



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

SROVNÁNÍ ANTIMIKROBIÁLNÍHO ÚČINKU ČISTÍCÍCH A DEZINFEKČNÍCH EMULZÍ.

COMPARISON OF ANTIMICROBIAL EFFECT OF EMULSIONS FOR CLEANING AND DISSINFECTION

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Edita Chrápavá

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

BRNO 2021

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1638/2020 Akademický rok: 2020/21
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Edita Chrápavá**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.**

Název bakalářské práce:

Srovnání antimikrobiálního účinku čistících a dezinfekčních emulzí.

Zadání bakalářské práce:

1. Přehled složení a aktivních látek kosmetických emulzí s čistícím a dezinfekčním účinkem
2. Optimalizace metod stanovení aktivních složek a antimikrobiální aktivity
3. Analýza vybraných typů emulzí
4. Vyhodnocení a diskuse výsledků

Termín odevzdání bakalářské práce: 30.7.2021:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Edita Chrápavá
student(ka)

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

V současné době jsou dezinfekční gely na ruce a jiné dezinfekční přípravky velice žádaným zbožím. Z důvodu pandemie a šíření nemoci Covid-19 jsou denně využívány celou společností. Důvodem jejich používání je nejen zamezení šíření bakterií a jiných mikroorganismů z rukou na jiné části těla či předměty, ale také prevence šíření nákazy.

Předmětem bakalářské práce je ověření antimikrobiálních účinků několika běžně dostupných dezinfekčních přípravků za použití bujónové diluční metody a agarové metody.

ABSTRACT

Currently, hand disinfectants and other disinfectants are in high demand. Due to the pandemics and the dissemination of Covid-19, they are used by society daily. The reason for their use is not only to prevent the dissemination of bacteria and other microorganisms from the hands to another part of the body or objects, but also to prevent the propagation of the disease.

The subject of the bachelor thesis is the control of antimicrobial effects of several commonly available disinfectants using broth and agar dilution methods. From the measured data, bacterial growth was measured and subsequently viability of the culture was evaluated.

KLÍČOVÁ SLOVA

mikroorganismus, dezinfekce, viabilita

KEYWORDS

microorganism, disinfection, viability

CHRÁPAVÁ, Edita. *Srovnání antimikrobiálního účinku čisticích a dezinfekčních emulzí*. Brno, 2021. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131817>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Ivana Márová.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

DECLARATION

I declare that the bachelor thesis has been worked out by myself and that all the quotations from the used literary sources are accurate and complete. The content of the bachelor thesis is the property of the Faculty of Chemistry of Brno University of Technology and all commercial uses are allowed only if approved by both the supervisor and the dean of the Faculty of Chemistry, BUT.

.....
student's signature

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucí mé bakalářské práce prof. RNDr. Ivaně Márové, CSc. za odborný dohled a vedení práce. Mé velké poděkování patří také Ing. Renatě Pavelkové za cenné rady a pomoc při praktické části práce.

Obsah

1	ÚVOD.....	8
2	TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1.1	Mikroorganismy.....	9
2.2	Rozdělení mikroorganismů.....	9
2.2.1	Grampozitivní bakterie	9
2.2.2	Gramnegativní bakterie.....	9
2.2.3	Kvasinky	9
2.3	Kožní mikroflóra.....	9
2.3.1	Škodlivé mikroorganismy vyskytující se na pokožce těla.....	10
2.3.2	Škodlivá bakterie na obličeji.....	10
2.3.3	Prospěšné mikroorganismy	11
2.4	Bakteriální buňka a její skladba	12
2.4.1	Nukleotid.....	12
2.4.2	Cytosol	12
2.4.3	Plazmidy	12
2.4.4	Ribozomy	12
2.4.5	Cytoplazmatická membrána.....	13
2.4.6	Buněčná stěna	13
2.4.7	Fimbrie.....	13
2.4.8	Bičík.....	13
2.5	Mikrobiologické metody.....	13
2.5.1	Kultivace bakterií.....	13
2.5.2	Kultivační media	14
2.6	Antimikrobiální účinek	14
2.6.1	Bakteriostatický a baktericidní účinek.....	15
2.7	Analýza antimikrobiálního účinku.....	15
2.7.1	Disková difuzní metoda	15
2.7.2	Agarová diluční metoda	15
2.7.3	Bujónová diluční metoda	15
2.7.4	Metoda E-test	16
2.8	Analytické metody	16
2.8.1	Spektrofotometrie	16
2.9	Druhy testovacích modelových mikroorganismů	16
2.9.1	Kvasinky	16
2.9.2	Kožní bakterie.....	17
2.10	Látky s antimikrobiálním účinkem	18

2.10.1	Antibiotika	18
2.10.2	Antimykotika	18
2.11	Aktivní složky v dezinfekčních emulzích na ruce	19
2.11.1	Ethanol	19
2.11.2	Chlorhexidin	19
2.11.3	Jodofory	20
2.11.4	Trizenoly	20
2.12	Aktivní antimikrobiální složky v emulzích na pleť	20
2.12.1	Benzoylperoxid	20
2.12.2	Kyselina azelaová	20
2.12.3	Kyselina salicylová	21
2.13	Emulze	21
2.14	Normy pro desinfekci rukou	21
2.14.1	Baktericidní norma EN 12054	22
2.14.2	Virucidní norma EN 14476	23
3	CÍL PRÁCE	23
4	PRAKTICKÁ ČÁST	24
4.1	Použité mikroorganismy	24
4.2	Použité chemikálie	24
4.3	Použité přístroje	24
4.4	Kultivace mikroorganismů	25
4.5	Příprava vzorků dezinfekcí	25
4.6	Antimikrobiální testy – bujónová diluční metoda	27
4.7	Viabilita mikroorganismů	28
4.8	Antimikrobiální testy – test baktericidního účinku	28
5	VÝSLEDKY	29
5.1	Vyhodnocení bujónové diluční metody	29
5.1.1	Výsledky testů antimikrobiálních prostředků na bakterii <i>Micrococcus luteus</i>	29
5.1.2	Výsledky testů antimikrobiálních prostředků na bakterii <i>Serratia marcescens</i>	35
5.1.3	Výsledky testů antimikrobiálních prostředků na bakterii <i>Escherichia coli</i>	41
5.1.4	Výsledky testů antimikrobiálních prostředků na bakterii <i>Cultibacterium acnes</i>	47
5.1.5	Výsledky testů antimikrobiálních prostředků na bakterii <i>Staphylococcus epidermidis</i>	53
5.1.6	Výsledky testů antimikrobiálních prostředků na kvasince <i>Candida glabrata</i> ..	59
5.2	Vyhodnocení testu baktericidní účinnosti	66
6	ZÁVĚR	68

7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	70
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	72

1 ÚVOD

Vzhledem k současné pandemii a šíření nemoci Covid-19 se celosvětově zvýšila poptávka po dezinfekčních a čistících přípravcích na ruce. Velmi rychle došlo k tomu, že se farmaceutické firmy začaly situaci přizpůsobovat a započala masivní výroba různých dezinfekčních přípravků s různými účinnými látkami. Téměř každá farmaceutická či kosmetická firma na světě již má ve své nabídce dezinfekční gely či mýdla. Tyto antimikrobiální přípravky slibují zničení vysokého procenta mikroorganismů, které se na lidské kůži hromadí a fungují jako prevence proti nákaze člověka, ale i jako prevenci proti šíření nemoci dál.

Na lidských rukou se během dne může nahromadit několik druhů mikroorganismů. Některé z nich žijí na kůži neustále a mohou být velice prospěšné, protože povrch kůže chrání. Bohužel se na kůži ale nevyskytují jen ty prospěšné, ale ve velké míře na kůži přežívají škodlivé mikroorganismy, které mohou způsobovat řadu potíží, pokud nejsou zavčas zničeny. K zabránění růstu těchto mikroorganismů a jejich množení byla vyvinuta řada dezinfekčních prostředků různého typu od klasického mýdla až po specifické dezinfekční roztoky a gely.

Cílem práce je srovnat účinek některých běžných druhů dezinfekčních prostředků proti vybraným zástupcům mikroorganismů, zejména bakterií. Prostředky pro běžnou dezinfekci a mýdla dostupná na našem trhu byla podrobena antimikrobiálním testům, jejichž cílem bylo srovnání účinnosti preparátů za účelem doporučení nejvhodnějších typů dezinfekce a ověření veřejně dostupných a propagovaných údajů o těchto přípravcích.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1.1 Mikroorganismy

Mikroorganismy jsou jednobuněčné organismy, které jsou pozorovatelné pouze pod mikroskopem. Vytvářejí kolonie, nebo symbiotická společenstva. Většina mikroorganismů se řadí mezi prokaryota. Jsou to odolné organismy, které přežívají i ve velmi nepříznivých podmínkách a nacházejí se téměř v každém prostředí [1].

2.2 Rozdělení mikroorganismů

Mikroorganismy můžeme rozdělit na grampozitivní a gramnegativní dle diagnostického barvení podle Gramovy metody a také na aerobní a anaerobní.

2.2.1 Grampozitivní bakterie

Jako grampozitivní se označují takové bakterie, které se po provedení barvení podle Gramovy metody pod mikroskopem jeví jako modrofialové. Barva je zapříčiněna vysokým obsahem peptidoglykanu a polysacharidů v buněčné stěně, kterými prochází kyselina teichoová. Při postupu barvení se tak krystalová violeť dostává do buněk a tvoří s Lugolovým roztokem modrou barvu. Alkohol následně není schopen buněčnou stěnu prostoupit a rozpustit tento modrý komplex. Tyto bakterie také postrádají vnější membránu a lipopolysacharidovou vrstvu. Mezi zástupce G⁺ bakterií patří rody *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* (koky) a jiné [2].

2.2.2 Gramnegativní bakterie

Jako gramnegativní označujeme bakterie, jejichž stěna je tvořena tenkou vrstvou peptidoglykanu a vrstvou lipopolysacharidu. Při postupu Gramova barvení pak na rozdíl od G⁺ dochází k vyplavení barevného komplexu alkoholem. Bakterie se obarví červeně. Mezi zástupce patří rody *Neisseria* (koky), *Bordetella* (kokobacily) a jiné [3].

