání vnitřní prostředí buňky. Buněčná stěna má i chemicky odolnost, proti záření, vysychání i proti nepříznivým osmotickým podmínkám. Ochranná funkce BS je významná při dezinfekčních procesech. Strukturu buněčné stěny rozdělujeme na dva základní typy na gram pozitivní a gram negativní BS. Každý typ BS jinak odolává dezinfekčním prostředkům. [12; 24; 16; 25; 26]

Buněčná stěna gram pozitivní bakterie je skladbou jednodušší než u gram negativní. Stěna je tvořena vrstvou peptidoglykanu, který se skládá z vrstev polysacharidových řetězců, v němž se střídá N-acetylglukosamin a N-acetylmuramová kyselina. Na rozdíl od gram negativní BS bakterií jsou u gram pozitivní téměř všechny zbytky N-acetylmuramové kyseliny spojeny peptidickým můstkem, důležité pro výběr antimikrobiálních látek. Skrz peptidoglykanovou vrstvu prostupují řetězce kyseliny teichoové, která má funkci antigenu (navozuje produkci protilátek). Příkladem gram pozitivního patogenu mohou být bakterie *Listeria monocytogenes*, které jsou všudypřítomný, nebezpečný, potravinový patogen. Mohou být přítomny v mořských plodech, mléčných výrobcích, masu, ovoci, nepasterizovaném mléku nebo v drůbeži. [12; 24; 16; 25; 26]

Buněčná stěna gram negativní bakterie je oproti gram pozitivní BS tenčí a skládá z tenké vrstvy peptidoglykanu a vnější membrány, která je tvořena dvojrstvou fosfolipidů a bílkoviny. Vnější membrána je připojena k peptidoglykanu prostřednictvím lipoproteinů. Na zevní straně membrány jsou lokalizovány lipopolysacharidy, které dávají buňce antigenní vlastnosti. Příkladem gram negativní bakterie mohou být bakterie *Pseudomonas spp.* [12; 24; 16; 25; 26]

Viry

Viry jsou nejmenší patogenní organismy, jejich velikost se pohybuje v rozmezí 24-300nm. Viry se klasifikují do třech skupin podle velikosti, a to na viry malé, střední a velké. Lze je pozorovat pouze elektronovým mikroskopem. Všechny viry obsahují nukleovou kyselinu (nukleoid), která je obklopená kapsidou, což je bílkovinný obal. Nukleokapsida je komplex nukleové kyseliny a kapsidy. Viry jsou obligatorní nitrobuněční parazité, jejichž množení je závislé na funkci hostitelské buňky, protože nemají enzymatické vybavení. Mají vždy jen jeden typ nukleonové kyseliny, a to buď ribonukleovou (RNA) anebo deoxyribonukleovou

(DNA), ale nikdy obě. Viry obsahující deoxyribonukleovou kyselinu se nazývají DNA viry a RNA viry obsahují kyselinu ribonukleovou. Viry je možné klasifikovat podle typu hostitele, a to na viry rostlinné, živočišné a bakteriální (Bakteriofágy). Viry rostlinné způsobují četné choroby rostlin. Členovce a obratlovce včetně člověka napadají viry živočišné a bakteriofágy napadají bakterie. Reprodukční cyklus virů probíhá obecně v sedmi fázích. První fáze je vazba virionu na povrch buňky a dále následuje proniknutí (penetrace) do buňky, uvolnění nukleové kyseliny, syntéza virových proteinů, zrání (maturace) virionů a končí uvolnění virionů z buňky. [6; 25; 27; 19]

Priony

Priony jsou proteinové částice, které postrádají genetickou informaci ve formě nukleové kyseliny. Prionový protein (PrP) je přítomen u mnoha buněk v lidském těle, ale nejvíce je zastoupen v nervových buňkách. Změnou prostorového uspořádání prionového proteinu (PrP) vznikne nová patogenní varianta PrP, která je silně hydrofobní a má tendenci k agregaci (shlukování). Agregací vznikne patogenní oligomer PrPSc (Sc – scrapie), který je původcem neurodegenerativních onemocnění lidí a zvířat. Důvod změny prostorového uspořádání prionového proteinu na patogenní variantu není znám. Molekuly PrPSc jsou odolné vůči působení tepla a také jsou mimořádně rezistentní vůči všední dezinfekci a sterilizaci. Priony se množí pomalu, pro prionová onemocnění je typická dlouhá inkubační doba. Prionová onemocnění jsou neurodegenerativní a projevují se změnami v chování, poruchami koordinace pohybů a končí vždy smrtí jedince. Mezi nejznámější lidské prionové onemocnění řadíme Creutzfeldt-Jakobova nemoc (CJD), Kuru a bovinní spongiformní encefalopatie (známá spíše pod zkratkou BSE). [27; 28; 29; 30; 31]

Plísňe

Plísňe jsou mikroskopické vláknité eukaryotní organismy, které jsou řazeny mezi houby. Rozmnožují se jednak rozrůstáním vláken (hyf), jednak sporami (jsou jednobuněčné či vícebuněčné). Spory kontaminují povrchy a předměty, kde následně při příznivých podmínkách vyklíčí. Ze spory vyklíčí vlákno (hyfa), které se rozrůstá. Potřebné živiny absorbují z okolního prostředí. Plísňe se šíří i rozrůstáním hyf a jejich úlomků. Rostou v nejružnějším prostředí a materiálech, k růstu nepotřebují světlo, jsou nenáročné na živiny, vyhovuje jim vlhko. Optimální teplota pro růst plísni zahrnuje široké rozmezí v závislosti na druhu plísni, obvykle v rozmezí 18–28 °C. Některé druhy plísni rostou i při – 10 °C nebo + 60°C. Navíc mají schopnost vhodně si upravit pH prostředí substrátu, v němž rostou. Podle

rozmnožování jsou technicky důležité plísně rozděleny do třech taxonomických jednotek (*Zygomycetes*, *Ascomycotina* a *Deuteromycotina*). Plísně patří mezi významné alergeny (mykoalergózy), některé druhy produkují plísňové jedy přímo do potravin a způsobují onemocnění mykotoxikóza, některé způsobují onemocnění kůže a nehtů (onychomykóza), jiné vyvolávají život ohrožující onemocnění u oslabených jedinců. Pro likvidaci plísní na předmětech či v prostorech je důležité vybrat vhodný dezinfekční prostředek a vhodnou metodu. Dezinfekční přípravky na plísně se vybírá podle aplikace na určitý typ materiálu, na kterém plísně rostou, podle rozsahu nárůstu a podmínek prostředí. Aktivní látky v chemických dezinfekčních přípravcích zajišťující fungicidní účinek jsou aktivní chlor, aldehydy a jejich deriváty, alkoholy, kvartérní amoniové sloučeniny, organické kyseliny, peroxosloučeniny, sloučeniny jódu a kovů. Používají se i fyzikální metody dezinfekce – var, UV záření, parní dezinfekční přístroje. [32; 33]

Kvasinky

Kvasinky jsou označovány jako jednobuněčné houbové mikroorganismy, které náleží do řádu hub (Fungi), kam patří i plísně. Rozmnožují se pučením nebo se dělí. Většiny druhů mají schopnost zkvašovat monosacharidy a některé disacharidy i trisacharidy na ethanol a oxid uhličitý, čímž si zasloužily svůj český název. Z hlediska zdraví člověka mohou způsobovat povrchové mykózy, zejména v oblasti pochvy a dutiny ústní. V našich podmínkách se nejčastěji vyskytují *Candida albicans*, *Candida glabrata* nebo *Candida tropicalis*. [33; 26; 27]

Parazité

Parazité jsou jednobuněčné nebo vícebuněčné organismy žijící na úkor hostitele. Vyvolávají alimentární parazitární onemocnění související s nízkou hygienickou úrovní, špatnými návyky, nedostatečnou výživou a poruchami imunity. Parazité v lidském těle se dělí podle lokalizace postižené tkáně. Vyvolavateli infekčních onemocnění jsou prvoci a červi (tasemnice, škrkavka, svalovec). [6]

1.3 Redukce počtu mikroorganismů

Na usmrcení nebo inaktivaci mikroorganismů pomocí dezinfekce se dá pohlížet z různých úhlů pohledu. A to tak, že různé dezinfekční prostředky napadají mikroorganismy různými mechanismy, nebo naopak, různé druhy mikroorganismů se liší svou odolností vůči různým dezinfekčním prostředkům. [15]

1.3.1 Mechanismus dezinfekčního účinku na mikroorganismy

Mechanismus účinku antimikrobiálních látek na mikroorganismy je možné rozdělit na základě chemických reakcí, které lze rozdělit:

- Hydrolyza
- Koagulace bílkoviny v buňce
- Mechanické disrupce
- Oxidace
- Tvorba solí s bílkovinami
- Zásah do enzymatického systému
- Změna permeability buněčné membrány [15]

2 DEZINFEKČNÍ PROSTŘEDKY

Dezinfekční prostředky (DP) spolu s antiseptiky (látky určené k zneškodnění mikroorganismů na kůži, nikoliv na vnitřní užití) spadají do skupiny antimikrobiálních látek. Antimikrobiální látky jsou takové, které ničí nebo inhibují růst mikroorganismů v závislosti na jejich koncentraci a podmínkách použití. Dále do této skupiny lze zahrnout chemické konzervační látky a také léky používané při léčbě infekčních chorob rostlin a zvířat. [4; 34]

Při výběru DP je nutné brát v úvahu několik aspektů, a to především charakter nečistot, které mají být odstraněny. Důležitý je i materiál dezinfikovaného povrchu, který má být ošetřen. Dále tvrdost vody, která může ovlivnit účinnost detergentu, který je někdy součástí DP. Je nutné si stanovit hygienický standart, kterého je třeba dosáhnout a definovat frekvence. Kdy bude dezinfekce prováděna. Tato frekvence závisí hlavně na rychlosti zašpinění dezinfikovaného objektu a nebezpečnosti nečistot. Čím větší jsou tyto dva aspekty, tím vyšší je frekvence dezinfekce. Rutinní dezinfekce by měla být doplněna důkladnějšími zásahy čištění a dezinfekce, které se provádějí občas. Pro zajištění dezinfekčních procesů je nutné vytvořit nepřetržitý monitorovací systém, který kontroluje účinnost a koriguje dezinfekční procesy. Součástí monitorovacího systému je pravidelné shromažďování a vyhodnocování dat. [35]

Dezinfekční prostředky mají obecně několik základních vlastností. Mezi tyto základní vlastnosti patří dobrá snášenlivost s pokožkou, široké spektrum účinku dezinfekčních prostředků v nízkých koncentracích, usmrcení mikroorganismu v co nejkratším časovém úseku, snadné ředění roztoků DP a snadná biologická odbouratelnost DP bez vzniku reziduí. Dezinfekční prostředky nesmí být toxické pro člověka a musí být minimalizující riziko vzniku alergií. Tyto prostředky nesmí mít nepříjemný zápach, mají neutrální zápach nebo jsou obohaceny o aromatickou složku. Nesmí poškodit dezinfikovaný materiál. Tato vlastnost je mimo jiné významná u dezinfekce kovových nástrojů, kde je vyžadován antikorozi účinek. Je důležité zmínit i finanční dostupnost DP a bezpečný způsob používání DP. I vhodný obal a balení (např. snadné dávkování, dobrá manipulovatelnost s balením) patří mezi základní vlastnosti DP. [7; 15]

Většina komerčních značek dezinfekčních přípravků neobsahuje pouze jednu aktivní složku, ale aspoň čtyři aktivní složky. Charakteristické aktivní složky jsou například alkoholy, halogeny, kvartérní amoniové sloučeniny a mnoho dalších. Aktivní složky v dezinfekčních prostředcích zlepšují škálu aktivity, rychlost působení nebo snadnější inaktivaci

mikroorganismů. Mají také své aplikační vlastnosti a vlastní omezení při používání. Součástí DP jsou ještě další přísady, které upravují barvu, viskozitu nebo jiné specifické vlastnosti. Častý kontakt s některými složkami dezinfekce může způsobit podráždění pokožky nebo vyvolat alergickou reakci. [36; 37]

Dezinfekční proces ovlivňuje počet a druh mikroorganismů na povrchu. Dezinfekční prostředek je účinnější na jednodruhové populaci mikroorganismů než smíšené. DP pravděpodobně neusmrtí všechny mikroorganismy, část zůstane životaschopná. Počet mikroorganismů, které přežily, závisí na stavu populace, dostupnosti živin a době mezi opakovanými aplikacemi dezinfekčního prostředku. [17]

2.1 Nečistoty

Nečistoty lze definovat jako nežádoucí materiál, který zůstává na povrchu. Jsou tvořeny směsí látek, které se mohou lišit velikostí (makroskopické nebo mikroskopické), povahou a původem. Například nečistoty v potravinářství jsou převážně tvořeny zbytky potravin, chemickými sloučeninami, mikroorganismy, prachem z prostředí. V jakýchkoliv výrobních prostorech mohou být zdroji nečistot používaná voda, vnější prostředí a personál ve výrobě. Snadnost odstranění nečistot závisí na jejich rozpustnosti. Nečistoty je možné rozdělit podle rozpustnosti na rozpustné ve vodě, emulzích, kyselinách nebo zásadách a nerozpustné částice. [35]

Mastné nečistoty

Tento typ nečistot lze odstranit horkou vodou. Při použití příliš vysokých teplot nicméně může nastat polymerace, při které vzniknou těžce odstranitelné produkty. Pro úplné odstranění mastných nečistot je nutné použít alkalického soli s emulgačními nebo saponifikačními vlastnostmi. [35]

Proteinové nečistoty

Tyto nečistoty se velmi špatně odstraňují, protože mají lepkavé vlastnosti a tendenci denaturovat. Pro odstranění jsou zapotřebí alkalické roztoky s proteolytickými vlastnostmi, ke kterým jsou přidávány zvlhčovadla pro zvýšení rozpustnosti. [35]

Sacharidové nečistoty

Jednoduché sacharidy lze snadno odstranit vodou a polysacharidy (škroby) jemnými detergenty. [35]

Anorganické nečistoty

Většina anorganických solí je rozpustná ve vodě, ale některé mohou za specifických podmínek tvořit sraženiny, které je obtížné odstranit. Například při působení tepla nebo v zásaditém pH tvoří horečnaté soli nerozpustné sloučeniny. Tyto sraženiny mohou ohrozit hygienickou úroveň systému, protože usnadňují adhezi jiných nečistot (např. mikrobiální povahy). Anorganické nečistoty mohou také způsobit korozi a narušit účinnost některých detergentů a dezinfekční prostředků. [35]

Nerozpustné nečistoty

Nerozpustné nečistoty (písek, jíl nebo jemné kovové částice) mohou být odstraněny použitím detergentu. [35]

2.2 Faktory ovlivňující dezinfekční proces

Je několik faktorů ovlivňující dezinfekční proces. Jeden z faktorů je okolní prostředí (teplota, vlhkost, pH) a dále dezinfekční prostředek (jeho typ, koncentrace), typ materiálu textilie a její savost (pokud je použita), aplikační metoda dezinfekčního přípravku a metoda stírání. [35]

Zvýšení teploty prostředí může v určitých mezích zvyšovat rozpustnost nečistot a usnadňuje jejich odstranění. Zvýší se rychlosti dezinfekčního procesu, čímž je proces efektivnější. Jak již bylo uvedeno, je nutné přihlédnout ke skutečnosti, že příliš vysoké teploty mohou bránit odstranění, jak již bylo popsáno výše. [35]

Relativní vlhkost a teplota vzduchu podporují rychlost odpařování dezinfekčního prostředku, např. u předimpregnovaných dezinfekčních utěrek. To poukazuje na nutnost správného zabalení dezinfekčních utěrek výrobcem, následně správné skladování dle doporučení výrobce. Relativní vlhkost a teplota vzduchu mohou také ovlivňují rychlost vypařování kapalin z ošetřených povrchů, což ovlivňuje mikrobicidní účinnost při povrchové dezinfekci. [38; 35]

Hodnota pH je obvykle při dezinfekci neutrální, i když kyselé pH zlepšuje účinnost dezinfekčních prostředků. [35]

Čím delší je kontaktní doba mezi dezinfekčním prostředkem a povrchem, tím je odstraňování nečistot účinnější. Na plochy svislé nebo šikmé je vhodné použít dezinfekční prostředky

ve formě gelu, pěny, které k dezinfikovanému povrchu přilnou a prodlouží se kontaktní doba. [35]

Koncentrace dezinfekčního prostředku záleží na typu aktivní složky (každá složka má jinou optimální koncentraci pro použití), ale musí být také upravena na množství a kvalitu nečistot a na vlastnosti systému. [36; 37; 35]

Druh a četnost stírání, stejně jako tlak vyvíjený během stírání, může velmi ovlivnit výsledek dezinfekce. Tyto faktory patří mezi obtížnější proměnné, které lze v praxi regulovat. Jakékoliv standardizované testování textilií a stírání se však musí přesně řídit těmito faktory pro reprodukovatelná data o účinnosti textilie a hodnotit všechny testované produkty za stejných zkušebních podmínek. [35]

Mechanické čištění před procesem dezinfekce zvyšuje účinnost dezinfekčního prostředku. Mechanickou očistu je možné provádět kartáčem (za předpokladu, že nepoškrábají povrchové plochy), proudem nebo tlakem. [35]

2.3 Rozdělení dezinfekčních prostředků

K obecnému rozdělení dezinfekčních prostředků je možné pohlížet z několika hledisek. Rozdělujeme je podle formy DP, způsobu aplikace, spektra účinnosti, místa použití a účinných látek (chemického složení). [8]

2.3.1 Formy dezinfekčních prostředků

Dezinfekční prostředky se vyrábějí v kapalně, plevné a plynné formě. Kapalná forma DP je roztok nebo aerosol. Pevná forma DP je dále rozdělena na prášky, granuláty, tablety a suchý aerosol. Plynná forma DP zahrnuje ozon a plynný chlor. [15]

Další formou jsou samodezinfekční povrchy, které se vyrábí potahováním povrchů např. těžkými kovy, jako je například měď nebo stříbro. Tyto kovy mají přirozeně antimikrobní vlastnosti. Další možností vytvoření samodezinfekčního povrchu aplikace organokovové sloučeniny nebo jiné antimikrobiální látky, jako je například kvartérní amoniové skupiny, které si zachovávají svou antimikrobiální aktivitu po týdny nebo měsíce. [39; 40; 41]

2.3.2 Způsoby aplikace dezinfekčních prostředků

Při použití dezinfekčních přípravků se vždy postupuje dle návodu výrobce. Dezinfekce je prováděná ponorem, vtíráním, otřením, postřikem, plynováním, odpařením par a pěnou. [7]

Dezinfekce ponorem se provádí ponořením předmětu do dezinfekčního roztoku. Roztok se připravuje rozpuštěním odměřeného (odváženého) množství dezinfekčního prostředku a důkladně se rozmíchá ve vodě. Dezinfekční roztok se připravuje pro každou pracovní směnu čerstvý, podle stupně zatížení biologickým materiálem i častěji. [15]

Dezinfekce vtíráním se provádí vetřením dezinfekčního prostředku do pokožky. Tento způsob aplikace můžeme vidět například u antibakteriálních gelů na ruce.