2.2.3 Kvasinky

Tento druh mikroorganismů patří mezi jednobuněčné houbové organismy. Mají velký význam pro medicínu z toho důvodu, že jsou schopny vyvolávat některá onemocnění. Mezi patogenní kvasinky se řadí třeba druh *Candida* [4].

Mikroorganismy můžeme také rozdělit podle potřeby kyslíku na aerobní a anaerobní.

2.3 Kožní mikroflóra

Kůže je největším orgánem lidského těla a slouží mimo jiné jako bariéra mezi vnitřním a vnějším prostředím. Hlavní funkcí kůže je chránit tělo před cizorodými organismy a toxickými látkami. Také má za úkol udržovat rovnováhu tekutin a elektrolytů. Povrch kůže osídlují nejrůznější druhy mikroorganismů a tyto mikroorganismy tvoří tzv. kožní mikroflóru. Většina

mikroorganismů žije ve vzájemné symbióze s lidským tělem a hostiteli (člověku) neškodí. Znamená to také, že i když dojde k poranění kůže, tak navzdory bakteriím na jejím povrchu nedochází vždy k infikování rány. Nebezpečí infekce hrozí například při snížené imunitě, nebo v přítomnosti velkého množství bakterií. Mikroby mohou způsobovat kožní onemocnění a vstupovat do krevního řečiště, čímž mohou způsobovat různá vnitřní onemocnění. Zdraví jedinci s neoslabenou imunitou odolávají těmto mikroorganismům pomocí přirozené obranyschopnosti. Neporušená kůže dospělého člověka je osídlena až tisícem druhů bakterií. Většina bakterií se nachází na epidermis, což je vrchní vrstva kůže. Obvykle se jedná o bakterie nepatogenní a o bakterie, které mohou poskytovat prevenci před patogenními organismy [5]. Osídlení kůže bakteriemi začíná ihned po narození. Jedním z důvodů, proč se typ a počet bakterií na kůži málo mění, je pH pokožky, které má obvykle hodnotu menší než 5. Kyselé pH kůže tak způsobuje, že bakterie se na kůži udrží, naproti tomu zásadité pH podporuje jejich rozšíření mimo kožní povrch. Dalším důvodem, proč mikroorganismy na kůži konstantně zůstávají v takovém počtu, je neustálé obnovování kůže, totiž odlupování vnější vrstvy kůže, která se obnovuje zhruba jednou za měsíc a každou hodinu se odloučí až 40 tisíc buněk [5].

2.3.1 Škodlivé mikroorganismy vyskytující se na pokožce těla

Jak již bylo řečeno výše, fyziologické pH pokožky je nižší než 5. V takovém prostředí je pokožka osídlena přirozenou, zdravou mikroflórou. Změna pH může mít za následek výskyt bakterií, které mohou způsobit bakteriální infekce, mluvíme o bakteriích patogenních. Změna pH může být vyvolána různými faktory prostředí. Faktory, které mohou přispět ke změnám v kožní mikrobiotě zahrnují hustotu mazových a potních žláz, věk a pohlaví hostitele a také vnější faktory prostředí (jako je zaměstnání, klima a hygiena). Pokud se ale zaměříme přímo na bakterie na kůži, tak se tam mohou dostat při kontaktu s okolním prostředím a přichytnou se na rohovou vrstvu pokožky. Vniknutí bakterie do kůže usnadňují drobná poranění kůže nebo nedostatečná hygiena. Při porušení mikrobiální rovnováhy může dojít k široké škále kožních poruch, a to částečně právě kvůli mikrobiální složce. Mezi tyto poruchy patří atopická dermatitida, akné, seborhoická dermatitida a chronické rány. Běžně se vyskytující bakterie na pokožce, například *Staphylococcus epidermidis*, se navíc mohou stát patogenními a způsobit invazivní infekci [6].

Dalším příkladem patogenní bakterie, která se může vyskytnout na povrchu pokožky je *E.coli*, jejíž fyziologický výskyt je pouze ve střevě člověka, nikoliv na povrchu kůže.

2.3.2 Škodlivá bakterie na obličeji

Velmi citlivým místem na výskyt bakterií je kůže obličeje. Na tomto místě může být spousta bakterií škodlivá, a to například bakterie způsobující akné. Akné je jedno z nejčastějších onemocnění kůže, které vzniká v důsledku zánětu vývodu mazových žláz. Stav akné se pak zhoršuje přítomností kvasinek, roztočů, nebo bakterií. S tímto onemocněním se pojí bakterie *Cultibacterium acnes*, což je pomalu rostoucí grampozitivní bakterie, která je součástí běžné mikroflóry u většiny lidí. Tato bakterie se živí mastnými kyselinami, které jsou obsaženy v kožním mazu a mazových žlázách. Označení *Propionibacterium acnes* získala v důsledku schopnosti produkce kyseliny propionové. Pokud dojde k zanesení vývodu mazové žlázy,

Cultibacterium acnes se přemnoží a začne vylučovat látky, které narušují stěnu póru. Umožní bakteriím jako je *Staphylococcus aureus* se více šířit do kůže a začnou se tvořit vřidky, nebo cysty – akné [7].

Onemocnění způsobené bakterií *Cultibacterium acnes* lze léčit například podáním benzoylperoxidu, antibiotiky a jinými antibakteriálními látkami. Léčba akné způsobeného bakterií *Cultibacterium acnes* může mít více podob. Lze předepsat antibiotika, která se používají k léčení závažnějších forem akné. Jde např.: o tetracykliny, klindamyciny, nebo makrolidová antibiotika, jako jsou erythromycin a azithromycin. Další formou léčby akné jsou antimikrobiální látky, např.: retinoidy, kyseliny využívané k chemickému peelingu, nebo třeba zinek. Antibiotika předepsaná na akné mohou být lokální nebo systémová. Pro systémovou léčbu, která bývá vyhrazená na závažnější akné, se využívají perorální tetracykliny. V současné době se proti *Cultibacterium acnes* jako antibiotikum využívá hlavně tetracyklin klindamycin. Bakterie je také citlivá na některé makrolidy, např.: azithromycin. K lokální léčbě se využívají klindamycin a erythromycin v kombinaci s benzoylperoxidem a octanem zinečnatým. Další využívaná antibiotika k léčbě mikrobiální infekce jsou nadifloxacin, ciprofloxacin, ofloxacin a levofloxacin [8].

Vysokou citlivost tato bakterie vykazuje také vůči UV záření, které ji ničí a obzvláště citlivá je na světlo o vlnové délce 404–420 nm.

2.3.3 Prospěšné mikroorganismy

Mikroorganismy, které žijí na povrchu kůže člověka, prakticky v symbióze s člověkem, jsou organismy, které vytváří kožní mikrobiom a jsou pro nás prospěšné. Na kůži jde o bakterie, které nás chrání před vnějšími vlivy. Mezi zástupce přirozeného mikrobiomu kůže patří např.: *Staphylococcus epidermidis* (bakterie), druh *Malassezia* (kvasinky) a *Demodex folliculorum* (roztoči). Nejvíce se vyskytujícími bakteriemi na lidské kůži jsou *Staphylococcus epidermidis* a *Staphylococcus aureus*. Ačkoliv jsou tyto dva druhy nejběžnější a nejvíce se vyskytující, tvoří pouhých 5 % všech bakterií na kůži. Většina bakterií, které se na kůži vyskytují, pochází ze 4 kmenů, a to *Actinobacteria*, který tvoří 51,8 %, *Firmicutes* tvořící 24,3 %, *Proteobacteria*, tvořící 16,5 % a *Bacteroidetes*, tvořící zhruba 6 %. Jednotlivé mikroorganismy se liší lokalizací na těle člověka. Na místech s vyšším podílem mazových žláz, jako například na tváři, zádech, nebo ve vlasech se vyskytuje více lipofilních druhů a naopak bakterie, kterým se daří ve vlhkém prostředí, se vyskytují v ohybech. Obecně existují 3 hlavní oblasti výskytu bakterií, tzn. ekologické oblasti. První oblastí je mazová oblast. Hlavními druhy v mazových oblastech jsou *Propionibacteria* a *Staphylococci*. Ve vlhké oblasti dominují korynebakterie společně se stafylokoky. V suchých oblastech, tzn. na suchých místech lidského těla (lokty, stehna, kolena), se vyskytuje směs druhů, přičemž tím dominantním jsou *Proteobacteria* a *Flavobacteriales*. Mazové oblasti jsou obecně na výskyt bakterií bohatší než suché a vlhké oblasti [5].

Mnoho z těchto bakterií není pasivních, ale jsou přizpůsobeny konkrétním podmínkám spojeným s životem v těchto částech kůže. Jedná se například o projevy vysoušení kůže, vylučování mazu, vystavení čistícím prostředkům při úklidu, mýdlům nebo vystavení UV záření. Hygiena kůže, zejména mytí rukou, je primárním mechanismem pro snížení kontaktu a přenosu infekcí. Přílišné používání čistících prostředků ale může vyvolat poškození kožní

bariéry. Ačkoliv jsou bakterie rozšířené po celém povrchu těla, jedním z nejvíce postižených mikrobiálních míst pokožky jsou dlaně, a to hlavně kvůli rozmanitému vystavení povrchům. Organismus může přijít do kontaktu s mikroorganismy úplně všude, a to i kdekoliv ve vzduchu. Jsou to například tzn. vzdušné bakterie, které se přenášejí vdechnutím, kýchnutím, nebo dotykem. Nejčastějším výskytem těchto mikroorganismů bývá usazený prach a klimatizační jednotky. Ve vnitřním ovzduší můžeme nalézt například bakterii *Micrococcus luteus* a *Staphylococcus epidermis*. [9; 10].