Dezinfekce otřením je možné provádět dvěma způsoby, a to klasickou aplikací DP a poté otření jednorázovou utěrkou nebo je možné použít dezinfekční ubrousky. [15]

Dezinfekční ubrousky jsou nasycené zředěným dezinfekčním prostředkem a dalšími chemickými látkami, např. povrchově aktivní látkami, konzervačními složkami, enzymy, parfémů a tak dále. Předimpregnované dezinfekční utěrky se široce používají v potravinářském průmyslu a v domácnostech. Tento typ aplikace dezinfekce našel široké využití i v nemocnicích a zdravotnických střediscích pro dekontaminaci zdravotnických prostředků a povrchů. Využívání ubrousků se neustále zvyšuje díky jejich pohodlné implementaci v praxi a spolehlivému účinku. Problém může nastat při nevhodné kombinaci aktivní látky (kvartérních amoniových sloučenin) s nevhodnou textilií ubrousků. Taková nevhodná kombinace může vést více či méně k rušení antimikrobiální aktivity dezinfekčních ubrousků. Poté by ubrousky sloužily pouze jako čistící ubrousky, nikoli dezinfekční, což by mohlo vystavit spotřebitele zbytečnému riziku. Dalším problémem jsou nádoby na uskladnění ubrousků, které v případě špatného vyčištění mohou být zdrojem patogenů (např. *Pseudomonas aeruginosa*). [42; 37]

Dezinfekce postřikem lze dělit na dezinfekci postřikem s hrubšími kapénkami a aerosoly. Dezinfekce s hrubými kapénkami je používána na dezinfekci kůže, rukou a ploch. Dezinfekce aerosoly je používána na dekontaminaci ovzduší, ploch či předmětů. [15; 42]

Dezinfekce plynováním (fumigace) se provádí v uzavřených prostorách. Pomocí tohoto typu aplikace se likvidují plísňové spory a štěnice domácí (*Cimex lectularius*). [15]

Dezinfekce aplikovaná pěnou se používá na dekontaminaci stěn a stropů, ale také pro dezinfekci rukou. [15]

2.4 Spektrum dezinfekční účinnosti

Dezinfekční přípravky tvoří velmi rozmanitou skupinu chemických látek, které vyvolávají změny pro přežití mikroorganismů. [6; 15]

Při správném dezinfekčním procesu budou usmrceny mikroorganismy s použitím DP, které mají v názvu účinnosti koncovku – **cidní**:

- Bakteriocidní
- Fungicidní
- Tuberkulocidní
- Mykobaktericidní
- Sporocidní
- Virucidní [6; 15].

Při dezinfekčním procesu bude omezena metabolická aktivita a množení mikroorganismů po použití DP, který má v názvu účinnosti koncovku – **statický**:

- Bakteriostatický
- Fungistatický
- Sporistatický [6; 15].

Účinnost chemického DP je možné odvodit prostřednictvím fenolového koeficientu. Ten se zjistí komparací sledované účinné látky s působením vodného roztoku fenolu o koncentraci 1 %. [15]

2.5 Legislativa dezinfekčních prostředků

DP popisované v této práci spadají do skupiny biocidních přípravků. Biocidní přípravky redukují organismy, které jsou škodlivé pro zdraví lidí nebo zvířat a dále redukují organismy, které poškozují přírodní nebo syntetické materiály. Biocidní přípravky jsou rozděleny na dezinfekční prostředky, konzervační látky, regulátory živočišných škůdců a jiné biocidní přípravky. Biocidní přípravky reguluje evropský předpis, a to Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 528/2012 o dodávání biocidních přípravků na trh a jejich používání. Na biocidní přípravky a účinné látky se vztahuje čl. 31 nařízení REACH (nařízení (ES) č. 1907/2006) a také nařízení CLP (nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí). Národním předpisem je zákon

č. 324/2016 Sb., o biocidních přípravcích a účinných látkách a o změně některých souvisejících zákonů (zákon o biocidech). [43]

2.6 Testování účinnosti dezinfekčních prostředků

Pro kontrolu účinnosti dezinfekčních prostředků se používají metody chemické a mikrobiologické. Chemické metody jsou kvalitativní a kvantitativní a stanovují aktivní látky a jejich obsah v dezinfekčních přípravcích. Dále mikrobiologické metody, které se používají ke zjištění účinnosti dezinfekčních přípravků nebo mikrobiální kontaminace vydezinfikovaných povrchů (stěry, otisky, oplachy aj.). [42]

Robert Koch už v roce 1881 zavedl testování dezinfekčních prostředků. Dnes se testováním zabývá na mezinárodní úrovni Organizace pro ekonomickou spolupráci a rozvoj (OECD-Organisation for Economic Co-Operation and Development), na evropské úrovni testování zajišťuje Evropský výbor pro normalizaci (CEN- Comité Européen de Normalisation). [42; 44]

Testování mimo Evropské společenství

V USA a Kanadě je testování dezinfekčních přípravků regulováno úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) a oddělením odpovědným za federální zdravotní politiku v Kanadě (HC - Health Canada). Jmenované instituce se odkazují na normy ASTM International (American Society for Testing and Materials). [42; 44; 45; 46]

Testování v Evropě

Evropský výbor pro normalizaci CEN (Comité Européen de Normalisation) připravil technický dokument TC 216 Chemické dezinfekční přípravky a antiseptika. Skutečný vývoj těchto technických dokumentů provádějí pracovní skupiny (WG - working groups), které tvoří základní princip norem. Technický dokument TC 216 Chemické dezinfekční přípravky a antiseptika má čtyři pracovní skupiny. WG 1 je zaměřená na humánní medicínu, WG 2 na veterinární aplikaci, WG3 na hygienu potravin, domácí a institucionální aplikace a poslední skupina WG 5 se zabývá strategickou skupinou. Cílem dokumentu TC 216 bylo vyvinout standardizované zkušební metody ve třech fázích. [42; 44]

Ve fázi 1 jsou kvantitativní suspenzní testy. Tyto testy prokazují, že vyvíjené účinné látky nebo produkty mají baktericidní, fungicidní nebo sporicidní aktivitu bez ohledu na konkrétní oblasti použití. Testy této fáze nelze použít pro žádné tvrzení o produktech. [42; 44]

Fáze 2 je složená ze dvou kroků. První krok zahrnuje kvantitativní suspenzní testy, které prokazují, že produkt má baktericidní, fungicidní, kvasinkovou, mykobaktericidní, tuberkulocidní, sporicidní nebo virucidní aktivitu za simulovaných praktických podmínek vhodných pro zamýšlené použití. V druhém kroku jsou kvantitativní laboratorní testy, které prokazují, že produkt má baktericidní, fungicidní, kvasinkovou, mykobaktericidní, tuberkulocidní, sporicidní nebo virucidní aktivitu, pokud je aplikován na povrch nebo pokožku za simulovaných praktických podmínek (povrchové, přístrojové, ruční mytí a zkoušky ručních kartáčů). [42; 44]

Fáze 3 zahrnuje testy, které se uskutečňují v terénu za reálných podmínek. Metodika pro tento typ testů není ještě k dispozici, ale v budoucnu by měla být. [42]

3 METODY DEZINFEKCE

Běžné metody dezinfekce mohou být obecně rozděleny do dvou skupin – fyzikální a chemické procesy. [7]

3.1 FYZIKÁLNÍ METODY DEZINFEKCE

Nejpoužívanější fyzikální metody dezinfekce jsou aplikace různých forem tepla ultrafialové (UV) a radiační záření. Fyzikální metody využívající teplo jsou nejvíce používané a spolehlivé techniky dezinfekce. Metody využívající teplo lze rozdělit na dva typy. První typ dezinfekce je založen na použití mokrého (vlhkého) tepla a druhého typu je založen na použití suchého tepla. [34]

Mezi fyzikální metody se často řadí i filtrace, ale ta se nepovažuje skutečně za biocidní, protože základním principem účinku filtrace je odstranění mikrobiální kontaminace, nikoliv jejich inaktivace. Fyzikální metody dezinfekce jsou obecně ekologicky výhodnější oproti chemickým metodám. [34]

3.1.1 Fyzikální metody využívající mokré (vlhké) teplo

Metody fyzikální dezinfekce využívající vlhkého tepla (syté vodní páry) jsou velmi jednoduché a účinné. Mezi postupy zahrnující využití mokrého tepla lze zařadit var ve vodě za atmosférického tlaku a var v přetlakových nádobách. Tyto metody jsou energeticky výhodnější než metody se suchým teplem díky využití vody v kapalně nebo plynné formě, která má vyšší kapacitu přenášet teplo na povrch než suchý vzduch. [34; 47; 48]

Var za normálního tlaku

Jednorázový var ve vodě při teplotě 100 °C nemá sterilizační účinek, protože nejsou inaktivovány bakteriální spory. Pro dosažení sterilizačního účinku je možné použít var opakovaně (třikrát po dobu varu 30 minut) s přestávkami 16-24 hodin, v nichž dojde k vyklíčení spor a následný var je inaktivuje. [34; 47; 48]

Var pod tlakem

Metoda varem pod tlakem se provádí ve varných tlakových sterilizátorech, kde se používá se teplota kolem 135 °C a tlak 0,3 MPa nebo pomocí sterilizace nasycenou vodní párou pod tlakem v autoklávu (při teplotě 120 °C a tlak 100 kPa). [34; 47; 48]

3.1.2 Fyzikální metody využívající suché teplo

Fyzikální dezinfekce suchým teplem probíhá na stejném principu jako dezinfekce mokrým (vlhkým) teplem, ale bez přítomnosti vlhkosti. U dezinfekce suchým teplem jsou vyžadovány vyšší teploty a doba působení, aby byl účinek srovnatelný s metodou používající vlhké teplo. Dezinfekce suchým teplem se realizuje žíháním (vytavením) a spalováním. Měli byt metoda žíhání účinná, musí se vypalovaný předmět rozpálit do červena a pozvolna vychladnout. Tato metoda se běžně používá v mikrobiologických laboratoři na bakteriologické kličky. Dezinfekci nebo sterilizaci suchým teplem lze dosáhnout na zařízeních, které nazýváme jako konvekční pece nebo horkovzdušné sterilizátory. Zařízení ohřívají vzduch do teplot až 200 °C. Ve zdravotnictví i jiném průmyslu můžeme dezinfikovat suchým vzduchem například jehly, sklo a některé další materiály, které snesou teplotu do 200 °C. Některé materiály nejsou vhodné pro dezinfekci suchým teplem, kvůli riziku poškození (předměty z gumy, plastu, hedvábí atd.). Horkovzdušná metoda ve farmacii a kosmetice používána na některé základy pudrů, olejů a základy mastí. [47; 34; 48]

3.1.3 Ultrafialové záření

Ultrafialové (UV) záření působí v rozsahu vlnových délek od 100 do 380 nm a při 254 nm má největší bakteriocidní účinek. UV záření neproniká do hloubky, působí pouze na povrchu. Takže i při sterilizaci čirých kapalin je nutné počítat jen s povrchovým účinkem (do hloubky 0,1-1 mm). Při vyšší relativní vlhkosti vzduchu se zvyšuje účinnost UV záření. Mechanismus inaktivace mikroorganismů je založen přerušением molekulárních vazeb v DNA a RNA absorpcí fotonů, což vede k tvorbě pyrimidinových dimerů z thyminu a cytosinu. UV záření je používané v podobě germicidních lamp, používá se na dezinfekci kapalin, vzduchu a povrchů. Nejčastěji se rutinně dezinfikuje voda (pitná a odpadní), emulze a tekutá jídla. UV záření se nepoužívá pouze pro antimikrobiální účinek, ale lze použít také pro deodorizaci, dechloraci, deozonaci. [34; 49; 48]

3.1.4 Filtrace

Pomocí filtrace je možné odstraňovat kontaminanty z kapalin a plynů. Filtrace je jedna z nejstarších a nejpoužívanějších fyzikálních metod. Proces filtrace je velmi jednoduchý, kapalina nebo plyn prochází přes různé typy filtrů nebo membrán, které zadržují kontaminanty na základě velikosti jejich částic. Filtry jsou klasifikovány podle materiálu, z kterého jsou vyrobeny (duté vlákno, sklo, kov, keramika atd.) nebo podle konstrukce

(sítové a hloubkové filtry). Filtrace kapalin za účelem dekontaminace je velmi často používaná pro předúpravu, dezinfekci nebo sterilizaci vody. Dále se filtrace používá pro materiály, které jsou citlivé na teplotu (sterilní produkce antibiotik, vakcín a jiných léčiv). Filtry se používají pro dekontaminaci plynů, zejména vzduchu, kde je potřeba snížení přítomnosti patogenů a dalších kontaminantů. [34]

3.2 CHEMICKÉ METODY DEZINFEKCE

Metodou chemické dezinfekce jsou ničeny mikroorganismy roztokem nebo aerosolem dezinfekčních přípravků stanovené koncentrace a dobou působení pro požadované spektrum dezinfekční účinnosti. Při dezinfekci by měl být dodržován takzvaný dvoustupňový (dvouetapový) postup. [7]

První etapa **dvoustupňové dezinfekce** zahrnuje mechanickou očistu a druhá etapa je vlastní dezinfekce. Dezinfekci je možné provádět i v jedné etapě při použití dezinfekčních přípravků s mycími a čistícími vlastnostmi. [7; 4; 15]

Vyšší stupeň dezinfekce (VSD) je určen na předměty a zařízení (například ve zdravotnictví operační endoskopy), které nelze sterilizovat prostřednictvím dostupných metod sterilizace. Tento typ dezinfekce zaručuje usmrcení bakterií, virů, mikroskopických hub a některých bakteriálních spor. Nezaručuje usmrcení ostatních mikroorganismů, jako jsou například vysoko rezistentní spory, nebo vývojová stadia zdravotně významných červů a jejich vajíček. Při vyšším stupni dezinfekce se postupuje následovně. Nejprve je nutné před samotnou dezinfekcí dezinfikované předměty očistit, a to strojově nebo ručně a následně osušit. Pokud jsou předměty kontaminovány biologickým materiálem (například krev) je nutné použít pro očištění dezinfekční přípravek s virucidním účinkem, který zajistí zneškodnění virů. Do připraveného dezinfekčního roztoku se vkládají pouze vysušené předměty tak, aby byly naplněny všechny duté části. Po vyšším stupni dezinfekce je nutné odstranit rezidua dezinfekčního roztoku sterilní vodou (Aqua purificata zbavená mikroorganismů sterilizací) ve sterilní nádobě. Takto ošetřené předměty jsou po osušení vhodné k okamžitému použití nebo je lze krátkodobě skladovat kryté sterilní rouškou v uzavřených na označených kazetách nebo ve speciálních skříních. Všechny informace o tomto typu dezinfekce se zaznamenávají do deníku vyššího stupně dezinfekce. [7; 4; 15]

3.2.1 Dezinfekce na bázi alkoholu

Alkoholy jsou sloučeniny, které mají ve své molekule navázanou hydroxylovou skupinu. Alkoholy se používají na konzervaci, čištění a dezinfekci. Z hlediska osobní hygieny se pravděpodobně jedná o nejstarší antiseptickou látku, která se používala a používá na neporušenou i zraněnou kůži. [36; 15; 50]

Jako **konzervační látka na bázi alkoholu** se používá Fenoxyetanol v různých výrobcích, včetně kosmetických, oftalmologických roztoků a léčiv (např. vakcíny) a to obvykle v kombinaci s parabenem. Fenoxyetanol je především bakteriostatický a fungistatický biocid s omezeným spektrem aktivity. Účinný je především proti gram negativním bakteriím, včetně *Pseudomonas*.. [36; 15; 50]

Dezinfekční prostředky na bázi alkoholu se obecně vyznačují velmi dobrým bakteriocidním a fungicidním účinkem včetně účinku na mykobakterie. Absence sporicidního účinku je významná nevýhoda. Spory bakterií nejsou usmrceny, protože se alkoholy rychle vypařují a jejich účinek ve velmi krátké době mizí. Sporicidní aktivitu je možné docílit synergickým efektem tak, že alkohol se kombinuje s jinými biocidními látkami (např. povrchově aktivními látkami a peroxidem vodíku). Alkoholové dezinfekce jsou určeny na dezinfekci rukou a malých ploch, které nelze zvlhčit vodou. Nejčastěji obsahují metanol, etanol, propan-1-ol a propan-2-ol. Komerční dezinfekční prostředky bývají směsí několika různých druhů alkoholů s celkovou koncentrací alkoholu mezi 20 a 80 %. Koncentrace alkoholu v rozmezí 60 -70 % je nejúčinnější. Účinek dezinfekcí je založen na schopnosti koagulovat a denaturovat bílkoviny. Rutinní dezinfekce povrchů může být prováděna rozprašovačem nebo jednorázovými alkoholově napuštěnými ubrousky. Jako příkladem komerčních dezinfekčních prostředků na bázi alkoholu lze uvést Septoderm, Manox a Sterilium. [36; 15; 50]

Metanol je nejjednodušší alkohol, těkavá, hořlavá a velmi jedovatá látka, která se snadno zamění za etanol. Dříve se nazýval dřevný líh či dřevitý líh. Je plně mísitelný s vodou a dalšími alkoholy. Používá se jako rozpouštědlo, motorové palivo, denaturační činidlo v etanolu, a především jako surovina pro výrobu dalších chemikálií. [36; 51]

Etanol je součástí mnohých přípravků k hygienické a chirurgické dezinfekci rukou a pokožky. Má rychlý baktericidní a mykobaktericidní účinek, 70% etanol účinkuje během 30 sekund. Účinnost proti plísním a virům je značně pomalejší, 70% etanol účinkuje během 2 minut. Etanol vykazuje menší aktivitu účinnosti než propanoly. [6; 34]