2.4 Bakteriální buňka a její skladba

Mikroorganismy jsou jednobuněčné, pouze mikroskopicky pozorovatelné organismy. Převážně se mezi mikroorganismy řadí Prokaryota, což jsou bakterie a archebakterie. Patří k nim také plísně, kvasinky, zástupci řas a prvoci. Mají rozmanité metabolické dráhy a jsou schopné přežít i v nepříznivých podmínkách. Vyskytují se především v koloniích, nebo v symbiotických společenstvech. Skupina, kterou se tato práce zabývá, jsou bakterie. Na světě existuje přibližně 5 500 druhů bakterií. Tyto mikroorganismy mají jednoduchou stavbu buňky, která je tvořena z genomu, který tvoří jedna cyklická molekula DNA, cytosolu, cytoplazmatické membrány a buněčné stěny, která to celé ohraničuje. Pohybují se pomocí bičíku [11] [12].

2.4.1 Nukleotid

Nukleoid je tvořen jednou molekulou DNA, která je volně umístěna do cytosolu. Tato molekula tvoří bakteriální chromozom. Skládá se z dvoušroubovice tvořené z komplementárních řetězců nukleotidů [12] [11].

2.4.2 Cytosol

Cytosol je část buňky, která obklopuje genom. V cytosolu se nachází plazmidy a ribozomy, ale na rozdíl od eukaryotických buněk neobsahuje žádné membránové organely. Je v něm obsaženo asi 50 % všech bílkovin buňky, které mají enzymatickou funkci a katalyzují např.÷ citrátový cyklus nebo glykolýzu [11] [12].

2.4.3 Plazmidy

Jedná se o krátké úseky DNA, které se vyskytují volně v cytosolu. Pokud buňka plazmid ztratí, ztráta je trvalá. Plazmidy mají také schopnost konjugace, což jim umožňuje přecházet do jiné bakteriální buňky. Mohou způsobovat patogenitu buňky, ale také může buňka díky nim získat geny, které jí umožní přežít, např. geny pro rezistenci k antibiotikům [11] [12].

2.4.4 Ribozomy

Skládají se ze dvou podjednotek. První podjednotka má velikost 50 S a druhá 30 S. Tyto podjednotky se mohou rozpojovat a spojovat. Hlavní funkcí ribozomu je překlad mRNA do

proteinů. Pro začátek tohoto překladu je nutná podjednotka 30 S a překlad je zahájen N-formylmethioninem. Ribozomy se vyskytují ve vyšší koncentraci u stěny buňky, kde se váží na cytoplazmatickou membránu [11] [12].

2.4.5 Cytoplazmatická membrána

Jedná se o část buňky, která buňku ohraničuje. Je tvořena dvojvrstvou fosfolipidů, na kterou jsou na obou stranách hydrofobními nebo elektrostatickými silami navázány bílkoviny. Její hlavní funkcí je chránit cytosol před okolím. Selektivně propouští molekuly do buňky a z buňky [11] [12].

2.4.6 Buněčná stěna

Buněčná stěna má za úkol buňku chránit. Je to jediná pevná část, kterou můžeme v bakteriální buňce najít. Je tvořena peptidoglykanem, což je polymer tvořený z aminocukrů. Gramnegativní bakterie mají stěnu tenčí, má složitější výstavbu a je tvořena dvouvrstvou lipidů a bílkovin. Naproti tomu grampozitivní bakterie mají stěnu tlustší a je tvořena vrstvou peptidoglykanu [11] [12].

2.4.7 Fimbrie

Jde o pevná vlákna, která z buňky vyčnívají a plní funkci adheze k povrchu. Fimbrie se obecně vyskytují pouze u bakterií gramnegativních [11] [12].

2.4.8 Bičik

Bakterie obsahuje jeden nebo více bičíků. Jeho hlavní funkcí je pohyb buňky. Skládá se z flagelinu. Zdroj energie pro pohyb bičíku je gradient na cytoplazmatické membráně [11] [12].

2.5 Mikrobiologické metody

2.5.1 Kultivace bakterií

K očkování bakterií na povrch tuhého média se využívá Petriho miska a živné médium. Bakterie lze naočkovat očkem na živnou půdu, ale vždy se musí očkovat tak, aby nedošlo k žádnému přenosu nežádoucích mikrobů. K očkování bakterií se obvykle využívají navlhčené vatové tyčinky, případně vyžíhaná kovová bakteriologická klička nebo sterilní plastová klička. Povrch kultivačního média se potře klikatým pohybem bakteriemi, které byly předtím nabrány vatovou tyčinkou. Při očkování se musí dbát zvýšené pozornosti, aby nedošlo k jakékoliv jiné kontaminaci kultivačního povrchu, a proto se víčko Petriho misky drží těsně nad povrchem média. Po ukončení očkovacího procesu se víčko musí okamžitě zavřít a ihned se Petriho miska umístí do podmínek požadovaných ke konkrétní kultivaci. Růst mikroorganismů trvá obvykle jeden až dva týdny. Poté, co kolonie narostou na Petriho misce, lze bakterie izolovat. Izolace probíhá opětovným nadzvednutím víčka Petriho misky a nabráním určitého druhu bakteriální

kolonie vysterilizovanou mikrobiologickou kličkou. Tyto naočkované bakterie se následně nechají opět růst v optimálních podmínkách několik dní, a to na pevném médiu nebo v tekuté živné půdě [9].

2.5.2 Kultivační media

Kultivační média se dělí do dvou základních skupin, a to na přirozené a syntetické. U syntetických médií známe přesné chemické složení. Jako syntetické medium se nejčastěji využívá definovaný roztok jednoduchého zdroje uhlíku, dusíku a minerálních solí a do tuhých půd se přidává agar, který je směsí polysacharidů, agarosy a agaropektinu – pozor, agar není médium, ale ztužovač!! , Naproti tomu u přirozených půd je základní médium živný bujón, u kterého není definované chemické složení. Nejběžnějším růstovým médiem pro mikroorganismy jsou tedy živné bujóny, nebo lysogenní bujónové medium. Kultivační média lze také rozdělit podle konzistence, kdy můžeme mít média tekutá a pevná. Pevné medium vzniká rozpuštěním agaru v živné půdě a následně jeho nalitím do Petriho misky, kde tuhne a poskytuje tak pevnou plotnu na růst bakterií. Pokud využíváme zkumavku, agar se nechá ztuhnout v šikmé poloze tak, aby byl větší povrch ke kultivaci. Velmi málo bakterií je schopno agar rozložit. Výhodou agarové půdy je také možnost pěstování jednotlivých bakteriálních kolonií. Tekuté medium tvoří například peptonová voda, případně jiné komplexní nebo minerální médium. Tekutá media se obvykle skladují s tlustostěnných zkumavkách a jejich výhodou je velmi snadný přísun živin pro pěstované bakterie. Růst bakterií se projeví obvykle zákalem zkumavky. Dále se využívají obohacené agarové půdy, které obsahují další živné složky [13] [9].

2.6 Antimikrobiální účinek

Látky s antimikrobiálními účinky mají schopnost inhibovat neboli potlačit růst mikroorganismů. Mechanismus jejich působení závisí na typu mikroorganismu. Patří mezi ně antibakteriální, antimykotické, antiseptické, antivirové, nebo antiparazitické látky. Antiseptické látky snadno dezinfikují povrchy snížením počtu bakterií na neporušené pokožce. Obecně se tyto látky využívají se především v kosmetologii, farmacii, nebo v potravinářství. Velké zastoupení v antimikrobiálních látkách mají rostlinné antimikrobiální látky. Rostliny produkují velké množství těchto látek, hlavně z důvodu obrany proti mikroorganismům či hmyzu. V současné době se poptávka po antimikrobiálních látkách, které produkují právě rostliny, hlavně z důvodu jejich velké antimikrobiální aktivity zvyšuje. Mezi tyto látky patří např. chinony a terpenoidy [14].

Antimikrobiální látky jsou látky, které mají bakteriostatický, baktericidní a fungicidní účinek. Mnoho antimikrobiálních látek je mikrobiálního původu a nazývají se antibiotika. Jde především o produkty plísní. Antibiotikum musí mít schopnost léčit bakteriální (mikrobiální) onemocnění, ale zároveň nesmí ničit eukaryotické buňky. Je tedy důležité dávat pozor na správné dávkování antibiotik. Proto se v současné době mnoho antibiotik připravuje synteticky [15]. Látky, které se vždy připravují synteticky jsou nazývána chemoterapeutika. Ty jsou vyrobeny právě tak, aby měly schopnost usmrtit mikroby, ale nepoškodit živou tkáň [16].

Účinek antibiotika na bakterie lze v laboratoři určit několika metodami. Jednou z metod je zjištění **minimální inhibiční koncentrace** (MIC). Jde o nejnižší koncentraci antimikrobiální látky, která inhibuje růst mikroorganismu. MIC je důležitá hlavně z hlediska pozorování rezistence mikroorganismů na antimikrobiální látky. Umožňuje také sledování aktivity nových látek. MIC se zjistit z agaru nebo bujónu tak, že daný kmen bakterie se naočkuje do jamek mikrotitrační destičky s agarem (bujónem) a zvyšuje se přidaná koncentrace antibiotika. Inkubuje se tak dlouho, dokud nenaroste kontrola, což bývá zpravidla přes noc. Dalším krokem je pozorování zákalu nebo sedimentace agregátů. Následně se z první jamky, kde je růst již potlačen a médium zůstalo čisté, odečítá MIC [17].

2.6.1 Bakteriostatický a baktericidní účinek

Látky s bakteriostatickým účinkem mají schopnost inhibovat růst bakterií, ale neusmrcují již exponované bakterie. Naopak látky s baktericidním účinkem mají schopnost tyto bakterie přímo usmrcovat. Většina těchto látek má schopnost poškozovat cytoplazmatickou membránu, inhibovat růst bakteriální stěny či inhibovat proteosyntézu a nukleové kyseliny [18] [19].

2.7 Analýza antimikrobiálního účinku

Na detekci antimikrobiálních látek slouží několik metod. Metody se využívají podle typu mikroorganismu, sloučenin vykazujících antimikrobiální aktivitu a způsobu jejich extrakce nebo rozpustnosti.