3.2.2 Dezinfekce na bázi halogenů a látek uvolňující „aktivní halogeny“

Do skupiny halogenů řadíme prvky, které jsou fyzikálně odlišné, ale vykazují podobnost ve svých chemických reaktivitách. Do této skupiny patří fluor, chlor, brom a jod. Jako oxidační činidla jsou vysoce reaktivní. Nejreaktivnější je fluor, méně reaktivní je chlor, pak brom a nejméně je reaktivní jod. Chlor, jod a brom jsou často součástí dezinfekčních prostředků a antiseptik. [6; 34; 52]

Zdrojem chloru může být plynný chlor nebo může být součástí chlornanu nebo chloraminu. V přírodě se vyskytuje v redukováných formách jako sodná sůl (NaCl, kuchyňská sůl) a vápenné a draselné soli. Plynný chlor má silné dezinfekční účinky a je to velmi silné oxidovadlo. Antimikrobiální aktivita se u chloru může lišit v závislosti na koncentraci teplotě a pH. [34]

Chlornan vápenatý ($\text{Ca}(\text{ClO})_2$) je bílá pevná látka, která je v práškové nebo tabletové formě. Kapalné formy obsahují chlornan vápenatý nebo chlornan sodný (NaOCl). Chlornan se používá k povrchové dezinfekci, dezinfekci pitné vody, bazénů a jako bělicí činidlo. [34]

Oxid chloričitý (ClO_2) je poměrně nestabilní plyn, jako takový jej lze velmi obtížně skladovat či převážet. Ve většině případech se tedy vyrábí až v místě potřeby. Je syntetizovaný reakcí chloru a chlornanu sodného. Nevytváří žádné škodlivé vedlejší produkty jako trihalometany, ani nereaguje s amoniakem. Při správném použití se oxid chloričitý jeví 2,5krát více oxidační než chlornan sodný. Je účinný proti bakteriím, virům a sporám. Spóry *Bacillus subtilis* mohou vyklíčit, ale proces se zastaví z důvodu poškození membrány. Oxid chloričitý se používá pro čištění pitné vody, dezinfekci výrobních zařízení a jako bělicí činidlo na bělení papíru, skořápek vlašských ořechů, škrobu a mouky. [52; 53; 54]

Elementární jód (I_2) je modrošedá lesklá pevná látka, která také může sublimovat do modrofialového plynu s dráždivým zápachem. Jod je snadno rozpustný v organických rozpouštědlech, jako například v alkoholu nebo chloroformu. Přirozeně se vyskytuje v mořské vodě a v podzemních vodách. Jod lze i syntetizovat reakcí jodidu draselného se síranem měďnatým. Jód je mimořádně účinné antiseptikum, které působí na bakterie, plísňe, viry a patogenní prvky, ale současně i na spory. Jód se široce používá k dezinfekci povrchů a vybavení při výrobě potravin, ale využití má i v jiných oborech. Jód je méně reaktivní než chlor a zároveň je méně ovlivněn přítomností organických látek. Mezi negativní vlastnosti jodu patří zbarvení kůže a plastových výrobních dílů zařízení po jeho použití. Další

nevýhodou je jeho relativně vysoká cena ve srovnání s chlorem. Jod je možné aplikovat ve třech možných formulacích. Jedna z formulací je jodová tinktura, což je etanolový roztok jodu (2 % jodu a 2,2 % jodidu draselného v etanolu). Další formulace je vodný roztok jodu (5 % jodu a 10 % jodidu draselného ve vodě), který se nazývá Lugolův roztok. Třetí formulace obsahuje elementární jod, který je komplexován nebo vázán s vysokomolekulárními neutrálními polymery, včetně alkoholů, amidů a cukerných polymerů. Tyto komplexy jsou známé jako jodofory. Bakteriální spory (*B. cereus*, *B. subtilis* a *C. botulinum*) jsou odolnější vůči jodofórům. Studie ukázaly, že jód proniká do mikroorganismů a napadá specifické skupiny proteinů, nukleotidy a mastné kyseliny. Účinná koncentrace jodu je přibližně 100 mg/l, která je stejně účinná jako 300 mg/l chloru. [55; 52; 34]

3.2.3 Aldehydy

Aldehydy jsou aktivní proti široké škále mikroorganismů. Působí proti celé řadě bakterií, virů a spor. Dezinfekční prostředky na bázi aldehydů jsou snadno odstranitelné z povrchu a jsou biologicky odbouratelné. Aktivitu aldehydů snižují pozůstatky nečistot bílkovinné povahy. Aldehydy nezpůsobují žádné toxické problémy při použití v předepsaných koncentracích, ale je nutné upozornit, že formaldehyd může mít mutagenní účinky. Třemi hlavními zástupci aldehydů v dezinfekčních prostředcích jsou glutaraldehyd, orto-ftalaldehyd (OPA) a formaldehyd. [34; 56]

Molekula glutaraldehydu je jednoduchá, má ve své struktuře dvě aldehydové skupiny. Roztoky glutaraldehydu jsou bezbarvé, i když některé obsahují barvivo, které dodává roztoku jantarovou barvu. Charakteristickým rysem glutaraldehydu je silný zápach připomínající jablka. V komerčních dezinfekčních přípravcích je obvykle v množství od 1,5 až 3,5 %. Pro inaktivaci *E. coli* je doporučená koncentrace v rozmezí 0,08 až 1,6 % a pro sporicidní bakterie je obvykle postačující 2% roztok. Glutaraldehyd působí na bakteriální buňku chemickou reakcí a inhibuje metabolické a respirační systémy. Glutaraldehyd je v dezinfekčních přípravcích často kombinován s propan-2-olem (20 až 30%) a s 2% fenolem. [34; 56]

Orto-ftalaldehyd (OPA) je součástí dezinfekčních přípravků na lékařské nástroje. Účinkuje na bakterie (gram negativní a gram pozitivní), viry a spory při pH 8. [57]

Formaldehyd je bezbarvý plyn nepříjemného štiplavého zápachu, který je karcinogenní a mutagenní. Sterilizace pomocí formaldehydu je založená na působení plynné směsi formaldehydu s vodní párou v podtlaku o teplotě 60 až 80 °C při parametrech stanovených výrobcem. Tato metoda je určena především pro termolabilní materiály, kovové ostré nástroje a některé přístroje. Nedoporučuje se tato metoda na textil a papír. [6]

3.2.4 Kvartérní amoniové sloučeniny

Kvartérní amoniové sloučeniny (KAS) jsou nejznámějšími antimikrobiálními povrchově aktivními látkami, které se řadí do kationických tenzidů. Používají se v dezinfekčních systémech pro domácí a průmyslové čištění, zejména na čištění a dezinfekci pevných neporézních povrchů. Nejběžněji používanými biocidními kvartérními amoniovými solemi jsou alkylbenzyl dimethylové, alkyltrimethylové a dialkyldimethylové kvartérní sloučeniny. Jsou často kombinovány s dalšími germicidně působícími látkami (např. alkoholy). KAS jsou dražší ve srovnání s chlorem, ale delší dobu působí na dezinfikovaném povrchu (přibližně 1 den). Delší působení zabraňuje rychlému bakteriálnímu nárůstu, což je značná výhoda. Této výhody se využívá například v rybím průmyslu. Dezinfekční prostředek je silně fixovaný na povrch a obtížně se odstraňuje proudem vody, což vede k možnému stopovému množství v produktu. [58; 52; 59]

KAS jsou účinné proti vegetativním formám bakterií a obalovým virům. Nejúčinnější jsou proti gram pozitivním bakteriím. Při vyšších koncentracích je možné inaktivovat kvasinky a plísně. KAS jsou nejúčinnější v rozsahu pH 6 až 10, což omezuje jejich použitelnost v kyselém prostředí. [58; 52; 59]

3.2.5 Peroxygeny

Hlavními zástupci skupiny peroxygenů je peroxid vodíku a kyselina peroctová. Peroxygeny jsou oxidační činidla. Kromě mnoha chemických využití mají oxidační činidla silné antimikrobiální účinky. Peroxygeny jsou obecně účinnější proti gram pozitivním bakteriím než gram negativním. Sporicidní účinek je dosahován koncentrací mezi 10 a 30 %. Nevýhoda peroxygenů je, že způsobují korozi nástrojů, vybavení a jsou agresivní vůči lidské pokožce. Nicméně vývoj a používání antikoročních látek v přípravcích obsahujících peroxygeny tuto nevýhodu eliminuje. [56; 34]

Peroxid vodíku (H₂O₂) je bezbarvá kapalina, která je komerčně dostupná v koncentraci 3 % až 90 %. Je používán v medicíně, průmyslu a v domácnostech. V potravinářském průmyslu

se běžně používá 35% peroxid vodíku. Používá se na sterilizaci obalových materiálů před jejich plněním a na sterilizaci povrchu zeleniny a ovoce, ale také např. na sterilizaci kontaktních čoček. Peroxid vodíku se považuje za šetrný k životnímu prostředí, protože se rozkládá na vodu a kyslík. [56; 34]

Komerčně je **kyselina peroctová ($\text{CH}_3\text{CO}_3\text{H}$)** dostupná jako bezbarvá kapalina v roztoku o koncentraci 5 % až 37 %, jako směs vody, peroxidu vodíku a kyseliny octové. Působí rychleji než peroxid vodíku. Kyselina peroctová má širokospektrální účinek proti bakteriím, virům, kvasinkám a sporám. Napadá proteiny v buněčné stěně, ale také proniká do buňky, kde narušuje vnitřní buněčné struktury. Je výrazně méně stabilní než roztoky peroxidu vodíku, proto se pro dezinfekční účely používá ve směsi s peroxidem vodíku a dalšími komponenty. [56; 34]

4 METODY TESTOVÁNÍ DEZINFEKČNÍCH PROSTŘEDKŮ

Diplomová práce se zabývá kvalitativní analýzou dezinfekčních prostředků se zaměřením na plynovou chromatografii kapalného dezinfekčního prostředku metodou kapalného nástřiku vzorku v porovnání s analýzou nasycených par nad vzorkem technikou headspace. Z hlediska účinnosti dezinfekčních prostředků se jako vypovídající jeví stanovení jejich antibakteriálního účinku.

4.1 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie (GC) je analytická metoda určená k separaci a stanovení plynů, kapalin i pevných látek s bodem varu do cca 400 °C. Princip metody je založen na rozdělování složek mezi dvě fáze, a to mezi fází stacionární, která je nepohyblivou fází a fází mobilní, která se definovaně pohybuje. U plynové chromatografie je mobilní fáze taktéž nazývána nosným plynem. Stacionární fáze je pevně fixovaná v chromatografické koloně. Separace látek u plynové chromatografie probíhá tak, že kolonou přes stacionární fází prochází proud nosného plynu. [60; 61]

Plynová chromatografie má několik výhod. Jednou je, že se jedná o rychlou analýzu, která obvykle trvá několik jednotek až desítek minut. Tato metoda je efektivní, s vysokým rozlišením. Jedná se o vysoce přesnou analýzu, která vyžaduje malé množství vzorku (obvykle μl). Analýza je poměrně jednoduchá a spolehlivá. [60; 61]

Plynový chromatograf je složen z několika hlavních částí. Přístroj je tvořen zdrojem plyné (mobilní) fáze, čistícím zařízením (záleží na čistotě nosného plynu), zařízením na regulaci tlaku, resp. průtoku plyné fáze, dávkovacím zařízením (autosampler, pokud je dostupný), chromatografickou kolonou, termostatem, detektorem a zařízením na zpracování a záznam signálu detektoru a vyhodnocení analýzy. Stanovení v přístroji probíhá buď za konstantní teploty, nebo podle zvoleného teplotního programu. [60; 61]

4.1.1 Mobilní fáze

Mobilní fáze (nosný plyn) unáší vzorek kolonou a chemicky nereaguje se vzorkem. Nosné plyny jsou skladovány v tlakových lahvích. Tlakové lahve jsou opatřeny redukčním ventilem, který redukuje vstupní a výstupní tlak. V plynové chromatografii je nejpoužívanějším nosným plynem helium, které je kompatibilní se všemi běžnými detektory. Vodík je taktéž čteně používán, někdy nahrazuje drahé helium. Vodík může

poskytnout rychlejší a účinnější separace než hélium, ale to se nedoporučuje z důvodu vzniku možného požáru a výbuchu. Na mobilní fázi je možné použít i argon a dusík. Volbu mobilní fáze ovlivňuje několik zásadních faktorů a to viskozita, účinnost, čistota, reaktivita, inertnost, bezpečnost, typ používaného detektoru a cena nosného plynu. [61; 62]

4.1.2 Dávkovací zařízení

Dávkovacím zařízením vstupuje vzorek do systému plynové chromatografie. Je několik metod, jak nadávkovat vzorky do injektoru. Kapalný vzorek je možné dávkovat pomocí injekčních stříkaček přes pryžové septum. Další možností je provádět nástřik pomocí statického nebo dynamického head-space dávkovacího systému. Existují další dávkovací techniky (např. solid phase microextraction - SPME), kterými se tato diplomová práce nezabývá, proto zde nejsou uvedeny.

Nejběžnějším typem nástřiku je tzv. kapalný nástřik pomocí injekční stříkačky. Na obrázku 2. je ukázaná injekční stříkačka pro kapalné vzorky, která má tělo vyrobené z borosilikátového skla, píst stříkačky a dutá jehla je z nerezavějící oceli. Injekční stříkačka je vpíchnuta do systému přes pryžové septum. Vzorek je vtlačen pístem přes jehlu do systému. Pro nástřik plyných vzorků se používá plynotěsná stříkačka. Statický head-space (HS) dávkovací systém slouží k izolaci a stanovení těkavých látek přítomných v pevných, plyných nebo kapalných vzorcích. Při této metodě je vzorek v injekční lahvičce (vialce) temperován, dokud se nevytvoří rovnováha mezi pevnou/kapalnou a plynou fází. Headspace vialka má obvykle objem 10 nebo 20 ml. Pro vytvoření rovnováhy mezi fázemi je důležitá vhodná kombinace teploty a délky temperování vzorku. Velmi často bývá používána kombinace 50 °C po dobu 30 min, ale možnosti jsou rozmanité v závislosti na konfiguraci zařízení, a především na povaze samotného vzorku (např. 60 °C a 25 min nebo 35 °C a 60 min). Po temperování následuje odebrání definovaného objemu plyné fáze vzorku, který je převeden do chromatografické kolony. Odběr vzorku lze provést buď manuálně plynotěsnou injekční stříkačkou (obrázek 2. vpravo), nebo použít automatický dávkovací systémy (autosampler). Pro kvalitativní analýzu může být vzorek umístěn přímo do HS vialky a mohou se zanedbat další přípravy vzorku. U kvantitativní analýzy je nezbytné optimalizovat parametry pro dosažení přesnosti. [63; 64]



Obrázek 2: Dávkovací stříkačka pro kapalný vzorek (vlevo) a pro headspace techniku (vpravo) [65; 66]

Metoda dynamické head-space se využívá pro adsorpci a desorpci těkavých složek vzorku pod inertním plynem na sorpční trubici. Těkavé analyty jsou zachyceny v sorpční trubici, kde jsou drženy až do analýzy. Poté jsou složky desorbovány do injektoru zařízení a dále analyzovány. Metoda dynamické HS se často modifikuje z důvodu zrychlení promývacího procesu extrakce těkavých složek ze vzorku. V dynamické HS není rovnováha nikdy dosažena, protože plyny v prostoru nad vzorkem jsou kontinuálně nebo diskontinuálně odebírány k analýze. [63; 64]

4.1.3 Chromatografická kolona

Chromatografické kolony pro plynovou chromatografii se dělí do dvou základních skupin na náplňové a kapilární. Náplňové kolony jsou většinou trubice o průměru několika mm a obsahují absorbent, jejich délka se pohybuje v rozmezí desítek centimetrů až jednotek metrů. Nicméně technologie jdou ku předu, a tak se v plynové chromatografii nyní používají především kolony kapilární. Tento typ kolon je vyráběn z křemenného skla nebo kovu, podle maximálních teplot použití a aplikace. Jejich průměr se pohybuje v desetínách až jednotkách mm a délka v desítkách metrů. Kapilární kolony obsahují tenkou vrstvu stacionární fáze (desetiny mikrometru). Na současném trhu jsou dostupné kolony s polární, přes středně polární, až nepolární stacionární fází. Pro stanovení těkavých složek kosmetických přípravků a výrobků běžného použití jsou doporučovány kolony obsahující jako stacionární fázi polyetylen glykol. Tato kolona byla také použita v experimentální části této práce. [67]

Kapilární kolony byly představeny v roce 1959, ale k jejich rozšíření docházelo až od 80. let minulého století. Dnes se odhaduje, že více než 90% všech aplikací je spuštěno na

kapilárních kolonách. Kapilární kolony jsou jednoduché dlouhé trubice, které nejsou naplněny. Vnitřní vrstvu mají potaženou filmem stacionární fáze. Místo toho tenká vrstva kapalné fáze potahuje vnitřní stěnu. Díky otevřenosti kapilární kolony je odpor vůči proudění nosného plynu velmi nízký, a proto je možné dosahovat délky až 100 m. To je výhodné především u komplexních vzorků pro možnost lepší separace jednotlivých analytů. [61]

4.1.4 Detektor

Detektorů používaných v plynové chromatografii je několik. Nejběžnějšími a nejvíce používanými detektory pro kvantitativní analýzu jsou plamenoionizační detektor, Tepelně vodivostní a detektor elektronového záchytu. Tyto nicméně nedokáží identifikovat stanovené analyty. K tomuto účelu slouží hmotnostní detektory. Nejjednodušším hmotnostním detektorem je kvadrupólový tvořený čtyřmi tyčemi. Vzniklé ionty analytu rozseparovaného na koloně separuje podle hodnoty podílu jejich hmotnosti a náboje m/z . Díky dostupné knihovně spekter obsahující tisíce záznamů je poté možno jednotlivé analyty identifikovat. [61]

4.2 Stanovení antimikrobiální účinnosti

4.2.1 Princip diskové difúzní metody

Spočívá v difúzi dezinfekce do agaru, který je naočkovaným testovaným mikroorganismem. V případě potlačení růstu mikroorganismu dojde k vytvoření tzv. inhibiční zóny okolo pevného vzorku nebo kapalného vzorku nasorbovaného na papírový disk. Difúzní metody jsou citlivé na difúzi testované látky v agarové vrstvě. Je nutné dodržet některé podmínky po celou dobu měření. Musí být zachována podmínka konstantní hustoty a vlhkosti agaru, stejná tloušťka agaru a tuhnutí agaru v absolutně rovném povrchu. Tato metoda vychází z tzv. Kirby Bauerova testu pro studium antibiotik. Díky povaze některých typů vzorků, především kapalných vzorků, kam spadají i studované dezinfekční přípravky, se disková difúzní metoda se často obměňuje. Tato modifikace spočívá ve vytvoření jamek v agaru a vnesení kapalného vzorku do této jamky. Po kultivaci se opět odečítají inhibiční zóny. [68]

4.2.2 Princip metody ČSN EN 1040

Vzorek dezinfekce je přidán do testovací bakteriální suspenze. Směs se udržuje při definované teplotě a času. Po uplynutí doby se odebere odpovídající část ze zkumavky.