2.7.1 Disková difuzní metoda

Základním principem, na kterém tato metoda funguje, je difuze. Nejprve se agar naočkuje bakterií a poté se na něj postupně kladou malé disky napuštěné látkou, která by měla mít antimikrobiální vlastnosti. Z disků se látka pomalu uvolňuje a reaguje s bakterií. V případě, že je bakterie na látku citlivá, růst této bakterie je látkou inhibován. Inhibice se projeví vznikem tzv. inhibiční zóny v okolí disku. Průměr této zóny se následně měří a porovnává se se standardy [19] [20].

2.7.2 Agarová diluční metoda

Při přípravě agarů se zkoumaná látka přidá přímo do něj. Agar vytvoří povrch v Petriho misce a tento povrch se naočkuje bakteriemi. Naočkované bakterie se na agaru nechají inkubovat v daných podmínkách a poté se vyhodnotí, zda kolonie rostou, nebo ne. Při určování MIC poté pracujeme s tou miskou, která obsahuje nejnižší množství účinné látky a bakterie na ní už dále nerostou [20].

2.7.3 Bujónová diluční metoda

U této metody není médiem pro růst bakterií agar, ale bujón. Bujón je tekuté médium a je tak možné pracovat v malých množstvích. Metoda funguje tak, že se naředí účinná látka tekutým

mediem a směs se poté plní do jamek mikrotitrační destičky. Koncentrace účinné látky v první jamce, ve které již není pozorován růst, odpovídá MIC [21].

2.7.4 Metoda E-test

Jedná se o difuzní test. Na miskou se ale nedávají disky s antimikrobiální látkou, ale kalibrovaný proužek. Proužek obsahuje antimikrobiální látku o klesající koncentraci. Inhibiční zóna má v tomto případě tvar kapky, jejíž hrot směřuje ke koncentraci, která odpovídá MIC [22].

2.8 Analytické metody

Mezi analytické metody patří řada různých instrumentálních metod, z nichž v předložené práci byla především využita spektrofotometrie.

2.8.1 Spektrofotometrie

Spektrofotometrie je analytická metoda, která se využívá pro měření vlastností vzorku. Využívá pohlcování světla různých vlnových délek. Při spektrofotometrii je roztok v kyvetě ozařován monochromatickým světlem a tohle světelné záření absorbují molekuly. Využívají se standardní kyvety s optickou dráhou 1 cm. Detektor měří zářivý tok, který roztok neabsorbuje. Zářivý tok zdrojem vysílaného záření je poté porovnán se zářivým tokem dopadajícím na detektor, přičemž část energie světelného záření je rozpuštěnou látkou a roztokem absorbována. Množství záření absorbovaného tímto způsobem je pak úměrné koncentraci látky v roztoku (dle Lambert-Beerova zákona)

Lambert-Beerův zákon: $A = l \cdot \varepsilon \cdot c$

A ...absorbance

l ... optická délka kyvety

ε ... molární absorpční koeficient

c ... koncentrace absorbující látky, [23].

2.9 Druhy testovacích modelových mikroorganismů

Pro antimikrobiální testy byly použity mikroorganismy popsané v dalším textu.

2.9.1 Kvasinky

Candida glabrata

Tato kvasinka patří do haploidních, aerobních kvasinek způsobuje kandidózu, což je infekční onemocnění, které způsobují všechny kvasinky rodu *Candida*. Kandidóza patří do nejrozšířenějších mykóz. U lidí s oslabenou imunitou může tato nemoc být velmi ohrožující v porovnání s jedinci s dobrou imunitou [25].

2.9.2 Kožní bakterie

Staphylococcus epidermis

Druh grampozitivní, fakultativně anaerobní bakterie, který fyziologicky osídluje kůži a sliznice člověka. Nejčastěji se vyskytuje na obličeji a končetinách. Jak již bylo uvedeno, tato bakterie je součástí běžné mikroflóry. Ačkoliv obvykle není patogenní, u pacientů se sníženou imunitou způsobuje zvýšené riziko infekce. Je schopna po vyloučení polysacharidového intracelulárního adhesinu vytvářet biofilmy, což zvyšuje její schopnost klouzat po povrchu [26].

Cultibacterium acnes

Tato anaerobní bakterie způsobuje vznik akné nejčastěji na částech těla jako je obličej, záda a ramena. Více je tato bakterie rozebrána v kapitole 1.2.

Micrococcus luteus

Jde o kulatý, grampozitivní, aerobní variabilní kok rodu *Microoccus*. Obvykle se vyskytuje seskupený v tetrádách a paketách, stejně jako většina ostatních mikrokoků. Bakterie má pro člověka ochranný význam a snižuje riziko kožních karcinomů. Vyskytuje se jako přirozená součást kožní mikroflóry člověka, ale také v půdě, vodě, nebo vzduchu. Na těle člověka osídluje především místa s potními žlázami a metabolizuje výpotky. Bakterie také osídluje lidská ústa a sliznice horních cest dýchacích. *Micrococcus luteus* produkuje specifický pigment, který dokáže dobře absorbovat záření o vlnových délkách v rozmezí 350 až 475 nm. Při provedení Gramova barvení se bakterie objevuje modře až fialovomodře. Na agaru se pak tvoří žluté kolonie. Při kultivaci na organických látkách produkuje bakterie riboflavin a pyridin. Je podobný bakterii *Staphylococcus aureus* a pro jejich odlišení se využívá bacitracinový test [27].

Serratia marcescens

Serratia marcescens je druh tyčinkové gramnegativní, fakultativně anaerobní bakterie. Často se vyskytuje ve vlhkých prostorách, proto je často přítomná v koupelnách, a to zejména ve spárovacích hmotách mezi kachličkami, nebo sprchových koutech. Má růžové až oranžové zbarvení a tvoří slizký film, který se následně přiživuje různými zbytky mýdel a šampónů [28].

Escherichia coli

Escherichia coli je gramnegativní, anaerobní, tyčinkovitá bakterie, která netvoří spory. Dosahuje délky až 3 mikrometry. Některé typy této bakterie mohou tvořit slizovité obaly z polysacharidů. Využívá cukry a aminokyseliny jako zdroj uhlíku. Například využívá glukózu za anaerobních podmínek ke vzniku laktátu, sukcinátu, ethanolu a acetátu. Za aerobních podmínek je glukóza využita ke tvorbě oxidu uhličitého. Patří do přirozené střevní mikroflóry člověka, proto je její přítomnost v pitné vodě je ukazatelem znečištění vody. Pro člověka je jako součást přirozené mikroflóry prospěšná, protože produkuje látky, které zabraňují šíření patogenních bakterií. Podílí se také na tvorbě vitamínů [11].

2.10 Látky s antimikrobiálním účinkem

Látky s antimikrobiálním účinkem jsou látky, které inhibují růst mikroorganismů, nebo je úplně usmrčují.

2.10.1 Antibiotika

Tetracykliny

Jde o molekuly, které se skládají ze čtyř šestičlenných cyklů. Tetracykliny inhibují tvorbu proteinů tím, že zabraňují navázání komplexu tRNA na ribozom. Tetracykliny lze využívat k léčbě bakteriálních onemocnění proto, že na tuto vazbu nejsou eukaryotní buňky citlivé. Mají široké antimikrobiální spektrum. Působí jak na gramnegativní bakterie, tak i na grampozitivní bakterie. Bylo však zjištěno, že poškozují zubní sklovinu a růstové chrupavky [29].

Aminoglykosidy

Patří do baktericidních antibiotik. Fungují na principu inhibice syntézy proteinů a jsou účinné především na infekce způsobené gramnegativními bakteriemi [29].

Beta-laktamy

Jsou baktericidní a obsahují nestabilní beta-laktamový kruh. Dělí se na peniciliny a cefalosporiny. Principem jejich účinku je zabránění tvorby buněčné stěny bakterie. U penicilinů je na beta-laktamový kruh napojena pětiuhlíkatá sloučenina s atomem síry. Peniciliny mají velkou účinnost a zároveň jsou vůči eukaryotním buňkám velmi málo toxické. Cefalosporiny jsou podobné penicilinům, ale místo pěti uhlíkatého kruhu je na beta-laktamový kruh napojena šestičlenná sloučenina. Mezi beta-laktamová antibiotika patří mimo jiné také peniciliny, odvozené od plísňe *Penicillium*. Pro praktickou část byl z této skupiny použit ampicilin, a to z důvodu srovnání antimikrobiálního účinku [30].

Makrolidy

Jedná se o makrocyclické laktony, které jsou složeny z 16členného kruhu a propojeny s dalšími 2 cukry. Jejich funkce spočívá stejně jako u aminoglykosidů v tom, že inhibují funkci enzymů a syntézu proteinů. Významným makrolidem je *erythromycin*, který účinkuje na stejné bakterie jako penicilin. Účinkuje především na grampozitivní bakterie a gramnegativní koky [29].

2.10.2 Antimykotika

Antimykotika jsou chemoterapeutika, která působí proti kvasinkám a plísním.

Imidazolová antimykotika

Antimykotika obsahující cytochrom P-450 tak, že nedochází k tvorbě ergosterolu. Mezi zástupce se řadí ketokonazol, využívaný proti dermatofytům, kandidám a eumycetám a klotrimazol, využívaný pro lokální léčbu vaginálních kandidóz a dermatofytóz [16].

Triazoly

Zástupci této skupiny bývají účinnější, než imidazolová antimykotika. Zástupcem je například flukonazol [31].

Mezi ostatní skupiny antimykotik patří polyenová a systémová antimykotika.

2.11 Aktivní složky v dezinfekčních emulzích na ruce

2.11.1 Ethanol

Ethanol a ostatní alkoholy obecně prokazují velkou účinnost in vitro proti grampozitivním i gramnegativním bakteriím, patogenům jako jsou MRSA (methicilin-rezistentní/multi-rezistentní *Staphylococcus aureus*), houbám a plísním. Alkoholy byly také testovány proti virům jako např.: virus *herpes simplex* (HSV) a v koncentraci 80 % prokázal účinnost proti viru hepatitidy B (HBV) a (HVC).