Bakteriocidní a/ nebo bakteriostatická aktivita v odpovídající části okamžitě neutralizována validovanou metodou. [69]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo analyzovat dezinfekční přípravky na bázi alkoholu, které jsou dostupné na českém trhu, z hlediska jejich kvalitativního složení a antimikrobiálního účinku.

Pro dosažení tohoto základního cíle byly stanoveny následující úkoly:

- teoreticky popsat způsoby dezinfekce se zaměřením na vybranou skupinu dezinfekčních prostředků;
- kvalitativně charakterizovat a zhodnotit vybrané prostředky pomocí plynové chromatografie;
- stanovit a porovnat antimikrobiální účinek dezinfekčních prostředků.

6 MATERIÁL A METODIKA

6.1 Popis vzorků dezinfekčních prostředků

Vybrané komerční vzorky kapalných alkoholových dezinfekčních přípravků reprezentují průřez českým trhem. Výběr komerčních dezinfekcí byl tedy proveden s ohledem na chemické složení, nikoliv podle způsobu aplikace. Jak je zjevné z teoretické části práce, jsou dezinfekční prostředky na bázi alkoholu určeny na dezinfekci pokožky, malých ploch a předmětů. Pro srovnání byl laboratorně připraven jeden vzorek etanolové dezinfekce rukou.

Pro jednodušší orientaci byly vzorky označeny čísly 1. až 9. Toto označení je blíže specifikované v tabulce 1. Informace o jednotlivých produktech uvedené v kap. 6.1.1 až 6.1.9 byly vzaty z etiket výrobků. Chemické složení vzorků uvedené v tabulkách 2 – 10 bylo vzato z bezpečnostních listů.

Tab. 1. Pracovní označení vzorků

Číslo vzorku	Komerční název
1.	Anti-COVID
2.	Manox
3.	Desmanol® pure
4.	Mikasept spraj
5.	Care alkoholový čistič
6.	Cleamen 540 dezi AP
7.	Agol
8.	Medi Spray Neutral
9.	Lavosept®K

Vzorek č. 1

Obchodní název výrobku: Anti-COVID

Tento vzorek byl připraven v laboratoři dle receptury Světové zdravotnické organizace (WHO)

Popis výrobku: Dezinfekční přípravek osobní hygieny – dezinfekce rukou profesionální použití – použití širokou veřejností.

Použití: Přípravku použijte dostatečné množství (2x3 ml), aby pokryl celou plochu. Naneste na dlaně a rozetřete po celých rukou a zápěstích; zvláštní pozornost věnujte kůžičce kolem

nehtů a záhybům v kůži. Dobře vtírejte, dokud není kůže suchá. Tento postup by měl trvat přibližně 1 minutu. Použití maximálně 10 krát denně. [70]

Tab. 2. Složení vzorku č. 1.

Složení vzorku č. 1.	
Chemický název složky	Koncentrace [hm %]
Etanol	79,6
Peroxid vodíku (3%)	5,0
Glycerol (98%)	2,2
Voda	13,2

Vzorek č. 2

Obchodní název výrobku: Manox

Výrobce: MPD plus, s.r.o.

Popis výrobku: Alkoholový tekutý prostředek pro dezinfekci rukou a pokožky. Spektrum účinnosti je bakteriocidní, fungicidní, virucidní, mykobaktericidní a tuberkulocidní.

Použití: Na hygienickou dezinfekci rukou se aplikuje 2 x 3ml nezředěného roztoku přípravku, doba působení 2 x 30 sekund. Přípravek se aplikuje na suché a umyté ruce nebo na kontaminované ruce. Expozice 30 sekund – baktericidní a fungicidní účinnost. Expozice 1 minuta – virucidní a tuberkulocidní. Chirurgická dezinfekce: aplikuje se na důkladně umyté, opláchnuté a osušené ruce. Aplikace 2 x 3ml přípravku během 3 minut. Dezinfekce pokožky: přípravek nanést sterilním tamponem či mulem, expozice 1 minuta. Při použití elektrických přístrojů je potřeba vyčkat úplného zaschnutí. [71]

Tab. 3. Složení vzorku č. 2. [71]

Složení vzorku č. 2	
Chemický název složky	Koncentrace [%]
Propan-2-ol	70
Peroxid vodíku	0,5
Chlorhexidin-diglukonát	0,4

Vzorek č. 3

Obchodní název výrobku: desmanol® pure

Výrobce: Schülke & Mayr GmbH

Popis produktu: Alkoholová dezinfekce, která je účinná proti bakteriím, kvasinkám (*C. albicans*) a lipofilním virům (včetně HBV, HCV, HIV, Vaccinia). Je určena pro přímé použití hygienické a chirurgické dezinfekce rukou (EN 1500). Chrání a ošetřuje pokožku rukou systémem zpětného mazání a prostředky, které udržují vlhkost pokožky.

Použití: Hygienická dezinfekce rukou: 3 ml desmanol® pure vtírejte po dobu 30 sekund do suchých rukou. Chirurgická dezinfekce rukou: V dostatečné množství (3 ml) vtírejte desmanol® pure po dobu 90 sekund do rukou a předloktí.

Ruce musí být po celou dobu aplikace udržovány produktem vlhké. [72]

Tab. 4. Složení vzorku č. 3. [72]

Složení vzorku č. 3	
Chemický název složky	Koncentrace [%]
Propan-2-ol	75
Myristylalkohol	< 1

Vzorek č. 4.

Obchodní název výrobku: Mikasept spraj

Výrobce: MIKA Consulting s.r.o

Popis výrobku: Tekutý alkoholový dezinfekční prostředek pro rychlou dezinfekci malých ploch zdravotnických prostředků, nedostupných míst a nástrojů postřikem. Je účinný proti bakteriím (i MRSA), kvasinkám i mikroskopickým kvasinkovým houbám. Jednoduše se aplikuje postřikem a má okamžitý účinek, neředí se. Rychle zasychá, na povrchu nezanechává skvrny a je šetrný k povrchům.

Použití: Koncentrovaný Mikasept se pomocí rozprašovače aplikace na plochu zbavenou viditelných mechanických nečistot. Plochy, nedostupná místa, povrchy předmětů, nástrojů se nechají zaschnout, neotírají se. Doporučené dávkování 40-50 ml/m². [73]

Tab. 5. Složení vzorku č. 4. [73]

Složení vzorku č. 4	
Chemický název složky	Koncentrace [hm %]
Etanol	<50
Propan-2-ol	<25
Alkyl(C12- C16)benzyltrimethylamonium-chloridy	<2

Vzorek č. 5.**Obchodní název výrobku:** CARE ALKOHOLOVÝ ČISTIČ**Výrobce:** ALFA CLASSIC, a.s.

Popis výrobku: Přípravek s alkoholem určený k čištění všech druhů omyvatelných povrchů, zejména umělých hmot. Snadno odstraňuje zejména mastné znečištění, zanechává svěží citronovou vůni.

Použití: Přípravek nastříkejte na čištěný povrch a setřete suchým hadrem nebo papírovou utěrkou. V případě potřeby rozleštěte. [74]

Tab. 6. Složení vzorku č. 5. [74]

Složení vzorku č. 5	
Chemický název složky	Koncentrace [%]
Voda	≥ 10
(2-methoxymethylethoxy)-propanol	1-10
C12-14-alkylalkoholy, ethoxylované	1-10
D-limonen	0,1-1
1-propanaminium, 3-amino-N- (karboxymethyl)-N,N-dimethyl-, N-C8-18- acyl deriváty, hydroxidy, vnitřní soli	0,1-1
Parfém	0,1-1
2-brom-2-nitropropan-1,3-diol	< 0,1
Citral	< 0,1

Vzorek č. 6.**Obchodní název výrobku:** Cleamen 540 dezi AP**Výrobce:** CORMEN s.r.o.

Popis výrobku: Tekutý dezinfekční prostředek na bázi alkoholu se širokým spektrem účinku. Pro profesionální použití. Je vhodný pro dezinfekci menších ploch v potravinářství a ve zdravotnictví (technická zařízení, operační stoly, nástroje, lůžka, gumová obuv,

laboratorní přístroje a plochy vyžadující zvýšený dezinfekční režim. Přípravek není vhodný pro dlouhodobé používání na plastové povrchy. Spektrum dezinfekčního účinku: baktericidní, fungicidní, mykobaktericidní a tuberkulocidní (15 min).

Použití: Používá se neředěný. Na plochy aplikovat postřikem ze vzdálenosti 40 až 50 cm. Může se používat také ponorný způsob. Doba působení: 15 minut. Spotřeba: 10 ml/m². [75]

Tab. 7. Složení vzorku č. 6. [75]

Složení vzorku č. 6.	
Chemický název složky	Koncentrace [hm %]
Voda	≥ 10
Propan-1-ol	≥ 10
Ethanol	≥ 10
Propan-2-ol	≥ 1 - <10
Butanon	≥ 0,1 - <1
2-Ethylhexanal	<0,1
Denatonium benzoát	<0,1

Vzorek č. 7.

Obchodní název výrobku: Agol

Výrobce: MPD plus, s.r.o.

Popis výrobku: Tekutý přípravek je určen pro rychlou hygienickou dezinfekci povrchů v domácnosti, službách, stravování, dopravě a jiných povrchů, které přicházejí do kontaktu s širokou veřejností. Při pravidelné aplikaci doporučujeme občasné omytí povrchů nejlépe teplou vodou.

Použití: Přípravek se aplikuje nástřikem koncentrátu na povrch a po 15 sekundách je dosaženo dostatečného účinku. Zbytky přípravku rychle osychají. Příklad použití: Ledničky, stoly, prodejní pulty, sportovní zařízení, sedadla. [76]

Tab. 8. Složení vzorku č. 7. [76]

Složení vzorku č. 7.	
Chemický název složky	Koncentrace [hm %]
Propan-2-ol	40
Alkyl (C12-C16)-benzyl dimethyl-amoniumchlorid	0,025
Glutaraldehyd	0,01

Vzorek č. 8.**Obchodní název výrobku:** Medi Spray Neutral**Výrobce:** Medisept Sp. z o.o.

Popis výrobku: Dezinfekční a čistící přípravek k okamžitému použití s rychlým a širokým mikrobicidním účinkem. Dobrá materiálová snášenlivost, pro materiály odolné vůči alkoholů. Bez barviv a parfémace, aldehydů a fenolu. Receptura je na bázi směsi alkoholů k rychlé a účinné dezinfekci malých ploch, povrchů zdravotnických prostředků a zdravotnického inventáře (lůžka, křesla, kliky dveří, madla apod.). Přípravek je vhodný k použití na obtížně přístupné plochy a k zajištění hygieny v nemocničních, veterinární, komunální a sociální sféře. Určeno k dezinfekci a čištění stomatologických koncovek, otiskovacích lžic, protéz, silikonových otisků aj.

Použití: Nezředěný přípravek naneste v dostatečném množství na plochy a povrchy přímo postříkem ze vzdálenosti cca 30 cm nebo pomocí přípravkem zcela napuštěné jednorázové netkané utěrky a ponechte působit předepsanou dobu nebo do zaschnutí. Dbejte na úplné (max. cca 40 ml/m²) a rovnoměrné smočení povrchů nebo ploch. Neoplachujte vodou, neutírejte. Nepoužívejte na materiály citlivé vůči působení alkoholů (např. akrylátové sklo). Nesměšujte s jinými výrobky. Nestříkejte do obličeje a do očí. [77]

Tab. 9. Složení vzorku č. 8. [77]

Složení vzorku č. 8.	
Chemický název složky	Koncentrace [hm %]
Etanol	< 70
Propan-2-ol	< 30

Vzorek č. 9**Obchodní název výrobku:** Lavosept®K**Výrobce:** AMOENÉ s.r.o.

Popis výrobku: Dezinfekční prostředek se používá na dezinfekci a mytí všech omyvatelných ploch a povrchů, dále k dezinfekci nástrojů, sociální a zdravotnické sféře, službách, kde výrazně snižuje počet bakterií. Odstraňuje kromě jiného mikroskopické vláknité houby – plísňe, mikroskopické kvasnicové houby- kvasinky a dále mikroorganismy

Pseudomonas aeruginosa, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus hirae*, aj. Mimo to dodává příjemnou vůni a nezanechává skvrny.

Použití: Nastříkat na plochu určenou k dezinfekci, až bude dostatečně vlhká. Osušit čistým hadříkem. Pravidelně opakovat. Masážní vany, hračky, rehabilitační stroje, po provedené dezinfekci opláchněte čistou vodou. [78]

Tab. 10. Složení vzorku č. 9. [78]

Složení vzorku č. 9.	
Chemický název složky	Koncentrace [hm %]
Benzalkonium chlorid	6
Pentadial Glutaraldehyd	1,5
Tetrasodium EDTA	3
POE 8 lauryl alkohol	2
Cetylpyrrolidinium chlorid	0,5

6.2 Kvalitativní analýza

Metodika pro kvalitativní analýzu vzorků dezinfekce byla vyvinuta na základě metody doporučené výrobcem chromatografické kolony. (odkaz na dokument z Restek). Nicméně tuto metodu bylo potřeba upravit a optimalizovat na studovaný typ vzorků a použité zařízení. Pro měření byly použity vzorky dezinfekčních prostředků na bázi alkoholu, které jsou určeny na dezinfekci povrchů a dezinfekci rukou.

6.2.1 Přístrojové vybavení

Analýzy byly provedeny pomocí plynového chromatografu s hmotnostní detekcí GCMS-QP2010 Plus (Shimadzu, Japonsko). Nástřík vzorků byl automatický pomocí autosampleru AOC 5000 (Combi PAL pro Shimadzu, Japonsko). Vyhodnocení bylo provedeno v softwaru GCMS LabSolution pomocí knihovny spekter NIST.

Kolona

Po měření byla použita kolona Stabilwax®-MS. Jedná se o vysoce polární kolonu, která je tvořena stacionární fází z polyetylen glykolu. Kolona je ideální na separaci polárních sloučenin nacházejících se v potravinách, aromatech, vonných látkách, farmaceutických surovinách a průmyslových chemikáliích. [67]

Technické parametry kolony:

- Délka 30 mm
- Vnitřní průměr 0.25 mm
- Tloušťka filmu stacionární fáze 0.25 μm

Pro analýzy byl použit nosný plyn helium o čistotě 5.0 od firmy Linde Gas a.s., Praha Česká republika. [67]

6.2.2 Analýza dezinfekcí – kapalný nástřík

Vzorky dezinfekcí byly upraveny před stanovením zředěním v metanolu na koncentraci 0,1 $\mu\text{l/ml}$. Poté byl podíl každého vzorku přefiltrován přes stříkačkový mikrofiltr (PTFE, velikost pórů 0,45 μm) do vialek. Při této analýze byl vždy do injektoru nastříknut 1 μl vzorku. Stanovení proběhlo 3x vedle sebe. [67]

6.2.3 Analýza dezinfekcí – headspace

Pro tuto analýzu nebyly vzorky dezinfekcí nejdříve upraveny, tzn. že 1 ml od každého vzorku byl převeden do 20ml headspace vialky. Vialka byla ihned uzavřena plynotěsným uzávěrem se septem. Takto připravené vzorky byly inkubovány v agitátoru autosampleru po různě dlouhou dobu (5 – 20 min) a při různých teplotách (50 – 100 °C). Poté bylo plynotěsnou stříkačkou převedeno 250 μl par nad vzorkem pro analýzu. Ve všech případech docházelo k saturaci detektoru.

Metoda přípravy vzorků byla tedy optimalizována tak, že 0,5 ml vzorku dezinfekce bylo převedeno do HS vialky s 0,5 ml demineralizované vody. Poté proběhla inkubace vzorku při teplotě 90 °C po dobu 10 min při rychlosti třepání 250 ot/min. Po inkubaci bylo k analýze odebráno 250 μl nasycených par vzorku stříkačkou temperovanou na teplotu 120 °C k eliminaci kondenzace par vzorku na stěně. Stanovení proběhlo pro každý vzorek 3x vedle sebe. HS stříkačka byla mezi jednotlivými stanoveními propláchnuta inertním plynem – dusíkem po dobu 5 min.

Parametry výsledné optimalizované metodiky pro oba typy nástříků

Výsledné parametry byly následující:

- Teplota nástříku vzorku: 200 °C
- Mód nástříku: Split, 1:300

- Průtok helia kolonou: 1,0 ml/min
- Teplota iontového zdroje a interface: 200 °C
- Ionizace: elektronová (EI), 70 eV
- Teplotní program: počáteční teplota kolony 50 °C po dobu 1 min, poté postupný nárůst (10 °C/min) na 220 °C, výdrž 2 min
- Stanovení proběhlo při poměru hmotnosti k náboji (m/z) 30-200. [67]

6.3 Stanovení antimikrobiální účinnosti

Pro testování vzorků dezinfekčních prostředků byly vybrány dvě metody, a to disková difúzní technika s modifikací nanesení vzorků do jamek a testování dle normy ČSN EN 1040: Chemické dezinfekční přípravky a antiseptika – Kvantitativní zkouška s použitím suspenze ke stanovení základního baktericidního účinku chemických dezinfekčních přípravků a antiseptik.