Při aplikaci na pokožku má alkohol rychlý účinek, avšak nedoporučuje se samostatně pro hygienu rukou. Má vynikající baktericidní vlastnosti, přesto má ale poměrně malou antimikrobiální aktivitu a je často kombinován s jinými antimikrobiálními látkami, jako je chlorhexidin. Antimikrobiální aktivita alkoholu je důsledkem jeho schopnosti denaturovat bílkoviny. Baktericidní účinky mají roztoky ethanolu v rozmezí koncentrací 60-80 %. Vyšší koncentrace alkoholu nebo čisté formy alkoholů jsou méně účinné jako antimikrobiální látky, protože proteiny bez vody denaturují hůře. Alkoholy se často využívají jako antiseptice pokožky, nebo na chirurgické roztoky. V kombinaci s jinými antimikrobiálními složkami se využívají v bezvodých hygienických přípravcích na ruce, nebo v dezinfekcích [32] [33].

2.11.2 Chlorhexidin

Chlorhexidin je chemická sloučenina, která je silným antiseptikem a je schopná usmrcovat jak grampozitivní, tak gramnegativní bakterie. Jde o silnou bázi s kationtovými vlastnostmi. Vyskytuje se ve volné i stabilní formě a má nažloutlý vzhled.

Chlorhexidin diacetát (CHA), chlorhexidin dihydrochlorid, chlorhexidine diglukonát, chlorhexidine glukonát (CHG) a chlorhexidin fosfanilát 3 jsou bezbarvé roztoky chlorhexidinu, které jsou bez zápachu, ale mají extrémně hořkou chuť [34]. Působí tak, že narušuje buněčné membrány a jeho aktivita je závislá na pH, kdy funguje nejlépe při pH 5,5-7,0. Ve zdravotnictví nebo pro komerční použití je chlorhexidin jednou z nejvíce používaných forem chlorhexidinových solí díky rozpustnosti ve vodě. Často bývá součástí ústních vod, protože má schopnost ničit zubní plak a ústní bakterie. Využívá se také do různých čističů kůže a jako konzervantů. Antibakteriální účinnost vykazuje proti gramnegativním i grampozitivním bakteriím. Pokud je aplikován in vitro, dokáže chlorhexidin usmrtit až 100 % těchto bakterií za 30 sekund. Je schopen inaktivovat mikroorganismy v širším spektru než ostatní antimikrobiální látky. Chlorhexidin má jak baktericidní, tak i bakteriostatický účinek v závislosti na jeho koncentraci [35].

2.11.3 Jodofory

Jde o přípravky obsahující jód, které působí tak, že uvolňují volný jód do vnitřku organismu. Způsobují tak toxické oxidace a substituční reakce v buňkách. Jód je aktivní vůči gramnegativním i grampozitivním bakteriím, houbám i virům. Zafunguje téměř okamžitě, ale má poměrně špatnou stabilitu, protože je rychle neutralizován krví. Kůže může jód i jodofory absorbovat, ale je zde riziko mírného podráždění [36].

2.11.4 Trizenoly

Jedná se o složky, které kombinují alkohol a zinek. Kombinace těchto dvou látek poskytuje na rukou odolnost po dobu několika hodin po použití. Mohou být použity s vodou nebo bez vody. Do přípravků bývají přidávány změkčovadla pro zachování neporušené pokožky [37].

Tabulka 1 Shrnutí působení antimikrobiálních látek na mikroorganismy

antimikrobiální látka	mikroorganismus
Ethanol	G-, G+, patogeny, houby, plísně, HSV, HVC, HBV
Chlorhexidin	G-, G+, houby
Iodofory	G+, G-, viry, houby
Trizenoly	G+, G-

2.12 Aktivní antimikrobiální složky v emulzích na pleť

2.12.1 Benzoylperoxid

Benzoylperoxid je antimikrobiální látka, která je považována za nejvhodnější pro lokální léčbu akné. Látka má vysokou účinnost a schopnost pronikat do folikul, aby se dostala k bakteriím, které akné způsobují. Má poměrně dobrou bakteriální rezistenci. Koncentrace roztoků benzoylperoxidu v kosmetice činí 2,5 – 10 %. S rostoucí koncentrací vzrůstá dráždivost [38].

2.12.2 Kyselina azelaová

Tato dikarboxylová kyselina je sloučenina odvozená z obilovin jako jsou pšenice, žito nebo ječmen, ale do mycích emulzí se využívá forma vyvinutá v laboratoři. Na kůži funguje jako exfoliant a antioxidant. Působí proti akné, protože zklidňuje záněty. Je také inhibitorem tyrozinázy, což znamená, že může zabránit pigmentaci pokožky. Přípravky obsahující 15–20 % této kyseliny se prodávají na lékařský předpis. Nižší koncentrace jsou volně dostupné v kosmetických produktech [39] [40].

2.12.3 Kyselina salicylová

Kyselina, kterou je možné syntetizovat ze salicinu, je tedy kyselinou přírodního původu, protože salicin se nachází ve vrbové, nebo břízové kůře. V konečné podobě samotné kyseliny je bílou krystalickou látkou. Lze ji získat také synteticky, např.: se z ní vyrábí aspirin. Vykazuje léčivé účinky, je protizánětlivá, antimikrobiální a mírně antiseptická. Nejčastěji ji najdeme jako aktivní látku v produktech na léčbu akné, kde se používá v koncentracích do 2 %. Jde o BHA- vysvětlit zkratku kyselinu, která má schopnost pronikat hluboko do kůže a čistí tak ucpané póry. Stimuluje a zvyšuje také produkci kolagenu a tím pevnost pokožky [41] [42].

2.13 Emulze

Emulze jsou heterogenní směsi 2 kapalin, které jsou buď nemísitelné, nebo částečně mísitelné. Jsou tvořeny dispergovanou látkou a disperzním prostředím. Disperzní prostředí je spojitě a obklopuje dispergovanou látku, která je ve formě malých kapiček. Tvorba emulzí se nazývá emulgace a aby emulze bylo možné vytvořit, musí být jedna kapalina rozptýlena do druhé. např. určitým dispergátorem. Nejčastějšími emulzemi jsou emulze typu voda v oleji (v/o) a olej ve vodě (o/v). O typu emulze rozhoduje, která část tvoří disperzní prostředí a která je ve formě kapiček prostředím obklopená. Aby se emulze vzápětí opět nerozpadla na jednotlivé kapaliny, musí být stabilizována emulgátorem. Emulgátor podporuje vznik emulzí, podle toho, o jaký typ emulgátoru se jedná. Může být emulgátor hydrofilní, který bude podporovat vznik emulze o/v, nebo naopak hydrofobní, který bude podporovat vznik emulze v/o. Disperzní prostředí je vždy tvořeno tou fází, ke které má emulgátor větší afinitu. Emulze se mohou chovat různě v závislosti na jejich koncentraci. Jestliže obsahují méně, než 0,1 % obj. dispergované látky, chovají se spíše jako kapaliny. Při dosažení koncentrace 0,1–74 % obj. se částice začínají vzájemně ovlivňovat. Při 74 % obj. jsou emulze koncentrované a kapičky se začínají deformovat. Emulze na ruce se testují speciálně dle norem EU [43].

2.14 Normy pro desinfekci rukou

V oblasti hygieny rukou existují evropské normy. Tyto normy se vztahují na zacházení s chemikáliemi a na účinnost antimikrobiální aktivity dezinfekčních přípravků na ruce. Například existuje norma pro práci s ochrannými rukavicemi při manipulaci (EN 420). Evropské normy, které regulují testy na účinnost dezinfekčních prostředků a antiseptik, mají několik fází. V první fázi musí být prokázáno, že produkt má baktericidní (EN 12054) vlastnosti. Tyto normy představují standardizaci metody pro vyhodnocování mikrobicidní aktivity chemikálie při vývoji nových dezinfekčních prostředků [44].

Ve druhé fázi se testy zabývají oblastí použití dané, v našem případě, dezinfekce. Normy byly zavedeny pro 4 oblasti aplikace, jinak řečeno pro 4 druhy dezinfekcí. Tyto druhy jsou a) **hygienické mytí rukou**, b) **hygienické „drhnutí“ rukou (například houbou)**, c) **chirurgické mytí rukou** a d) **chirurgické „drhnutí“ rukou**. Hygienickým mytí rukou je tu myšleno mytí rukou po setkání s kontaminátorem. Chirurgické mytí rukou znamená naopak použití dezinfekce/umytí rukou před setkáním s kontaminátorem, např.: chirurgové, než jdou operovat. Tyto 4 druhy dezinfekcí jsou testovány, zda splňují jednotlivé normy. Výrobce dané dezinfekce se touto normou musí řídit a výrobek otestovat podle postupu dané normy a na

mikroorganismech, které norma udává. Výrobek musí také splňovat dobu, za kterou musí dojít k usmrcení všech bakterií – rovněž dáno normou. Následující tabulka uvádí evropské normy pro jednotlivé druhy dezinfekcí na ruce. Výrobce může na obal dezinfekce napsat tzn. „activity claims“ jen v případě, pokud byly pro daný přípravek splněny veškeré testy antimikrobiální aktivity. Je možné, že výrobek bude mít těchto „activity claims“ více, a to v případě, že splní testy pro všechny požadované normy. Normy, které jsou v tabulce uvedené tučně znamenají, že je daný druh dezinfekčního přípravku musí povinně splňovat. Pomlčky v tabulce znamenají, že v současné době pro tento druh není vyvinut test, např.: na ničení původců tuberkulózy se v současné době netestuje [44].

Tabulka 2 Evropské normy

Typ dezinfekce	Activity claims (tvrzení na obale)					
	baktericidní	fungicidní		mykobakteriální	tuberkulocidní	virucidní
		plísně	kvasinky			
Hygienic hand wash	EN 12054 EN 1499	-	WI 21639	-	-	EN 14476
Hygienic hand rub	EN 12054 EN 1500	-	WI 216039	WI 216038	-	EN 14476
Surgical hand rub	EN 12054	-	WI 216039	-	-	
Surgical hand wash	EN 12791	-	-	-	-	-

2.14.1 Baktericidní norma EN 12054

Tato norma je zavedena pro baktericidní vlastnosti dezinfekčních přípravků na ruce. Testy byly provedeny například na bakteriích *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli K12* a *Enterococcus hirae* při 20°C.