6.3.1 Použité mikroorganismy

Pro testování dezinfekčních prostředků byly použity bakterie z České sbírky mikroorganismů (CCM) Masarykovy univerzity v Brně. [79]

***Staphylococcus aureus* CCM 4516**

Staphylococcus aureus se používá jako kontrolní kmen pro chemické dezinfekční prostředky a antiseptické testování, pro stanovení antimikrobiálních činidel v pracovních kapalinách, antimikrobiálních konzervačních prostředků a očních přípravků. Tato bakterie se řadí do 2. rizikové skupiny. To znamená, že mikroorganismy této skupiny mohou být příčinou onemocnění lidí a/nebo zvířat. Proti těmto mikroorganismům existuje obvykle účinná ochrana, a tudíž jsou způsobená onemocnění léčitelná. [79; 80]

***Pseudomonas aeruginosa* CCM 1961**

Pseudomonas aeruginosa je nejčastější pseudomonádou, která se primárně vyskytuje v biofilmech i planktonicky. Je možné ji nalézt v přírodních i odpadových vodách, v půdě, na kulturních i divokých rostlinách, u volně žijících a domácích zvířat, v potravinářství, zejména na mase. Je součástí mikroflóry v tenkém střevě. Roste i v kultivační půdě obsahující acetát a amonné ionty jako zdroj uhlíku a dusíku. *Pseudomonas aeruginosa* je relativně resistantní vůči chemickým a fyzikálním vlivům. Přežívá v roztocích

s nedostatečnou koncentrací dezinfekčních látek a také v roztocích s vyšší koncentrací solí. Tato bakterie se řadí do 2. rizikové skupiny. [79; 81]

6.3.2 Inokulace použitých mikroorganismů

Metodou křížového roztěru byla provedena inokulace bakterií. Cílem této metody je získat jednotlivé kolonie bakterií. Pomocí sterilní kličky, která byla vyžíhána, je na povrch kultivačního média přenesen vzorek bakterií, který je poté kličkou rozetřen třemi vodorovnými čarami. Vyžíhanou kličkou je provedena další sada vodorovných čar přes čary původní. Tento postup je opakován, a to vždy sterilní kličkou. Na závěr je vedena poslední čára přes poslední sadu čar ke středu misky, a tím dojde k oddělení jednotlivých kolonií. Petriho miska s takto přeočkovaným mikroorganismem se ponechá v optimálních podmínkách (pro výše zmíněné bakterie se jedná o teplotu 35 ± 2 °C po dobu 20 - 24 hod) narůst. Po kultivaci je poté možno vitální jednotlivě narostené kolonie použít pro další testování. [82]

6.3.3 Disková difúzní metoda

Pomůcky a zařízení:

- Petriho misky
- Zkumavky
- Stojan na zkumavky
- Inkubátor Memmert UN 55
- Třepačka Vortex V-1 plus
- Korkovrt
- Nastavitelné automatické pipety Finn timer F2 o různém objemu
- Počítač připojený k automatickému počítadlu kolonií SCAN 500®

Použitý materiál:

- Mikroorganismy popsané v kapitole 6.3.1
- Vzorky dezinfekcí
- Fyziologický roztok
- Médium: Mueller-Hinton agar (MHA)

Byla použita dehydratovaná půda Mueller-Hinton agar od firmy HiMedia Laboratories Pvt. Ltd. Tato půda je doporučována pro testování antimikrobiální citlivosti metodou difúze v agaru nebo diluční metodou. Půda se připravuje přidáním 35 g do 1 000 ml čerstvě destilované vody a sterilizuje se v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

Složení MHA:

Peptony	3,0 g/l
Kaseinový hydrolyzát	17,5 g/l
Agar	15,0 g/l
Ca ²⁺	20-25 mg/l
Mg ²⁺	10-12,5 mg/l [83]

Pracovní postup:

Inkubace bakterií pro difúzní jamkovou metodu probíhala 24 hodin před testováním při teplotě 35 ± 2 °C. Do zkumavky bylo napipetováno 18 ml sterilního fyziologického roztoku a sterilní vyžíhanou kličkou byl vpraven testovací bakterie v množství přibližně 10⁶ až 10⁸ CFU/ml. Bakteriální suspenze byla zhomogenizována na vortexu.

Do sterilní Petriho misky byl napipetován 1 ml suspenze mikroorganismů. Nadávkovaná suspenze byla přelita kultivační půdou MHA, která byla vytemperovaná na 48 °C. Kultura s půdou byla v misce promíchána kývavými pohyby. Misky byly ponechány v laminárním boxu do té doby než MHA ztuhnul. Sterilním korkovrtem byly vyříznuty v agaru každé misky 2 otvory v dostatečné vzdálenosti od kraje misky i od sebe navzájem. Do otvorů bylo napipetováno 100 µl testovaných vzorků. Inkubace Petriho misek probíhala dnem dolů po dobu 24 hodin při 35 ± 2 °C.

Po 24 hodinách byly odečteny inhibiční zóny jednotlivých testovaných vzorků změřením inhibičních zón na přístroji SCAN 500®. Testování proběhlo 3x vedle sebe pro každý typ vzorku a bakteriální kulturu.

6.3.4 Mikrobiologické testování podle ČSN EN 1040

Pomůcky a zařízení:

- Běžné laboratorní sklo (Petriho misky, zkumavky)
- Nastavitelné automatické pipety Finnpipette F2

- Třepačka Vortex V-1 plus
- Stopky
- Inkubátor Memmert UN 55
- Teploměr
- Autokláv
- Vodní lázeň Memmert a VWR
- Počítadlo kolonií Schuett count

Materiál:

- Mikroorganismy popsané v kapitole 6.3.1
- Vzorke dezinfekcí
- Fyziologický roztok
- **Trypton – sojový agar (TSA – Tryptic Soy Agar)**

Byla použita dehydratovaná půda Trypton – sojový agar od firmy HiMedia Laboratories Pvt. Ltd. Tato půda je obecně používaná pro kultivaci nutričně náročných i nenáročných mikroorganismů a k testování sterility prostředí. Půda TSA se sterilizuje v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

Složení TSA:

Enzymatický hydrolyzát kaseinu	15 g/l
Sojový pepton	5 g/l
Chlorid sodný	5 g/l
Agar	15 g/l

- **Tlumivá peptonová voda (Buffered Peptone Water w/ NaCl)**

Byla použita tlumivá peptonová voda od firmy HiMedia Laboratories Pvt. Ltd. Toto médium se používá jako předpomnožovací pro zvýšení záchytnosti zejména poškozených bakterií z potravin. Používá se pro přípravu a ředění vzorků. Tlumivá peptonová voda se připravuje navážením 16,09 g do 1000 ml destilované vody. Následně se zahřívá do úplného rozpuštění. Sterilizuje se v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

Složení tlumivé peptonové vody:

Pepton	1,00 g/l
Chlorid sodný	4,30 g/l
Hydrogenfosforečnan (di)sodný	7,23 g/l
Dihydrogenfosforečnan draselný	3,56 g/l

- **Neutralizátor**

Typ neutralizátoru antimikrobiální aktivity účinných látek byl vybrán na základě normy ČSN EN ISO 11930: Kosmetika – Mikrobiologie – Hodnocení antimikrobiální ochrany kosmetického výrobku. Na neutralizátor byl použit sojový granulovaný lecitin od firmy Mogator s.r.o. Další složkou je Twen 80 od firmy HiMedia Laboratories Pvt. Ltd. a dodecylsulfát sodný od dodavatele Sigma Aldrich. [84]

Složení neutralizátoru:

Lecitin	3 g/l
Tween 80	30 g/l
SDS (dodecylsulfát sodný)	4 g/l

Během celého měření byla v laboratoři udržována teplota 22 ± 2 °C a relativní vlhkost 45 až 55 %.

Pracovní postup:**Příprava bakteriální suspenze**

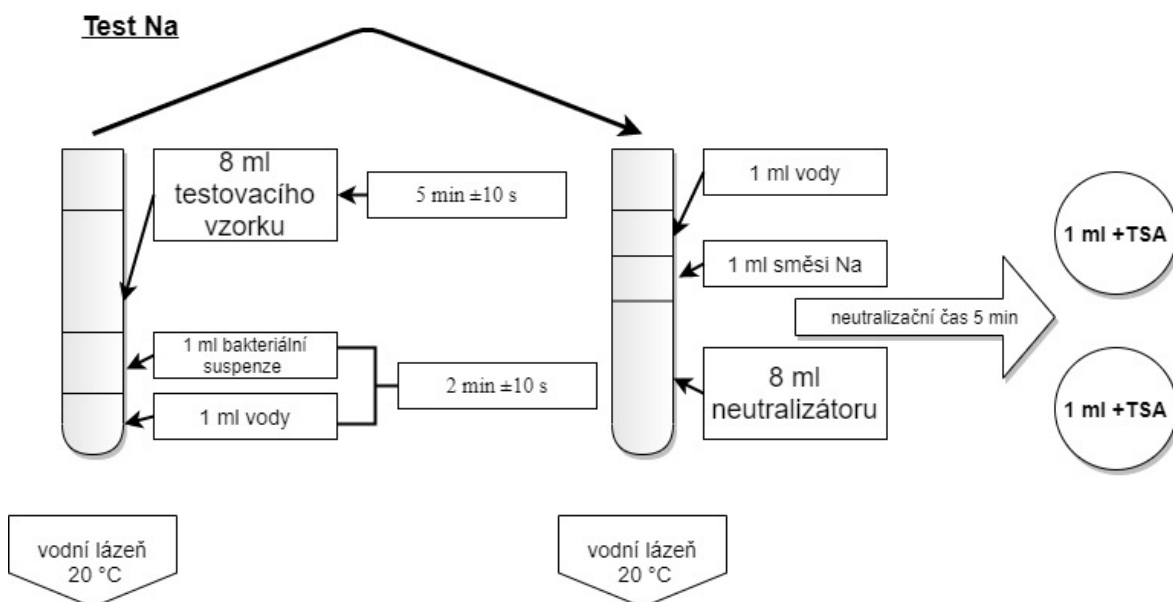
Bakteriální suspenze byly připraveny do ředícího roztoku, tedy do Buffered Peptone water, o koncentraci 10^8 CFU/ml, přibližná koncentrace se určila počítáním pomocí Bürkerovy komůrky pod mikroskopem. Přesná koncentrace se pak zjistila metodou postupného ředění a zalévání do agaru, kdy po 24hodinové inkubaci při 35 ± 2 °C se spočítaly vyrostlé kolonie na miskách.

Test N_a – stanovení baktericidní koncentrace

Do zkumavky byl napipetován 1 ml destilované vody a 1 ml testovací bakteriální suspenze. Zkumavka byla dostatečně promíchána na vortexu a vložena do vodní lázně při 20 °C

po dobu $2 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$. Po uplynutí doby bylo přidáno 8 ml testovaného vzorku. Zkumavka byla znovu promíchána a vložena do vodní lázně na $5 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$. Před koncem měřeného času byla zkumavka ze směsí N_a opět promíchána.

Ze směsi N_a byl odpipetován 1 ml do zkumavky, která obsahovala 8 ml neutralizátoru a 1 ml destilované vody. Zkumavka byla důkladně promíchána na vortexu a uložena do vodní lázně po dobu $5 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$. Před koncem měřeného času byla zkumavka opět promíchána. Na dvě Petriho misky bylo napipetováno po 1 ml roztoku ze zkumavky. Roztok byl dále zpracován metodou postupného ředění a zalévání do agaru (TSA), aby se zjistila koncentrace přeživších bakterií, a misky pak byly inkubovány dnem vzhůru po dobu 24 hodin při teplotě $35 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Schematicky je tento postup znázorněn na obrázku 3.



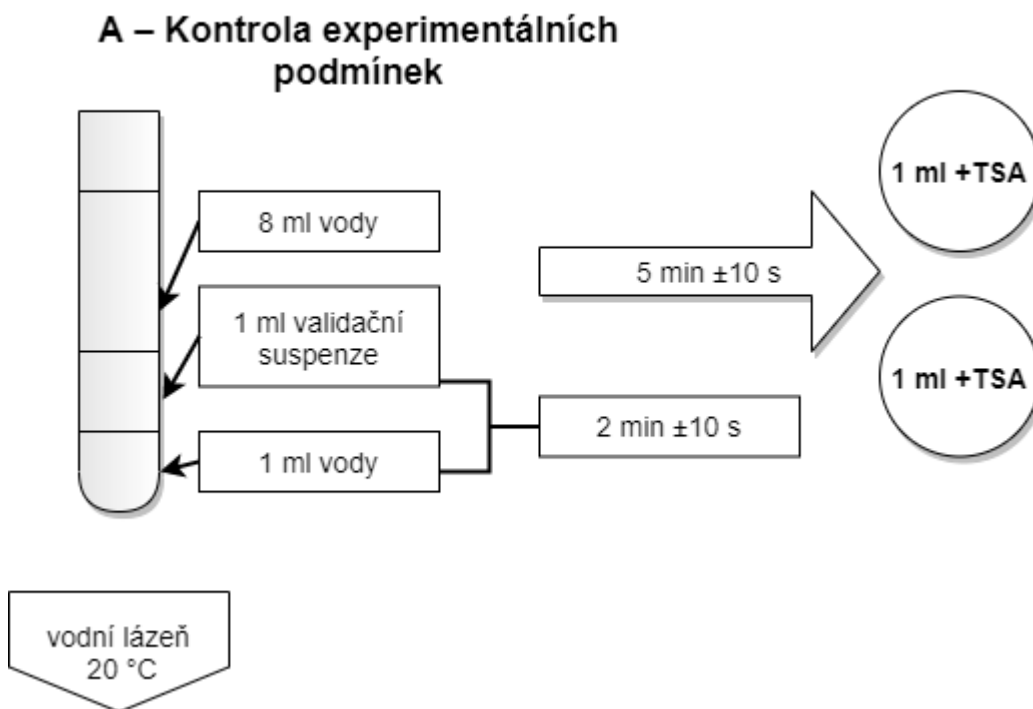
Obrázek 3 Schematické znázornění postupu testu N_a [69]

Validace

A – Kontrola experimentálních podmínek

Zkumavka s 1 ml destilované vody a 1 ml validační suspenze byla důkladně promíchána a umístěna do vodní lázně při $20 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu $2 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$. Po uplynutí doby bylo do zkumavky přidáno 8 ml destilované vody a zkumavka byla opět promíchána a vložena do vodní lázně, kde byla ponechána $5 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$. Před koncem plynutí doby se zkumavka opět promíchala na vortexu. Na dvě petriho misky bylo napipetováno po 1 ml roztoku

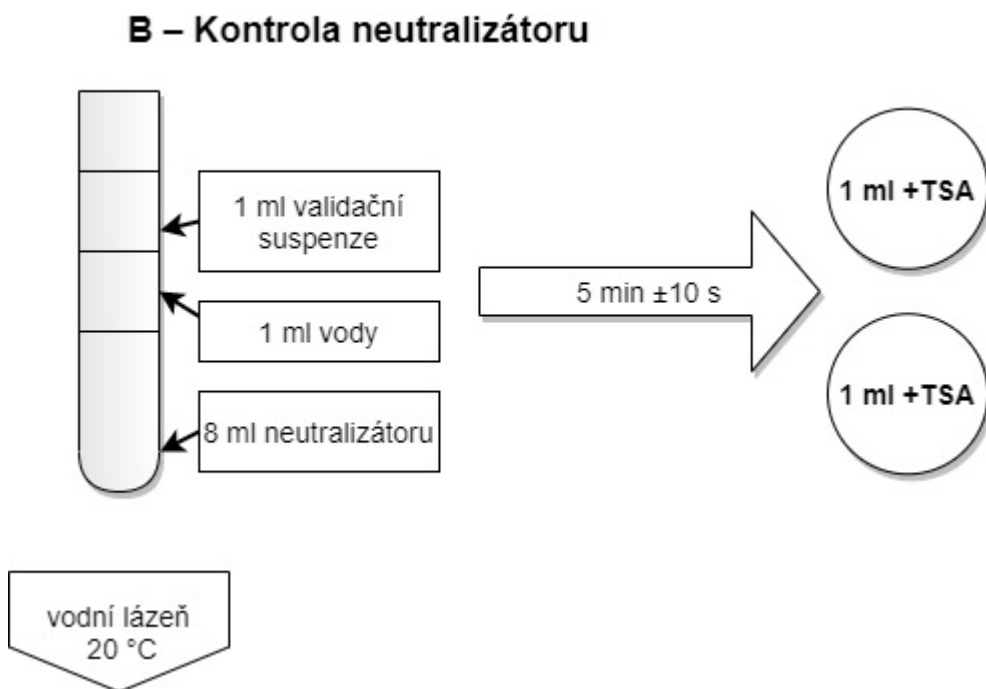
ze zkumavky. Roztoky byly přelity 20 ml TSA médiem a krouživým pohybem byl obsah misek promíchán. Petriho misky byly inkubovány dnem vzhůru po dobu 24 hodin při 35 ± 2 °C. Schematicky je tento postup znázorněn na obrázku 4.



Obrázek 4 Schematické znázornění kontroly experimentálních podmínek [69]

B – Kontrola neutralizátoru

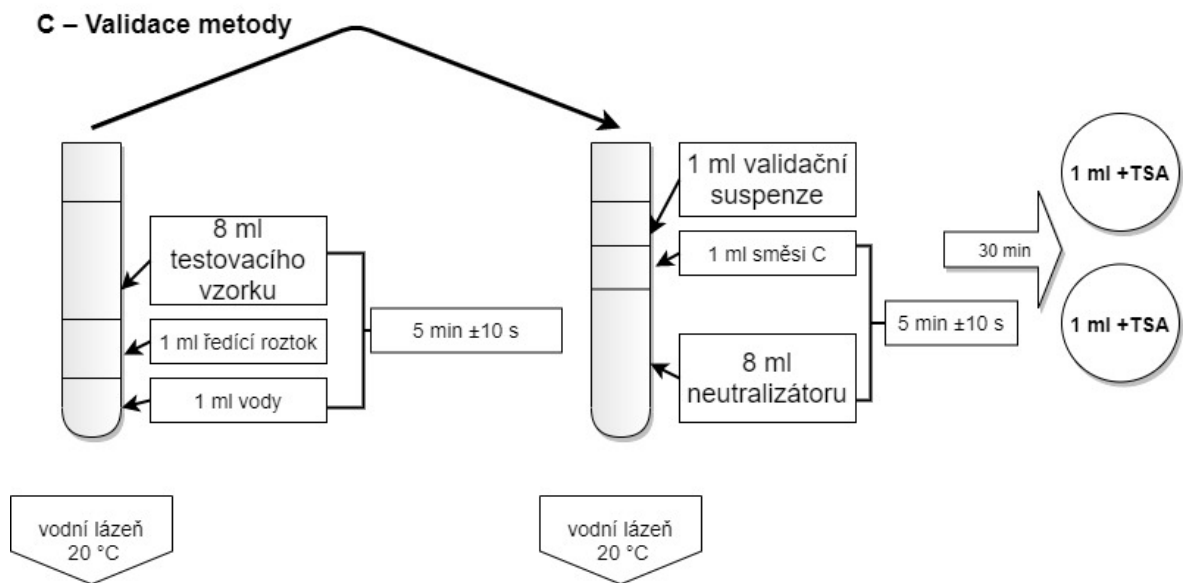
Do zkumavky s 8 ml neutralizátoru byl přidán 1 ml destilované vody a 1 ml validační suspenze. Zkumavka byla promíchána na vortexu a vložena do vodní lázně při 20 °C po dobu 5 min ± 10 s. Před koncem plynutí doby, byla zkumavka opět promíchána na vortexu. Na dvě Petriho misky bylo napipetováno po 1 ml roztoku ze zkumavky. Roztoky byly přelity 20 ml TSA médiem a krouživým pohybem misky bylo medium s roztokem promícháno. Petriho misky byly inkubovány dnem vzhůru po dobu 24 hodin při 35 ± 2 °C. Schematicky je tento postup znázorněn na obrázku 5.



Obrázek 5 Schematické znázornění kontroly neutralizátoru [69]

C – Validace metody

Do zkumavky s 1 ml ředícího roztoku byl přidán 1 ml destilované vody a 8 ml testovaného vzorku (vzorek v nejvyšší koncentraci). Zkumavka byla promíchána na vortexu, vložena do vodní lázně při 20 °C na dobu 5 minut, před koncem této doby byla opět promíchána. Z této směsi byl odpipetován 1 ml do zkumavky obsahující 8 ml neutralizátoru a po promíchání byla zkumavka vložena do vodní lázně na 5 minut. Poté byl do této zkumavky napipetován 1 ml validační suspenze a po promíchání na vortexu byla zkumavka opět vložena do vodní lázně při 20 °C na 30 minut. Po uplynutí této doby bylo ze zkumavky odpipetováno po 1 ml na dvě Petriho misky a zalito do agarů (TSA). Petriho misky byly inkubovány dnem vzhůru při 35 ± 2 °C po dobu 24 hodin. Schematicky je tento postup znázorněn na obrázku 6.



Obrázek 6 Schematické znázornění validace metody [69]

7 VÝSLEDKY A DISKUZE

7.1 Kvalitativní analýza GC/MS

Pro porovnání jednotlivých vzorků dezinfekčních přípravků z hlediska antimikrobiálního účinku je velmi důležité ověřit si chemické složení, které udává výrobce v bezpečnostních listech nebo na etiketě výrobku. V této diplomové práci k tomuto účelu posloužila kvalitativní analýza plynovou chromatografií. Byly také sledovány rozdíly ve vzorcích v závislosti na typu nástřiku vzorku do analyzátoru. Jednak byl proveden nástřik přímo dezinfekčního prostředku, ale také byly analyzovány těkavé složky těchto výrobků pomocí techniky headspace.

Samotná metoda plynového chromatografu a hmotnostního detektoru byla v laboratoři zavedena a zoptimalizována tak, aby ji bylo možné použít pro oba typy nástřiku vzorků do injektoru zařízení. Nalézt a zavést optimální podmínky se podařilo a výsledná metodika je uvedena výše v kapitole 6.2.

7.1.1 Kapalný nástřik

Výsledky analýzy, tedy přítomnost detekovaných látek v jednotlivých vzorcích dezinfekčních přípravků, jsou souhrnně uvedeny v tabulce 11. V tabulce jsou uvedeny názvy jednotlivých detekovaných látek, které byly určeny pomocí knihovny spekter NIST. Dále je uveden retenční čas (R_t) jednotlivých látek, kde byly detekovány. Úkolem diplomové práce bylo zavedení metody kvalitativní analýzy, proto je dále v tabulce uvedena přítomnost (+) nebo absence (-) každé složky v daném vzorku. Veškerá opakování měření vzorků vedle sebe ukázala obdobná spektra, proto bylo možné provedení vyhodnocení vždy jen u jednoho měření.

Výsledky ukázaly, že nejvíce komplexní je vzorek č. 9. (Lavosept), tedy bezalkoholový dezinfekční prostředek na povrchy, dále vzorky č. 4. (Mikasept), 5. (Care alkoholový čistič) a 7. (Agol). Zastoupení velkého počtu látek v těchto vzorcích je způsoben pravděpodobně tím, že se jedná o čističe na povrchy, proto obsahují také složky odstraňující nečistoty (nejen mikroorganismy). Navíc jsou tyto typy přípravků často parfemované.

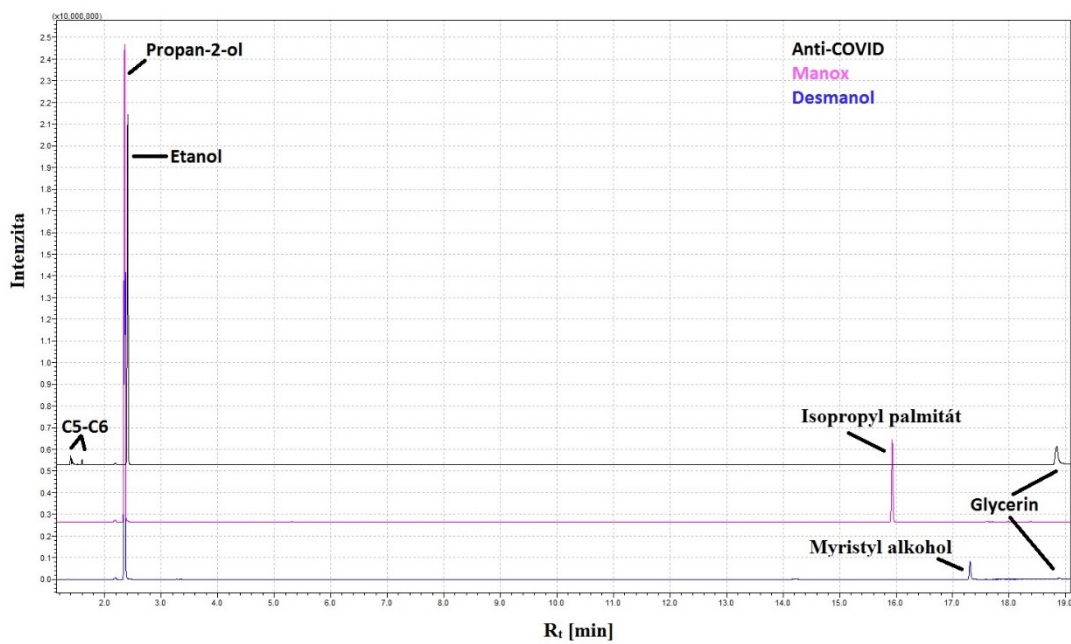
U dezinfekčních přípravků na ruce byly především identifikovány alkoholy. Vzorek 2. a 3. obsahují propan-2-ol, oproti tomu je vzorek č. 1 (Anti-COVID) etanolový.

V laboratoři byl připraven vzorek č. 1. (Anti-COVID) dle receptury WHO. Tento vzorek byl vyroben z lihu denaturovaného 1 % lékařského benzínu, vody, peroxidu vodíku a glycerinu. Analýza kapalného podílu vzorku pomocí GC/MS potvrdila přítomnost uhlovodíkových frakcí benzínu a také glycerinu. Přítomnost glycerinu se také potvrdila u vzorku č. 3., tedy vzorku Desmanol, který taktéž určen pro personální použití. Glycerin se do tohoto typu přípravku přidává z důvodu jeho zvláčňujícího účinku na pokožku. Nedochází tak k vysokému vysušování pokožky při použití alkoholového přípravku. Ve vzorku č. 2. (Manox) nebyl glycerin detekován. Oproti tomu obsahuje isopropyl palmitát, který také působí jako humektant. [85]

Vzorek dezinfekce pod komerčním názvem Manox (vzorek č. 2.) obsahuje dle výrobce povrchově aktivní látku myristyl alkohol, což bylo také plynovou chromatografií potvrzeno.

Názorné porovnání naměřených spekter vzorků alkoholové dezinfekce na ruce je vidět na obrázku 7. Z důvodu špatné přehlednosti porovnání spekter dezinfekčních prostředků na povrchy nejsou tato spektra do diplomové práce vložena.

U vzorků č. 4. a 9. byla nalezena v retenčním čase 2,23 min sloučenina obsahující v molekule chlor. Pomocí knihovny spekter se nepodařila její přesná identifikace. Nicméně díky této složce je možné u těchto dvou vzorků potvrdit přítomnost chlorované účinné složky, kterou výrobci deklarují. Dále byla u obou, nalezena látka benzyl chlorid a sloučenina obsahující amin (která byla také detekovaná ve vzorku č. 7.), což také potvrzuje složení v tabulkách uvedených v kapitole 6.1. Tyto dva vzorky také obsahují jako antimikrobní účinné složky etanol i propan-2-ol. Vzorek 4. navíc obsahuje cetylpyrrolidinium chlorid. Podle kvalitativní analýzy by se tedy dala předpokládat podobná antimikrobiální účinnost vzorků č. 4. a 9., což se také potvrdilo. U vzorku č. 5. se složení vzorku potvrdilo s výjimkou minoritních složek, a to bromované sloučeniny a citralu. Směs alkoholů se potvrdila u vzorku Cleamen (č. 6.). Dezinfekce Agol pod označením č. 7. podle výrobce obsahuje glutaraldehyd. Ten se nepodařilo ve spekter nalézt, pravděpodobně je pod limitem detekce vyvinuté metody. Vzorek č. 8 je podle výrobce a také podle hmotnostního spektra složen pouze z etanolu a propan-1-olu.



Obrázek 7: Porovnání spekter vzorků alkoholových dezinfekcí na ruce

Tab. 11. Stanovené látky ve vzorcích dezinfekcí – kapalný nástřik

Stanovená látka	R _t [min]	Vz. 1	Vz. 2	Vz. 3	Vz. 4	Vz. 5	Vz. 6	Vz. 7	Vz. 8	Vz. 9
Uhlovodíky C5-C6 (frakce benzínu)	1,4-1,5	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Chlorovaná sloučenina	2,23	-	-	-	+	-	-	-	-	+
Propan-2-ol	2,35	-	+	+	+	-	+	+	+	+
Ethanol	2,41	+	-	-	+	-	+	-	+	+
1-Propanol	3,29	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Butanon	5,17	-	-	-	-	-	+	-	-	-
D-Limonen	5,32	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Propanamoniové sloučeniny	9,0-10,5	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Benzyl chlorid	9,87	-	-	-	+	-	-	-	-	+
N,N-dimetyl-1-tridecamin	10,82	-	-	-	+	-	-	+	-	+
Cetylpyrrolidinium chlorid	11,91	-	-	-	+	-	-	-	-	-
N,N-dimethyl-1-pentadecanamin	13,23	-	-	-	+	-	-	-	-	-
N-ethyl-1,2-Ethanediamin	15,49	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Isopropyl palmitát	15,93	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Myristyl alkohol	17,31	-	-	+	-	-	-	-	-	-
(2-Methoxymethylethoxy)-propanol	17,58	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Glycerin	18,84	+	-	+	-	-	-	-	-	-

7.1.2 Headspace

Technika headspace byla optimalizována pro dosažení nasycení par nad všemi typy vzorků s ohledem na minimalizaci saturace detektoru a naopak udržení dostatečné citlivosti metody na co největší počet složek.

Výsledky kvalitativní analýzy dezinfekčních prostředků plynovou chromatografií v kombinaci s headspace technikou jsou uvedeny v tabulce 12.

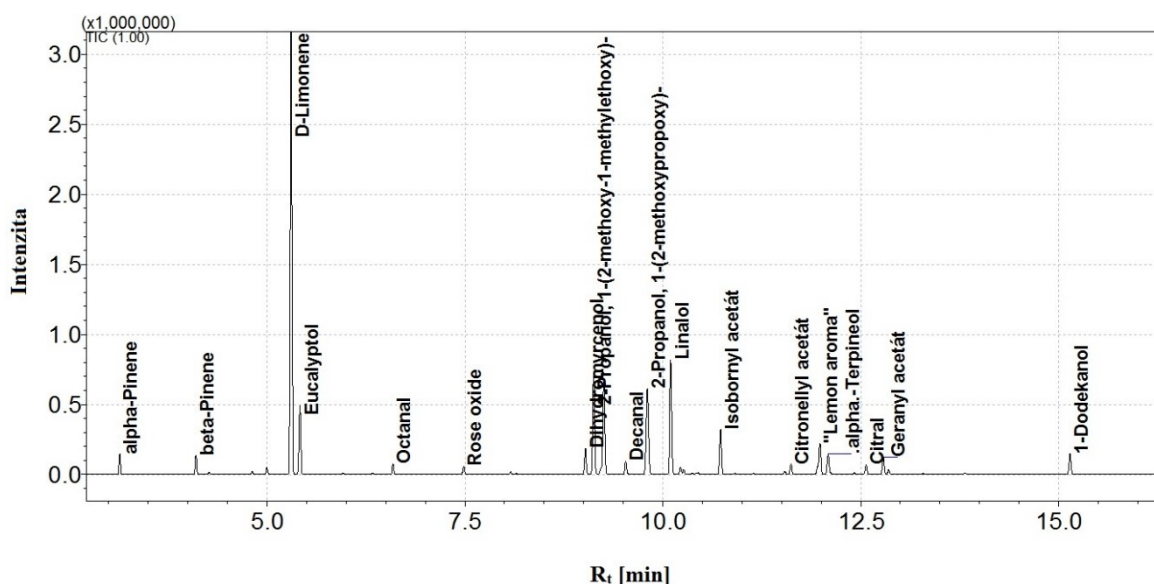
Headspace analýza potvrdila u vzorku anti-COVID (vzorek č. 1.) obsah denaturačního činidla benzínu a majoritní látky – etanolu. Glycerin v tomto případě nebyl nalezen, protože se jedná o sloučeninu s bodem varu 290 °C. U vzorku 2. a 3. se opět podařilo potvrdit přítomnost propan-2-olu a isopropyl palmitátu, respektive myristyl alkoholu. Oproti tomu se nepodařilo HS technikou nalézt všechny sloučeniny u vzorku č. 4., byla potvrzena pouze přítomnost alkoholů.

Nebylo předpokládáno, že přítomnost benzalkonium chloridu spadajícího do skupiny kvartérních amoniových solí bude potvrzena pomocí plynové chromatografie. Jak je totiž známo z odborných publikací, KAS se běžně analyzují pomocí kapalinové chromatografie. Tyto látky tedy bylo možné ve vzorcích dezinfekčních přípravků potvrdit pouze nepřímo zjištěním aminových nebo chlorovaných sloučenin vznikajících jejich rozpadem. V odborné studii bylo prokázáno, že benzalkonium chlorid začíná tepelně degradovat při teplotě 145 °C. [86; 87]

Analýza vzorku č. 5. (Care) headspace technikou pomohla k identifikaci složek, které výrobce uvedl v bezpečnostním listu souhrnně pod označením parfém. Tyto látky nebyly metodou kapalného nástřiku detekované, pravděpodobně z důvodu limitu detekce. Tak je z tabulky 12. vidět, vzorek je bohatý na složky esenciálních olejů. Konkrétně se jedná o α -pinen, β -pinen, majoritní D-limonen, eucalyptol, oktanal, dále tzv. rose oxid pocházející z růžové silice, dekanal, linalol, isobornyl acetát, citronellyl acetát, 2-methyl-2-(4-methyl-3-pentenyl)-cyklopropankarboxaldehyd, α -terpineol, citral, geranyl acetát a 1-dodekanol. Podle všech stanovených sloučenin esenciálních olejů lze usuzovat, že výrobce použil květinové a citrusové silice. [88; 89; 90]

U vzorku č. 5. se také pomocí HS techniky podařilo nalézt ve spektru píky odpovídající sloučenině 1-(2-methoxy-1-methylethoxy)-2-propanol, kterou výrobce taktéž uvádí

ve složení produktu. Z důvodu spektrální odlišnosti tohoto vzorku od ostatních je spektrum znázorněno v obrázku 8.



Obrázek 8: MS spektrum vzorku č. 5. (Care alkoholový čistič)

Při analýze dezinfekce č. 6. (Cleamen) pomocí kapalného nástřiku nebylo ve vzorku detekováno denaturační činidlo lihu. Nicméně HS analýza objevila přítomnost minoritních píků uhlíkových řetězců C5 – C6 odpovídající denaturačnímu činidlu lihu. Lze tedy konstatovat, že etanol použitý při výrobě této dezinfekce byl denaturovaný benzínem. Dále vzorek obsahuje etanol, propan-1-ol a propan-2-ol.

Vzorek č. 7. byl ve spektru velmi chudý, prokázala se pouze přítomnost propan-2-olu. U dezinfekce pod označením č. 8. byla potvrzena přítomnost propan-2-olu i etanolu stejně, jak tomu bylo u kapalného nástřiku. Vzorek č. 9. (Lavosept) i v tomto případě obsahuje alkoholy propan-2-ol a etanol, dále byla potvrzena přítomnost sloučeniny na bázi dusíku.