Tabulka 3 Test baktericidních vlastností dezinfekce podle normy EN12054

Testované mikroorganismy	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Escherichia coli K12</i> <i>Enterococcus hirae</i>	
Teplota při testu	20 °C	
Doba kontaktu dezinfekce a mikrobu	Hygienic hand wash	1 minuta a méně
	Surgical hand wash	5 minut a méně
Požadavek na počet usmrcených bakterií	wash	10 ³
	rub	10 ⁵

Test na prokázání baktericidní aktivity je povinný pro desinfekční přípravky na ruce ve všech oblastech použití [44].

2.14.2 Virucidní norma EN 14476

Tato norma byla zavedena pro metody zkoušení a analýzu požadavků na virucidní účinek desinfekčních a antiseptických produktů. Je platná pro produkty využívané ve zdravotnictví a hygienické mytí rukou [45]. Testování virucidních vlastností dezinfekce je znázorněno v tabulce 4 [44].

Tabulka 4 Test virucidních vlastností dezinfekce podle normy EN 14476

Testované mikroorganismy	<i>Poliovirus 1</i> <i>Adenovirus 5</i>	
Teplota při testu	20 °C	
Doba kontaktu dezinfekce a mikrobů	Hygienic hand wash	1 minuta a méně
	Hygienic hand rub	1 minuta a méně
Požadavek na počet usmrcených bakterií	wash	10 ⁴
	rub	10 ⁴

3 CÍL PRÁCE

Cílem práce je ověření antimikrobiálního účinku desinfekčních emulzí, čistících gelů a mýdel.

V rámci práce byly řešeny následující dílčí cíle:

- 1) Přehled složení a aktivních látek kosmetických emulzí s čistícím a desinfekčním účinkem
- 2) Optimalizace metod stanovení aktivních složek a antimikrobiální aktivity
- 3) Analýza vybraných typů emulzí
- 4) Vyhodnocení a diskuse výsledků

4 PRAKTICKÁ ČÁST

Cílem praktické části bylo zjistit antimikrobiální účinek běžně dostupných dezinfekcí, čistících gelů a mýdel vůči mikroorganismům, které se vyskytují na lidské kůži. Každá dezinfekce, která byla podrobena testu, obsahuje buď různé účinné látky, nebo stejné, ale v jiné koncentraci. Většina dezinfekcí, jak již bylo zmíněno dříve, funguje na principu degradace mechanismu tvorby bílkovin a mikroorganismy tak usmrtí, či inhibuje jejich růst.

Jednotlivé mikroorganismy byly napěstovány v tekutých médiích a kultivovány při 37 °C. Následně byly požadované kultury zaočkovány a kultivovány po dobu 24 hodin. Spolu s tekutými médii pro jednotlivé druhy a vzorky dezinfekcí, byly otestovány nejprve bujónovou diluční metodou a následně byla jako kontrola provedena agarová diluční metoda. Celý proces byl vždy proveden v prostředí sterilního boxu, se sterilním laboratorním sklem a byla dodržována opatření k zabránění kontaminace.

4.1 Použité mikroorganismy

- *Micrococcus luteus* (CCM 1569)
- *Serratia marcescens* (CCM 8587)
- *Escherichia coli* (CCM 3954)
- *Cultibacterium acnes* (CCM 3344)
- *Staphylococcus epidermidis* (CCM 2124)
- *Candida glabrata* (CCM 8270)

4.2 Použité chemikálie

- Nutrient Broth (NB), (Himedia, India)
- Lysogeny Broth (LB), (Sigma-Aldrich, SRN)
- Brain Heart Infusion (BHI), (Himedia, India)
- Glukosa monohydrate (Penta, ČR)
- Yeast Extract (Himedia, India)
- Agar Powder (Himedia, India)
- Ampicilin (Sigma-Aldrich, SRN)
- Clotrimazol (Sigma-Aldrich, SRN)

4.3 Použité přístroje

- Densitometr DEN-1 DEN-1B (McFarland), Frant bio
- Spektrofotometr, Biontech Implen (SRN)
- ELISA reader– Elx808, BioTek Instruments, Inc. (Velká Británie)
- Analytické váhy, Boeco (SRN)
- Temperovaná třepačka
- Vortex

4.4 Kultivace mikroorganismů

Pro každý mikroorganismus byla připravena tekutá kultivační média, jejichž složení je uvedeno v následující tabulce.

Tabulka 5 Kultivační média pro jednotlivé mikroorganismy

Mikroorganismus	Kultivační médium
<i>Micrococcus luteus</i>	NB (Nutrient Broth)
<i>Serratia Marcescens</i>	NB (Nutrient broth)
<i>Escherichia coli</i>	LB (Lysogeny Broth)
<i>Cultibacterium acnes</i>	BHI (Brain Heart Infusion)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	BHI (Brain Heart Infusion)
<i>Candida glabrata</i>	YPD (pepton, glukosa, yeast extract)

Den před každým měřením antimikrobiální aktivity byly z narostlých kultur zaočkovány do sterilních médií nové kultury, které se následně nechaly 24 hodin kultivovat. Po této době byla vždy kultura dostatečně narostlá a připravena k použití. Těsně před pipetováním mikrotitračních destiček byl změřen zákal kultury McFarlandovým přístrojem. Měření tímto přístrojem pomáhá zajistit, že počet bakterií bude v určeném rozmezí. Nejběžněji používaná koncentrace pro test antimikrobiální citlivosti je 0,5 McFarlandova standardu, což odpovídá přibližně $1 \cdot 10^8$ KTJ/ml [46].

4.5 Příprava vzorků dezinfekcí

Jednotlivé vzorky dezinfekcí byly naředěny do sterilních zkumavek v poměru 1:1 se sterilní destilovanou vodou pomocí a následně byly promíchány na Vortex mixeru. Před každým měřením byly na nově naočkované kultury namíchány čerstvé vzorky.

Tabulka 6 Testované dezinfekce/čistící emulze a jejich aktivní složky

Číslo vzorku	Vzorek dezinfekce / čistící emulze	Aktivní složka	Kontrola
1	„Manufaktura“ antibakteriální gel s vřídelní solí	70% ethanol	70% ethanol
2	„Balea“ dezinfekce na ruce	45% ethanol	45% ethanol
3	„The Inkey list“ čistící gel	2% kyselina salicylová	destilovaná voda
4	Antibakteriální gel „Vitellaria“	96% ethanol	96% ethanol
5	„Dermacol“ antibakteriální mýdlo na ruce	Cocamidopropyl Betain, Sodium Laureth Sulfate	Cocamidopropyl Betain, Sodium Laureth Sulfate

6	„Vichy“ čistící gel na ruce	65% ethanol	65% ethanol
---	-----------------------------	-------------	-------------

Tabulka 7 Testovaná mýdla a jejich aktivní složky

Číslo vzorku	Vzorek mýdla	Aktivní složka	Kontrola
1	Tekuté mýdlo z toalet	Sodium Laureth Sulfate	Sodium Laureth Sulfate
2	„Schulke“ tekuté mýdlo	Sodium Laureth Sulfate	Sodium Laureth Sulfate
3	„Dove“ tuhé mýdlo	Cocamidopropyl Betain	Cocamidopropyl Betain
4	„Jelen“ univerzální mýdlo	Sodium Laureth Sulfate	Sodium Laureth Sulfate
5	„Green Pharmacy“ tuhé mýdlo	Sodium Laureth Sulfate	Sodium Laureth Sulfate
6	„Protex“ antibakteriální tuhé mýdlo	Sodium Laureth Sulfate, Cocamidopropyl Betain	Sodium Laureth Sulfate, Cocamidopropyl Betain



Obr. 1 vzorek Manufaktura.



Obr. 2 vzorek Balea



Obr. 3 vzorek The Inkey



Obr. 4 vzorek Dermacol



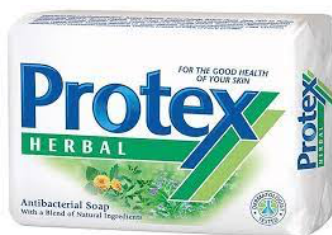
Obr. 5 vzorek Vitellaria



Obr. 6 vzorek Vichy



Obr. 7 Dove



Obr. 8 Protex



Obr. 9 Green Pharmacy



Obr. 10 Schulke



Obr. 11 Jelen

4.6 Antimikrobiální testy – bujónová diluční metoda

Pro samotné antimikrobiální testy byly použity 96jamkové mikrotitrační destičky, a to jedna destička pro dva vzorky dezinfekcí. Nejprve bylo do jamek destičky napipetováno médium, následně vzorky dezinfekcí či mýdel. Pro porovnání antimikrobiální aktivity bylo také použito antibiotikum (popřípadě antimykotikum).

Nakonec byla do jamek napipetována vhodně naředěná 24hodinová kultura mikroorganismů. Ihned po dokončení destičky byla změřena absorbance pomocí přístroje ELISA reader při vlnové délce 630 nm. Destička se následně nechala 24 hodin temperovat a potom byla následně změřena podruhé.

4.7 Viabilita mikroorganismů

Změřené mikrotitrační destičky byly po změření absorbance po 24 hodinách podrobeny testování modifikací barvení resazurinem. Do každé jamky bylo přidáno 20 μ l resazurinu. Resazurin je barvivo, které se používá na detekci viability kultury. Viabilita buněk neboli jejich životaschopnost je schopnost buňky přežít po určitou dobu a zároveň vykazovat enzymovou aktivitu. Viabilitu buňky ovlivňují faktory jako kultivační médium, kontaminace či teplota. Buňka prostřednictvím mitochondriálních dehydrogenáz přemění redukcí tmavě modrý resazurin na resorufin, který má světle růžovou barvu. Množství resorufinu je přímo úměrné počtu živých buněk.