Tab. 12. Stanovené látky ve vzorcích dezinfekcí – headspace

Složka	R _t [min]	Vz. 1	Vz. 2	Vz. 3	Vz. 4	Vz. 5	Vz. 6	Vz. 7	Vz. 8	Vz. 9
C5 – C6 (denaturační složka)	1,35-1,59	+	-	-	-	-	+	-	-	-
Propan-2-ol	2,33	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Etanol	2,39	+	-	-	+	-	+	-	+	+
α-Pinen	3,14	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Propan-1-ol	3,26	-	-	-	-	-	+	-	-	-
β-Pinen	4,11	-	-	-	-	+	-	-	-	-
D-Limonene	5,31	-	+	-	-	+	-	-	-	-
Eucalyptol	5,42	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Oktanal	6,59	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Tetrahydro-4-methyl-2-(2-methylpropenyl)-2H-pyran („Rose oxide“)	7,49	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Dihydromyrcenol	9,03	-	-	-	-	+	-	-	-	-
1-(2-methoxy-1-methylethoxy)- 2-Propanol	9,13-9,81	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Dekanal	9,53	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Linalol	10,10	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Isobornyl acetát	10,73	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Dimethylaminopropylamin	10,78	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Citronellyl acetát	11,62	-	-	-	-	+	-	-	-	-
2-Methyl-2-(4-methyl-3-pentenyl)-cyklopropankarboxaldehyd	11,99	-	-	-	-	+	-	-	-	-
α-Terpineol	12,09	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Citral	12,57	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Geranyl acetát	12,79	-	-	-	-	+	-	-	-	-
1-Dodekanol	15,15	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Isopropyl palmitát	15,91	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Myristyl alkohol	15,92	-	-	+	-	-	-	-	-	-

7.2 Stanovení antimikrobiální účinnosti

Pro zhodnocení antimikrobiální, respektive antibakteriální, účinnosti jednotlivých typů dezinfekčních prostředků na ruce a povrchy byly vybrány dvě metody. Byla použita disková difúzní metoda s modifikací nanášení vzorků do jamek. Dále byla v laboratoři zavedena nová metodika testování dezinfekčních prostředků dle normy ČSN EN 1040.

7.2.1 Disková difúzní metoda

Velikost inhibičních zón získaných touto metodou je ukazatelem účinnosti dezinfekce proti daným testovacím mikroorganismům z hlediska schopnosti těchto vzorků difundovat do svého okolí. U této metody lze očekávat dobré výsledky u vzorků, které nepodléhají rychlému vytékání antimikrobiálních účinných složek.

Po inkubaci misek s testovaným vzorkem byly pomocí automatického počítadla kolonií v jeho softwaru odečteny průměry zón inhibice s průměrem jamky se vzorkem. Pro zjištění šířky zóny inhibice byly tedy výsledky přepočteny podle vzorce (1). Výsledky jsou souhrnně uvedeny v tabulce 13 jako průměrná hodnota ze třech stanovení.

Ukázka výpočtu dat:

$$\text{velikost inhibiční zóny}[mm] = \frac{\text{šířka inhibiční zóny} - \text{šířka jamky}}{2} \quad (1)$$

Výpočet pro vzorek č.5 - *Pseudomonas aeruginosa*:

$$\text{velikost inhibiční zóny}[mm] = \frac{21,2 - 9}{2}$$

Vzorek 1, 3 a 8, tedy dezinfekce Anti-COVID, Desmanol a Medi spray netvoří obou testovaných bakteriálních kmenů žádnou nebo jen minimální inhibiční zónu. To může být způsobeno tím, že testovací mikroorganismy jsou do značné míry rezistentní vůči působení antimikrobiálních složek nebo spíše tím, že jako účinnou složku obsahují pouze alkohol, který se při nanesení do jamky rychle odpařil, a tedy nebyla zaručena dostatečná kontaktní doba potřebná k působení. Vzorek č. 6 tvořil zóny inhibice o velikosti zhruba 1 mm u obou

bakteriálních kmenů. Mírně vyšší účinek oproti prvně zmíněným vzorků je pravděpodobně díky kombinaci více alkoholů o různém bodu varu. [91]

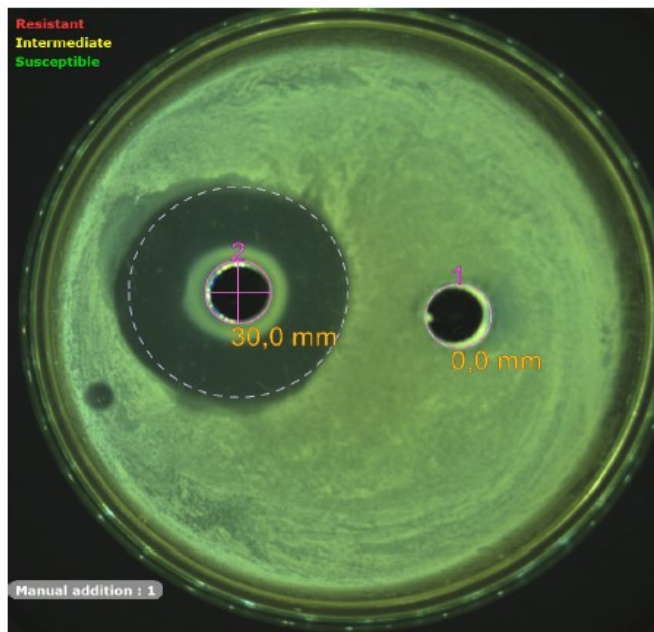
Z hlediska účinku proti gram pozitivnímu kmeni *S. aureus* lze považovat vzorky č. 2, 5, 7 a 9 za srovnatelné. Ve vzorku 2 k tomuto faktu napomohl obsah chlorhexidin-diglukonátu, u vzorku 5 tomu bylo pravděpodobně díky silicím. Je známo, že esenciální oleje silic mají silné antimikrobiální vlastnosti. U vzorku 9 se jedná o účinek složky benzalkonium chloridu a glutaraldehydu. [92]

Proti gram negativní *P. aeruginosa* lze označit na základě výsledků vzorek č. 5. Je to pravděpodobně díky komplexnímu složení, které zahrnuje obsah alkoholů aminů i esenciálních olejů. [93]

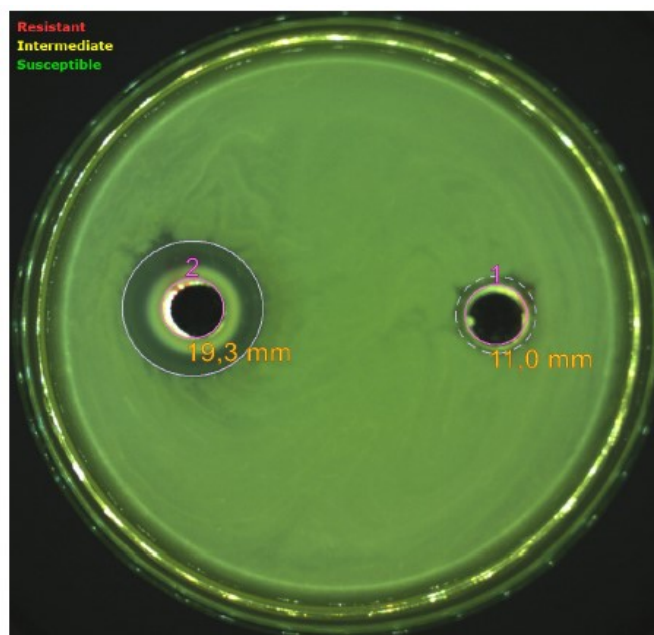
Tab. 13. Velikosti zón inhibice vzorků dezinfekcí

Vzorek č.	Název	Velikost inhibiční zóny [mm]	
		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
1	Anti-COVID	0,33 ± 0,09	0
2	Manox	8,98 ± 0,91	4,67 ± 0,37
3	Desmanol	0	0,33 ± 0,47
4	Mikasept	10,58 ± 0,06	4,55 ± 0,43
5	Care	8,63 ± 0,55	7,12 ± 1,13
6	Cleamen	0,93 ± 0,02	1,15 ± 0,44
7	Agol	9,07 ± 1,06	3,38 ± 0,57
8	Medi Spray	0	0,42 ± 0,59
9	Lavosept	8,95 ± 0,25	2,67 ± 0,36

Pro vizuální doplnění výsledků stanovení inhibičních zón dezinfekčních prostředků je dále uveden obrázek 9. a 10., na kterých je jasně znatelný rozdíl v účinku vzorků č. 3 a 4 proti oběma testovaným bakteriálním kmenům.



Obrázek 9: Inhibiční zóny proti *S. aureus* u vzorků č. 4 (vlevo) a 3 (vpravo)



Obrázek 10 Inhibiční zóny proti *P. aeruginosa* u vzorků č. 4 (vlevo) a 3 (vpravo)

7.2.2 ČSN EN 1040

Testovací bakteriální suspenze byly připraveny vždy čerstvé před samotným testováním tak, jak je popsáno v kapitole 6.3.4. Bakteriální suspenze byly připraveny v mohutnosti $N = 2,0 \cdot 10^8$ CFU/ml pro *Staphylococcus aureus* a $N = 1,2 \cdot 10^8$ CFU/ml pro *Pseudomonas aeruginosa*. Vzorový výpočet je uveden níže.

Obecný vzorec pro výpočet N:

Vzorec (2) vyjadřuje počet buněk na ml v testovací suspenzi. Z důvodu vyhodnocování dvou po sobě jdoucích ředění testovací suspenze se vypočte CFU/ml jako vážený průměr.

$$N = \frac{c}{(n_1 + 0,1 \cdot n_2) \cdot 10^{-6}} \quad (2)$$

kde,

C je součet hodnot V_c vzatých v úvahu;

n_1 je počet hodnot V_c v nižším ředění, tj. 10^{-6} ;

n_2 je počet hodnot V_c ve vyšším ředění, tj. 10^{-7} ;

10^{-6} je ředící faktor odpovídající nižšímu ředění.

Výpočet N pro *Staphylococcus aureus*:

$$N = \frac{198 + 209}{2 \cdot 10^{-6}}$$

$$N = 2,0 \cdot 10^8 \text{ CFU/ml}$$

Norma dále udává nutnost výpočtu hodnoty N_0 (3), která vyjadřuje počet buněk v ml testovací suspenze v kontaktním čase 0 (tedy na začátku testování). Hodnoty byly vypočteny na $N_0 = 2,0 \cdot 10^7$ CFU/ml pro *Staphylococcus aureus* a $N_0 = 1,2 \cdot 10^7$ CFU/ml pro *Pseudomonas aeruginosa*. Vzorový výpočet je opět uveden níže.

Obecný vzorec pro výpočet N_0 :

$$N_0 = N/10 \quad (3)$$

kde,

N vyjadřuje počet buněk na ml v testovací suspenzi.

Výpočet N_0 pro *Staphylococcus aureus*:

$$N_0 = 2,0 \cdot 10^8 / 10$$

$$N_0 = 2,0 \cdot 10^7 \text{ CFU/ml}$$

Vzorový výpočet samotné baktericidní účinnosti Na podle vzorce (4) je uveden níže. Výsledky jsou dále v tabulce 14.

Obecný vzorec pro výpočet Na :

$$Na = \frac{10 \cdot c}{n} \quad (4)$$

kde,

c je součet hodnot V_c vzatých v úvahu;

n je počet hodnot V_c .

Ukázkový výpočet Na pro vzorek č. 5 při ředění 10^{-4} u *Staphylococcus aureus*:

$$Na = \frac{10 \cdot (169 + 153)}{10^{-4}}$$

$$Na = 3,2 \cdot 10^7$$

Tato metoda je navržena tak, že je základní testovaná koncentrace dezinfekčního prostředku rovna 80 % objemovým. Norma poté navrhuje testování dalších ředění testovaných dezinfekcí. Bohužel z důvodu vládních nařízení kvůli opatřením k eliminaci šíření nového typu koronaviru bylo možné provést stanovení baktericidního účinku pouze u základní koncentrace dezinfekcí, navíc testování v laboratoři nebylo již možné opakovat.

Získaná a vypočtená data baktericidního účinku dezinfekčních přípravků v koncentraci 80 % jsou uvedeny v tabulce 14. U všech vzorků kromě vzorku č. 5 (dezinfekční prostředek Care) nebyly po kultivaci obou bakteriálních kmenů na Petriho miskách nalezeny narostlé kolonie bakterií. Důvodů může být několik. Jedním z nich je, že testovaná základní koncentrace dezinfekcí je baktericidní. V porovnání s odbornou literaturou studující účinnost různých dezinfekčních přípravků jsou získaná data srovnatelná. Studie autorů G. Wirtanen a S. Salotaké také potvrzuje, že alkoholové dezinfekce s obsahem alespoň 75 % účinkují baktericidně. Nižší antibakteriální účinnost vzorku č. 5 může být způsobena nedostatečným obsahem alkoholu ve složení. Nicméně v porovnání s výsledky inhibičních

zón se tento vzorek jeví jako účinný. Pravděpodobně je zapotřebí nechat tuto dezinfekci působit po delší dobu k dosažení baktericidního efektu. [94; 93; 95]

Tab. 14. Získaná a vypočtená data baktericidního účinku dezinfekčních přípravků

Vzorek č.	<i>Staphylococcus aureus</i>				<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
	Ředění	Vc		Na	Ředění	Vc		Na
1	10^0	0		0	10^0	0		0
	10^{-1}				10^{-1}			
2	10^0	0		0	10^0	0		0
	10^{-1}				10^{-1}			
3	10^0	0		0	10^0	0		0
	10^{-1}				10^{-1}			
4	10^0	0		0	10^0	0		0
	10^{-1}				10^{-1}			
5	10^{-4}	169	153	$3,2 \cdot 10^7$	10^0	54	47	$1,0 \cdot 10^3$
	10^{-5}	18	15	$3,3 \cdot 10^7$	10^{-1}	1	0	$1,0 \cdot 10^2$
6	10^0	0		0	10^0	0		0
	10^{-1}				10^{-1}			
7	10^0	0		0	10^0	0		0
	10^{-1}				10^{-1}			
8	10^0	0		0	10^0	0		0
	10^{-1}				10^{-1}			
9	10^0	0		0	10^0	0		0
	10^{-1}				10^{-1}			

Tabulka 15. shrnuje výsledky validace metody. Z hlediska validace metod ČSN EN 1040 se pracovní postup podle postupu A a B jeví v pořádku. Nicméně hodnoty validační metody C se prokázaly pouze u vzorku dezinfekčního prostředku č. 5. Chyba se pravděpodobně stala při práci s živými mikroorganismy nebo volbou nevhodného neutralizátoru.

Tab. 15. Získaná data validace metody

Vzorek č.	<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
	A	B	C	A	B	C
1	55	37	39	17	22	0
2	56	46	47	10	15	0
3	55	52	49	14	22	0
4	47	53	0	11	23	0
5	53	46	53	27	17	19
6	55	51	53	24	16	0
7	54	51	50	11	17	0
8	49	52	50	17	25	0
9	54	65	45	19	66	0

ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo kvalitativní porovnání devíti vzorků dezinfekčních prostředků na ruce nebo na povrchy. Naměřená data kvalitativní analýzy byla dále porovnána s antibakteriální účinností jednotlivých vzorků dezinfekcí.

První část praktické části se zabývala kvalitativním srovnáním dvou skupin dezinfekčních prostředků z hlediska jejich chemického složení. Výsledky plynové chromatografie potvrdily přítomnost sloučenin, které výrobci uvádějí v bezpečnostních listech. Praktickou analýzou vzorků bylo zjištěno, že je vhodné při těchto analýzách kombinovat stanovení vzorků různými technikami. Bylo totiž zjištěno, že headspace technika neodhalila všechny složky výrobků. Porovnání takto získaných výsledků s výsledky z analýzy kapalného nástřiku pomohla ke komplexnějšímu zhodnocení dezinfekcí.

Výsledky účinku dezinfekčních prostředků z hlediska porovnání tvorby zón inhibice naznačují, že lepší použít kombinaci účinných látek. Oproti tomu testování dle ČSN EN 1040 potvrdilo baktericidní účinek všech testovaných vzorků.

V rámci diplomové práce byla zavedena a optimalizována metodika pro kvalitativní analýzu kapalných kosmetických přípravků obsahujících těkavé složky a dále byla zavedena metodika testování chemických dezinfekčních přípravků a antiseptik podle normy ČSN EN 1040.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. **Martínez, Azor a Cobos-Carrascosa, E.** Effectiveness of a Multifactorial Handwashing Program to Reduce School Absenteeism Due to Acute Gastroenteritis. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 33, 2014, Sv. 2, DOI:10.1097/inf.0000000000000040 .
2. **Reinhold Andreas Lang, Dianne Egli-Gany.** Transdermal absorption of ethanol- and 1-propanol-containing hand disinfectants. *Langenbeck's Archives of Surgery*. 2010.
3. **Herruzo, Rafael a Yela, Rubén.** Lasting hand self-disinfection: A backup for hospital hand hygiene? *American Journal of Infection Control*. 2015, Sv. 43, 7.
4. **Manivannan, Gurusamy.** *Disinfection and decontamination: principles, applications and related issues*. Boca Raton : CRC Press/Taylor & Francis Group, c2008. ISBN 978-0-8493-9074-6.
5. *Principles of food sanitation*. New York : Springer Science and Business Media, 2017. ISBN 978-3-319-67164-2..
6. **Melicherčíková, Věra.** *Sterilizace a dezinfekce. Druhé doplněné a přepracované vydání*. Praha : Galén, 2015. ISBN 9788074921391.
7. **Podstatová, Renata.** *Hygiena a epidemiologie pro ambulantní praxi*. Praha : Maxdorf, c2010. ISBN 9788073452124.
8. **K. Boušová; J. Vaněčková; I. Krčmová.** Profesionální alergie na dezinfekční prostředky. *Pracovní lékařství*. 2, 2008.
9. Dezinfekce, dezinspekce, deratizace (DDD). *Krajská hygienická stanice Středočeského kraje se sídlem v Praze*. [Online] [Citace: 8. 5 2020.] <http://www.khsstc.cz>.
10. **Michael M., CRAMER.** *Food plant sanitation: design, maintenance, and good manufacturing practices*. Boca Raton : Taylor & Francis, 2013. ISBN 9781466511736..
11. NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 2073/2005 ze dne 15. listopadu 2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny. *Úřední věstník Evropské unie*. L 338/1, 2005, ISSN 1725-5074.
12. **Mazánek, Jiří.** *Zubní lékařství: propedeutika*. Praha : Grada, 2014. ISBN 9788024735344..
13. **Kvasničková, Eva, a další, a další.** Medicinální aspekty mikrobiálních filmů. *Chemické listy*. 2016, Sv. 110, 7.