4.8 Antimikrobiální testy – test baktericidního účinku

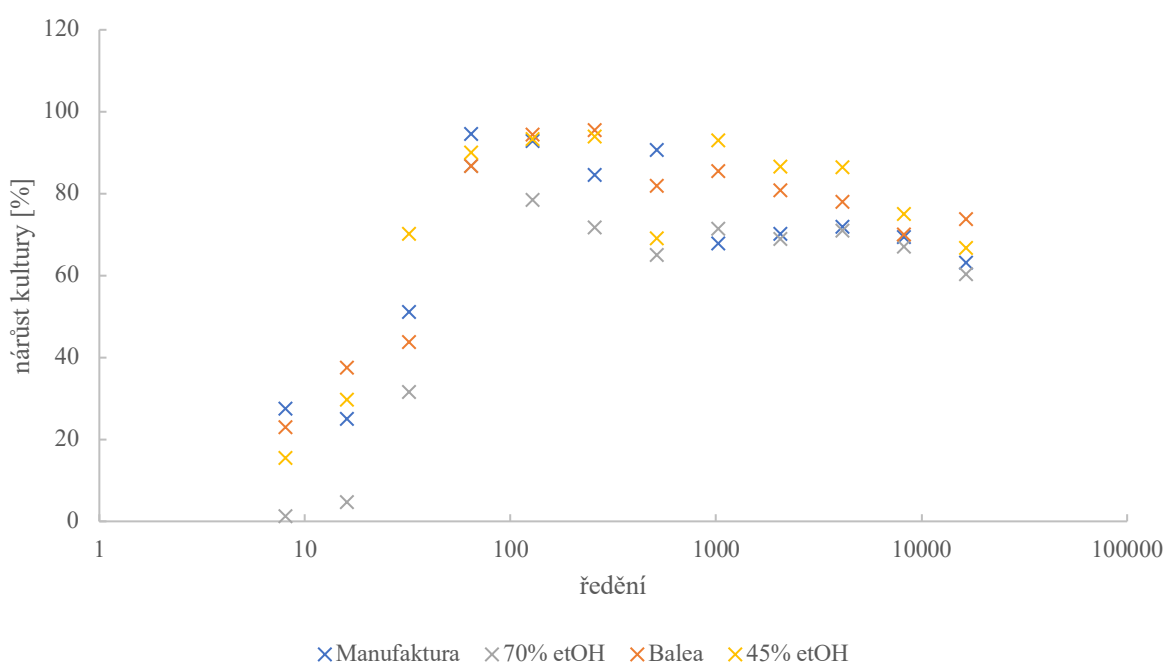
Jako kontrolní metoda byla použita agarová metoda. Příslušné médium každého mikroorganismu bylo smícháno s agarem (do koncentrace 2 %) a vzniklé médium bylo nalito na Petriho misky, kde ztuhlo. Po změření destiček po 24 hodinách byl obsah jamek přenesen vysterilovanými párátky na agarové plotny.

5 VÝSLEDKY

5.1 Vyhodnocení bujónové diluční metody

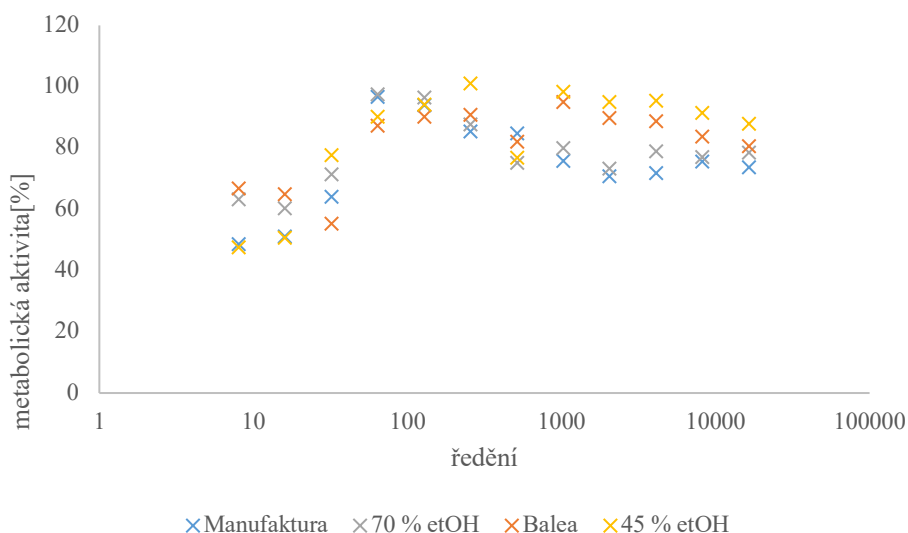
Výsledky bujónové diluční metody jsou uvedeny na následujících grafech. Grafy zobrazují, jaký byl procentuální nárůst mikrobiální kultury při použití vzorků testovaných dezinfekcí a při jejich postupném ředění. Modrá a červená datová řada zobrazují antimikrobiální účinky vzorků testovaných antimikrobiálních látek. Šedá a žlutá zobrazují jejich kontroly. Po jednotlivými grafy je vždy vyobrazen graf po přidání barviva resazurinu, který zobrazuje viabilitu kultury v závislosti na zředění vzorku.

5.1.1 Výsledky testů antimikrobiálních prostředků na bakterii *Micrococcus luteus*



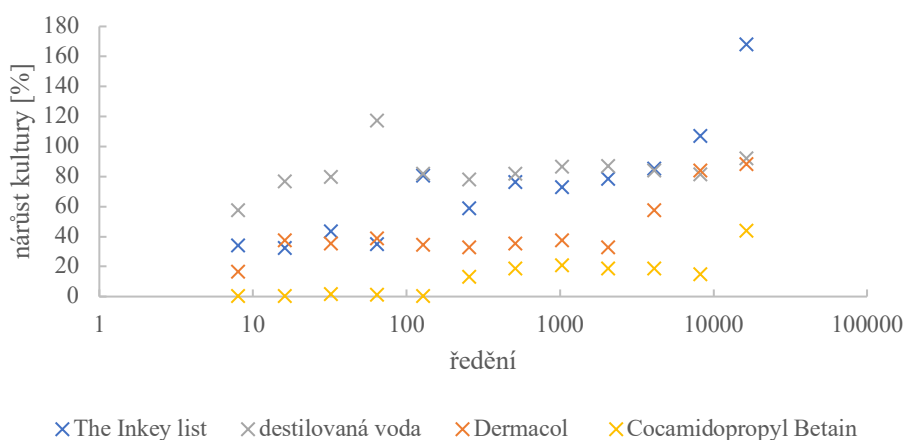
Obr. 12 Vliv dezinfekčního prostředku na růst mikroorganismů (Manufaktura, Balea + kontroly)

Z výsledků naměřených pro vzorek dezinfekce Manufaktura a Balea a jejich kontroly a zobrazených na Obr. 12 je patrné, že nejefektivnějším antibakteriálním vzorkem je kontrolní roztok Manufaktury (70% ethanol), kterým byla při nejnižším ředění kultura usmrcena téměř ze sta procent. Oba testované vzorky se chovaly obdobně jako jejich kontroly. S postupným ředěním antibakteriálních látek se procentuální nárůst kultury zvyšoval, až nabyl téměř konstantních hodnot. Z grafu vyplývá, že zlomový bod nastal při naředění vzorku zhruba 100krát. Minimální inhibiční koncentrace pro tyto vzorky je při zředění vzorku 32krát, což u první kontroly odpovídá 2,18% ethanolu a u druhé 1,40% ethanolu.



Obr. 13 Resazurinový test (Manufaktura, Balea + kontroly)

Na grafu 13 je vidět, že při nejnižším ředění je viabilita kultury u všech vzorků zhruba 50 %. S postupným ředěním se životaschopnost buněk zvyšuje až ke 100 %.

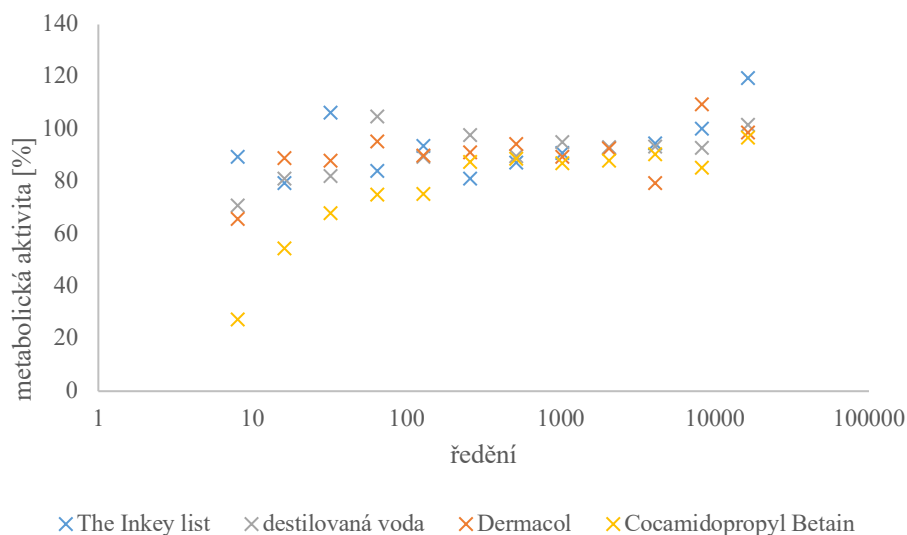


Obr. 14 Vliv dezinfekčního prostředku na růst mikroorganismů (The Inkey list, Dermacol + kontroly)

Vyhodnocená data u vzorků značky The Inkey list a Dermacol zobrazená na Obr. 14 ukazují, že nejvyšší antimikrobiální aktivitu vykazuje vzorek od Dermacolu a odpovídající kontrolní roztok Cocamidopropyl Betainu. Právě u Cocamidopropyl Betainu nebyl z počátku zaznamenán v podstatě žádný nárůst kultury. Až při naředění kontroly 256krát, byl zaznamenán nárůst do 20 %. Antibakteriální mýdlo Dermacol má mírně horší výsledky než jeho kontrola. Při ředění 10 až 8000krát byl nárůst bakterie s malými odchylkami asi 35 %. Od této hranice ředění začala bakteriální kolonie narůstat do vyšších procentuálních hodnot.