14. **Schindler, Jiří.** *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů.* Praha : Grada, 2014.
15. **Taliánová, Magda.** *Základy dezinfekce a sterilizace ve zdravotnictví.* Pardubice : Univerzita Pardubice, 2015. INSB 9788073959548.
16. **Cramer, Michael M.** *Food plant sanitation: design, maintenance, and good manufacturing practices. Second edition.* Boca Raton : Taylor & Francis, 2013. ISBN:9781466511736.
17. **Moldenhauer, Jeanne.** *Disinfection and decontamination: a practical handbook.* Boca Raton : Taylor & Franci, 2019. ISBN 9781351217019.
18. **Peleg, Micha a Corradini, G. Corradini.** Microbial Growth Curves: What the Models Tell Us. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 51, 2011, Sv. 10.
19. **Rosypal, Stanislav.** *Nový přehled biologie.* místo neznámé : Scientia, 2003. ISBN 8071832685.
20. **Steinhauser, Ladislav.** *Hygiena a technologie masa. 1. vydání.* Brno : Last, 1995. ISBN 80-900260-4-4..
21. **Šilhánková, Ludmila.** *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology.* Praha : Academia, 2008. ISBN 978-80-200-1703-1.
22. **Komprda, Tomáš.** *Obecná hygiena potravin.* Brno : Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2007. ISBN 9788071577577.
23. Aktivita vody. *Informační centrum bezpečnosti potravin, Ministerstvo zemědělství.* [Online] 2020. [Citace: 12. květen 2020.] <https://www.bezpecnostpotravin.cz/>.
24. **Galié, S., a další, a další.** Biofilms in the Food Industry: Health Aspects and Control Methods. *Front Microbiol.* 2018.
25. **Hamplová, Ludmila.** *Mikrobiologie, imunologie, epidemiologie, hygiena pro bakalářské studium a všechny typy zdravotnických škol.* Praha : Stanislav Juhaňák - Triton, 2015. ISBN 9788073879341.
26. **Čechová, Leona a Janalíková, Magda.** *Obecná mikrobiologie.* Zlín : Univerzita Tomáše Bati, 2007. ISBN 978-80-7318-516-9..
27. **Drnková, Barbora.** *Mikrobiologie, imunologie, epidemiologie a hygiena: pro zdravotnické obory.* Praha : Grada Publishing, 2019. ISBN 9788027106936..

28. **Hedlin, P., a další, a další.** Detection and Control of Prion Diseases in Food Animals. *ISRN Vet Sci.* 2012.
29. **Rohan, Z., Rusina, R. a Marešová, M.** Lidská prionová onemocnění v České republice. *Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie.* 2015, 3.
30. BSE (bovinní spongiformní encefalopatie) – neboli nemoc šílených krav. *Státní veterinární správa.* [Online] [Citace: 12. květen 2020.] <https://www.svscr.cz>.
31. **Young, Alan J. a Jürgen, Richt.** Food Safety Implications. *Elsevier.* 2013.
32. **Chlupáčová, Markéta.** Prevence plísňových onemocnění. *Státní zdravotní ústav.* [Online] Praha 2002 . [Citace: 12. květen 2020.] <http://www.szu.cz/>.
33. **Šilhánková, Ludmila.** *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology.* Praha : Academia, 2009. ISBN 978-80-200-1703-1.
34. **McDonnell, Gerald E.** *Antisepsis, disinfection, and sterilization: types, action, and resistance.* Washington, D.C. : ASM Press, c2007. ISBN 9781555813925.
35. **Sansebastiano, Giuliano a Zoni, Roberta.** *Food Food: Cleaning and Disinfection Procedures in the Food Industry General Aspects and Practical Applications.* 2007. DOI:10.1007/978-0-387-33957-3_13. .
36. **Moorer, W.** Antiviral activity of alcohol for surface disinfection. *International Journal of Dental Hygiene.* c2003, Sv. 1, stránky 138-142.
37. **Song, X, Vossebein, L a Zille, A.** Efficacy of disinfectant-impregnated wipes used for surface disinfection in hospitals: a review. *Antimicrob Resist Infect Control.* Aug 19., 2019, DOI:10.1186/s13756-019-0595-2.
38. **Sattar, Syed A. a Maillard, Jean-Yves.** The crucial role of wiping in decontamination of high-touch environmental surfaces: Review of current status and directions for the future. *American Journal of Infection Control.* May 2013, Sv. 41, 5.
39. Modern technologies for improving cleaning and disinfection of environmental surfaces in hospitals. *Antimicrob Resist Infect Control.* 5, 2016, Sv. 10.
40. **Weber, D. J. a Rutala, W. A.** Self-disinfecting surfaces: review of current methodologies and future prospects. *Am J Infect Control.* 41, 2013, Sv. 5.
41. **Weber, David J. a Rutala, William A.** Self-disinfecting surfaces: review of current methodologies and future prospects. *American journal of infection control.* 2013, Sv. 41, 5.

42. **Gebel, J., Exner, M. a French, G.** The role of surface disinfection in infection prevention. *GMS Hyg Infect Control*. 2013.
43. NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (EU) č. 528/2012 ze dne 22. května 2012 o dodávání biocidních přípravků na trh a jejich používání. *Úřední věstník Evropské unie* . L 167/1, 2012.
44. Technical Bodies. *Comité Européen de Normalisation*. [Online] 2020. [Citace: 12. květen 2020.] <https://standards.cen.eu/>.
45. **Rotter M et al.** Methods to evaluate the microbicidal activities of hand-rub and hand-wash agents. *The Journal of hospital infection*. 73, 2009, Sv. 3.
46. ASTM International. [Online] 2020. [Citace: 12. května 2020.] <https://www.astm.org/>.
47. **McDonnell, Gerald a Sheard, Denise.** *A Practical Guide to Decontamination in Healthcare*. Chichester : John Wiley & Sons Ltd, 2012. ISBN 9781118321324.
48. **Rosina, Jozef, Kolářová, Hana a Stanek, Jiří.** *Biofyzika pro studenty zdravotnických oborů*. Praha : Grada, 2006. ISBN 80-247-1383-7.
49. **Li, Song a Li, Wei.** Development of a Pulsed Xenon Ultraviolet Disinfection Device for Real-Time Air Disinfection in Ambulances. *Journal of Healthcare Engineering*. 2020.
50. **Lullmann, Heinz, Mohr, Klaus a Wehling, Martin.** *Farmakologie a toxikologie. Vyd. 2.* . Praha : autor neznámý, 2004. ISBN 8024708361.
51. American Chemical Society . [Online] [Citace: 8. 3 2020.] www.acs.org.
52. **Lelieveld, H. L. M.** *Hygiene in food processing*. Boca Raton : FL: CRC Press, 2003. ISBN 1855734664.
53. **Winter, Ruth.** *A consumer's dictionary of food additives*. 7th ed. New York : Three Rivers Press, c2009. ISBN 9780307408921.
54. **White, George Clifford.** *White's handbook of chlorination and alternative disinfectants*. 5th ed. Hoboken, N.J. : Wiley, c2010. ISBN 9780470180983.
55. **Hampl, František, Rádl, Stanislav a Paleček, Jaroslav.** *Farmakochemie. 3., upravené a rozšířené vydání*. Praha : VŠCHT Praha, 2015.
56. **Lelieveld, H. L. M.** *Handbook of hygiene control in the food industry. 1. Editor*. Cambridge : Woodhead Publishing Limited, 2015. ISBN 9781855739574..

57. **Fraud, S., Maillard, J. Y. a Russell, A. D.** Comparison of the mycobactericidal activity of ortho- phthalaldehyde, glutaraldehyde and other dialdehydes by a quantitative suspension test. *J Hosp Infect.* 2001.
58. **Stanga, Mario.** *Sanitation: cleaning and disinfection in the food industry.* Weinheim : Wiley-VCH, c2010. ISBN 978-3-527-32685-3.
59. **Farn, Richard J.** *Chemistry and technology of surfactants.* Ames, Iowa : Blackwell Pub., 2006. ISBN 9781405126960..
60. **Ludvík, Miroslav.** *Český lékopis 2017: Tištěná verze (1.-4. díl).* Praha : Ministerstvo zdravotnictví ČR, 2017. Grada.
61. **McNair, Harold Monroe, Miller, James M., Snow, Nicholas H.** *Basic gas chromatography.* místo neznámé : John Wiley & Son, 2019. ISBN: 9781119450788.
62. Aplikační list - Plynová chromatografie s HiQ® speciálními plyny. *Linde Gas a.s.* [Online] 2020. [Citace: 12. květen 2020.] <https://www.linde-gas.cz>.
63. **Štěrba, Karel, Dostálek, Pavel a Karabín, Marcel.** MODERNÍ POSTUPY VYUŽÍVANÉ PŘI PŘÍPRAVĚ VZORKŮ PRO STANOVENÍ ALKOHOLŮ, ESTERŮ A KYSELIN V PIVU. *Chemické listy* 105. 2011.
64. **Robert L. Grob, Eugene F. Barry.** *Modern Practice Of Gas Chromatography.* místo neznámé : Wiley-Interscience, 2004. ISBN: 9780471651154.
65. 1 mL Gastight Syringe Model 1001 LTN. *Hamilton Company.* [Online] 2020. [Citace: 12. květen 2020.] <https://www.hamiltoncompany.com/>.
66. 5 µL Microliter Syringe Model 75 N. *Hamilton Company.* [Online] 2020. [Citace: 12. květen 2020.] <https://www.hamiltoncompany.com>.
67. Stabilwax-MS GC kapilární kolona. *CHROMSERVIS s.r.o.* [Online] [Citace: 13. Květen 2020.] <https://www.chromservis.eu>.
68. **Jain VM, Karibasappa GN, Dodamani AS, Prashanth VK, Mali GV.** Comparative assessment of antimicrobial efficacy of different hand sanitizers: An in vitro study. *Dent Res J (Isfahan).* 2016, Sv. 13, 5.
69. *Česká technická norma 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). Praha : Český normalizační institut, 2006.

70. **Vojtěch, Adam.** Rozhodnutí o dodávání biocidního přípravku na trh - Anti-COVID. *Ministerstvo zdravotnictví České republiky.* [Online] 24. Března 2020. [Citace: 12. Květen 2020.]

71. **Fišer, Zdeněk.** Bezpečnostní listy. <https://www.uklizenoshop.cz>. [Online] [Citace: 11. Květen 2020.] <https://www.uklizenoshop.cz>.

72. **Koch, Robert.** Bezpečnostní list. *Nora a.s.* [Online] 3. Března 2020. <https://www.nora-as.cz>.

73. **Mikasept.** Bezpečnostní list. *MedHelp, s.r.o.* [Online] [Citace: 11. Květen 2020.] <https://www.medhelp-shop.sk>.

74. **Hankova, Simona.** Bezpečnostní list. *ALFA CLASSIC, a.s.* [Online] [Citace: 3. Března 2020.] <https://eshop.alfaclassic.cz>.

75. **AP, CLEAMEN 540 dezi.** Bezpečnostní list. *Cormen - výroba kosmetiky, bytové a průmyslové drogerie, chemie, dezinfekce.* [Online] [Citace: 12. Května 2020.] <https://cormen.cz>.

76. **Fišer, Zdeněk.** Bezpečnostní list. *Uklizenoshop.cz - úklidové prostředky.* [Online] 1. Zář 2015. [Citace: 12. Května 2020.] <https://www.uklizenoshop.cz>.

77. **Gromadzki, Grzegorz.** Bezpečnostní list. *Medplus.* [Online] Medi-Sept Sp. z o. o., 2020. Března 2020. [Citace: 12. Května 12.] <http://www.medplus.cz>.

78. Bezpečnostní list. *AMOENÉ FAMILY COMPANY.* [Online] [Citace: 11. Květen 2020.] <https://www.amoeneshop.cz>.

79. Katalog kultur. *České sbírky mikroorganismů (CCM).* [Online] 20. Duben 2020. [Citace: 13. Květen 2020.] <https://www.sci.muni.cz>.

80. **Fink, Roy.** *Good Hygiene Practices and Their Prevention of Biofilms in the Food Industry.* místo neznámé : Cambridge Scholars Publishing, 2019. ISBN 9781527536777.

81. **Schindler, Jiří.** *Mikrobiologie: Pro studenty zdravotnických oborů.* Praha : Grada, 2009. ISBN 978-80-247-3170-4.

82. **Kopecká, Jana a Rotrová, Gabriela.** Skripta ke cvičení z obecné mikrobiologie, cytologie a morfolgie bakterií. *Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity*. [Online] 2017. [Citace: 12. Květen 2020.] <https://is.muni.cz>.
83. **Bio-Rad.** Izolační médium pro testování antimikrobiální citlivosti. *Bio-Rad*. [Online] červen 2010. [Citace: 13. Květen 2020.] <https://www.bio-rad.com/>.
84. ČSN EN ISO 11930 - Kosmetika - Mikrobiologie - Hodnocení antimikrobiální ochrany kosmetického výrobku. *Technické normy*. [Online] 2019. [Citace: 12. květen 2020.] <https://www.technickenormy.cz/>.
85. **Schueller, Randy a Romanowski, Perry.** *Conditioning Agents for Hair and Skin (Cosmetic Science and Technology)*. místo neznámé : CRC Press , 1999. ISBN 9780824719210.
86. **Liu Y, Wang H, Yang H, Shi H, Guo Q.** Simultaneous determination of 3 benzalkonium chloride homologs in cosmetics by high performance liquid chromatography. *Se Pu*. 2011, Sv. 29, 5.
87. **Kostic, Danijela A. a Mitic, Snezana S.** Determination of Benzalkonium Chloride in Nasal Drops by High-Performance Liquid Chromatography. *E-Journal of Chemistry*. 12, Sv. 3, 3.
88. **Burdock, George A.** *Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients*. místo neznámé : CRC Press, 2016. ISBN 9781420090864.
89. **Martínez, María-Carmen.** Narcea—an unknown, ancient cultivated rose variety from northern Spain. *Horticulture Research* . 2020.
90. **Hong, J.** Oxidation of benzalkonium chloride in aqueous solution by $S_2O_8^{2-}/Fe^{2+}$ process: Degradation pathway, and toxicity evaluation. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineer*. 2017, Sv. 78.
91. **Jain, Vardhaman Mulchand.** Comparative assessment of antimicrobial efficacy of different hand sanitizers: An in vitro study. *Dent Res J (Isfahan)*. 2016, Sv. 13, 5.
92. **Wińska, Katarzyna.** Essential Oils as Antimicrobial Agents—Myth or Real Alternative? *Molecules*. 2019.
93. **Sener, Ayla a Temiz, Ayhan.** Efficacy of some commercial disinfectants against the bacterial isolates from a poultry slaughterhouse in Turkey. *Annals of Microbiology*. 2007.

94. **Wirtanen, G. a Salo , S.** Disinfection in Food Processing – Efficacy Testing of Disinfectants.
95. Log reduction values of various hand Sanitizers in the Kenyan market. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*. [Online] [Citace: 12. květen 2020.] <https://aricjournal.biomedcentral.com/>.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ASTM	American Society for Testing and Materials
a_w	Vodní aktivita
BS	Buněčná stěna
CEN	Comité Européen de Normalisation (Evropská komise pro normalizaci)
CJD	Creutzfeldt-Jakobova nemoc
CLP	Klasifikace, označování a balení látek a směsí
č.	číslo
ČSN	Česká technická norma
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DP	Dezinfekční prostředek
EN	Evropskou normu
ES	Evropská společenství
EU	Evropská unie
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration)
GC	Gas chromatography (Plynová chromatografie)
HBV	Hepatitida B
HC	Health Canada
HCV	Hepatitida C
HIV	Human Immunodeficiency Virus
KAS	Kvartérní amoniové sloučeniny
LPS	Lipopolysacharidy
MHA	Mueller-Hinton agar
MS	Mas spectrometer (Hmotnostní spektrometr)

NIST	National Institute of Standards and Technology
OECD	Organisation for Economic Co-Operation and Development
OPA	Orto-ftalaldehyd
PrP	Prionový protein
PrPSc	Prionový protein scrapie
REACH	Registrace, evaluace, autorizace a omezování chemických látek (registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals)
RNA	Ribonukleová kyselina
R _t	Retenční čas
Sb.	Sbírka zákonů
TSA	Tryptic Soy Agar
TC 216	Technický dokument 216
USA	Spojené státy americké (United States of America,)
UV	Ultrafialové (z anglického ultraviole)
WHO	World Health Organization (Světová zdravotnická organizace)
WG	Pracovní skupiny (working groups)

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obrázek 1: Pyramida resistance mikroorganismů k běžným dezinfekčním prostředkům [15]</i>	<i>15</i>
<i>Obrázek 2: Dávkovací stříkačka pro kapalný vzorek (vlevo) a pro headspace techniku (vpravo) [60; 61]</i>	<i>40</i>
<i>Obrázek 3 Schematické znázornění postupu testu N_a [58]</i>	<i>58</i>
<i>Obrázek 4 Schematické znázornění kontroly experimentálních podmínek [58]</i>	<i>59</i>
<i>Obrázek 5 Schematické znázornění kontroly neutralizátoru [58]</i>	<i>60</i>
<i>Obrázek 6 Schematické znázornění validace metody [58]</i>	<i>61</i>
<i>Obrázek 7: Porovnání spekter vzorků alkoholových dezinfekcí na ruce</i>	<i>64</i>
<i>Obrázek 8: MS spektrum vzorku č. 5. (Care alkoholový čistič)</i>	<i>67</i>
<i>Obrázek 9: Inhibiční zóny proti <i>S. aureus</i> u vzorků č. 4 (vlevo) a 3 (vpravo)</i>	<i>71</i>
<i>Obrázek 10 Inhibiční zóny proti <i>P. aeruginosa</i> u vzorků č. 4 (vlevo) a 3 (vpravo)....</i>	<i>71</i>

SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 1. Pracovní označení vzorků</i>	45
<i>Tab. 2. Složení vzorku č. 1.</i>	46
<i>Tab. 3. Složení vzorku č. 2. [60]</i>	46
<i>Tab. 4. Složení vzorku č. 3. [61]</i>	47
<i>Tab. 5. Složení vzorku č. 4. [62]</i>	48
<i>Tab. 2. Složení vzorku č. 5. [63]</i>	48
<i>Tab. 7. Složení vzorku č. 6. [64]</i>	49
<i>Tab. 8. Složení vzorku č. 7. [65]</i>	49
<i>Tab. 9. Složení vzorku č. 8. [66]</i>	50
<i>Tab. 10. Složení vzorku č. 9. [67]</i>	51
<i>Tab. 11. Stanovené látky ve vzorcích dezinfekcí – kapalný nástřik</i>	65
<i>Tab. 12. Stanovené látky ve vzorcích dezinfekcí – headspace</i>	68
<i>Tab. 13. Velikosti zón inhibice vzorků dezinfekcí</i>	70
<i>Tab. 14. Získaná a vypočtená data baktericidního účinku dezinfekčních přípravků</i> ..	74
<i>Tab. 15. Získaná data validace metody</i>	75