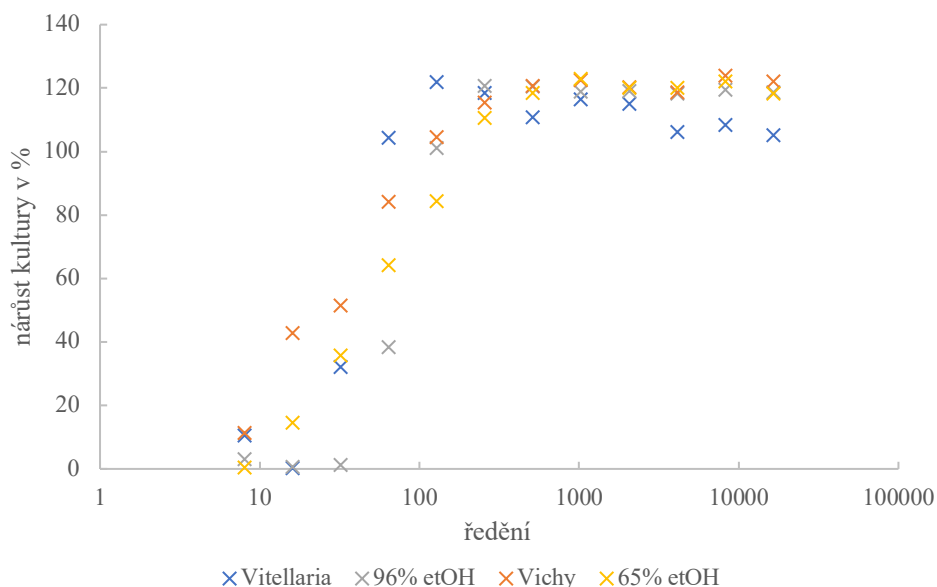
Vzorek čistícího gelu značky The Inkey list s obsahem kyseliny salicylové vykázal vůči bakterii *Micrococcus luteus* nízkou antimikrobiální aktivitu. Už od začátku je procentuální nárůst asi

40 % a při dalším ředění se postupně zvyšuje. Z důvodu nedostupnosti 2% kyseliny salicylové byla jako kontrola tohoto vzorku použita destilovaná voda, která žádnou antimikrobiální aktivitu nevykazuje.



Obr. 15 Resazurinový test (The Inkey list, Dermacol + kontroly)

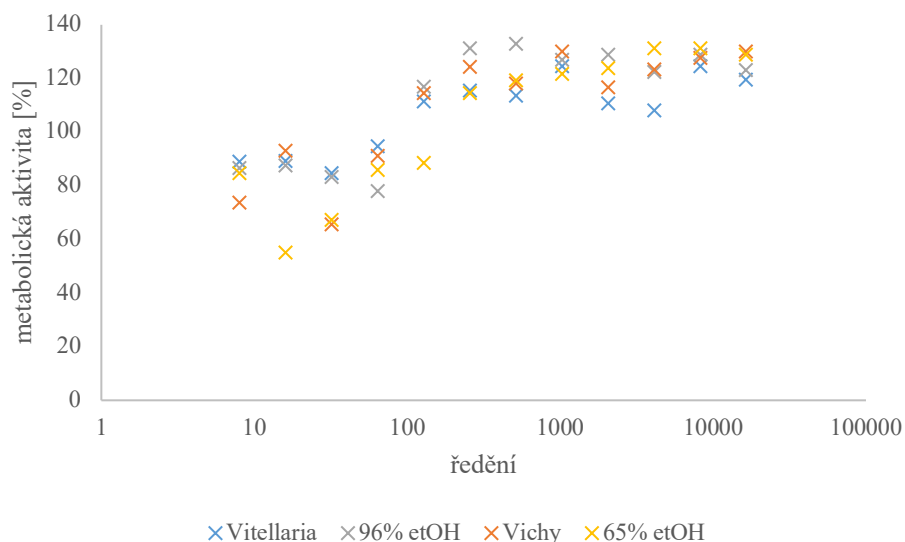
U vzorku čistícího gelu s kyselinou salicylovou vykazuje kultura vysokou viabilitu při ředění 32krát. Nejvyšší nárůst byl zaznamenán při nejvyšším ředění.



Obr. 16 Vliv dezinfekčního prostředku na růst mikroorganismů (Vitellaria, Vichy + kontroly)

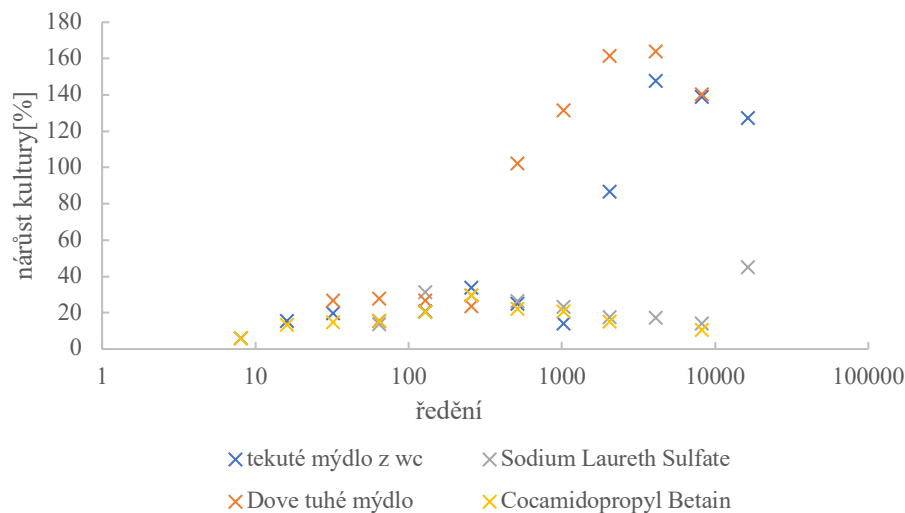
U vzorku s nejvyšším obsahem ethanolu použitým v rámci práce (Vitellaria) nebyl zpočátku zaznamenán nárůst bakterie. Až při ředění 32krát začíná bakterie postupně narůstat. Následně

se nárůst skokově zvyšoval o desítky procent až do ustálení. Křivka hodnot jeho kontroly (96% ethanolu) s malými odchylkami křivku vzorku kopíruje. Vzorek Vichy dezinfekce a jeho kontroly (65% ethanol) se chovají velmi podobně.



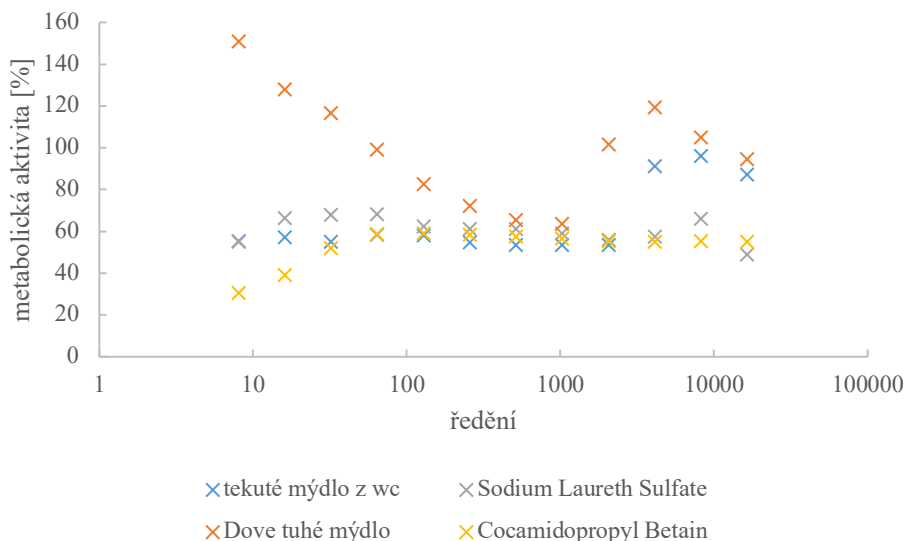
Obr. 17 Resazurinový test (*Vitellaria*, Vichy + kontroly)

Z grafu je patrné, že viabilita kultury obou vzorků je při ředění vyšším, než 128krát 100 %.



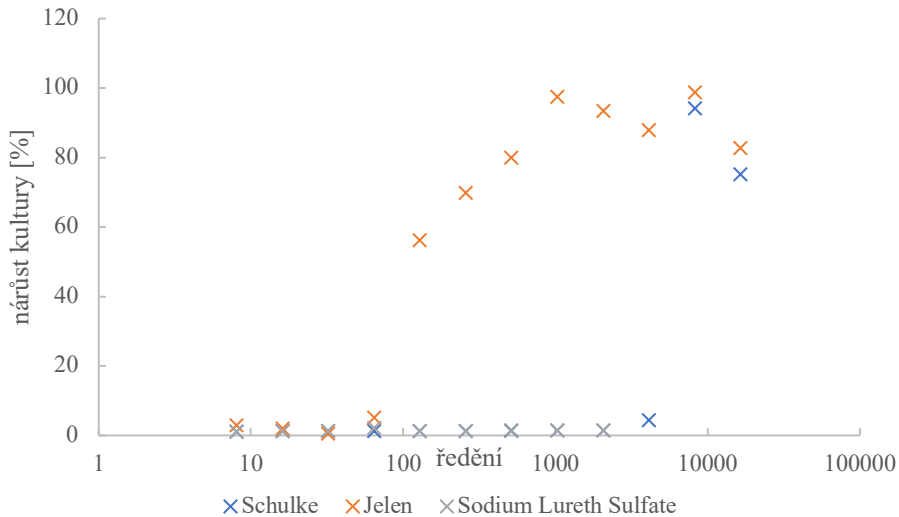
Obr. 18 Vliv dezinfekčního prostředku na růst mikroorganismů (mýdlo z toalet, Dove + kontroly)

U vzorků obou mýdel byla prokázána antimikrobiální účinnost i při zvýšeném ředění vzorku. Při naředění zhruba 100krát byl zaznamenán nárůst kultury na 35–40 %. Následně se nárůst kultury zvyšuje. Minimální inhibiční koncentrace pro tekuté mýdlo je při zředění dezinfekce 1024krát. Pro tuhé mýdlo je tato koncentrace při zředění 256krát.



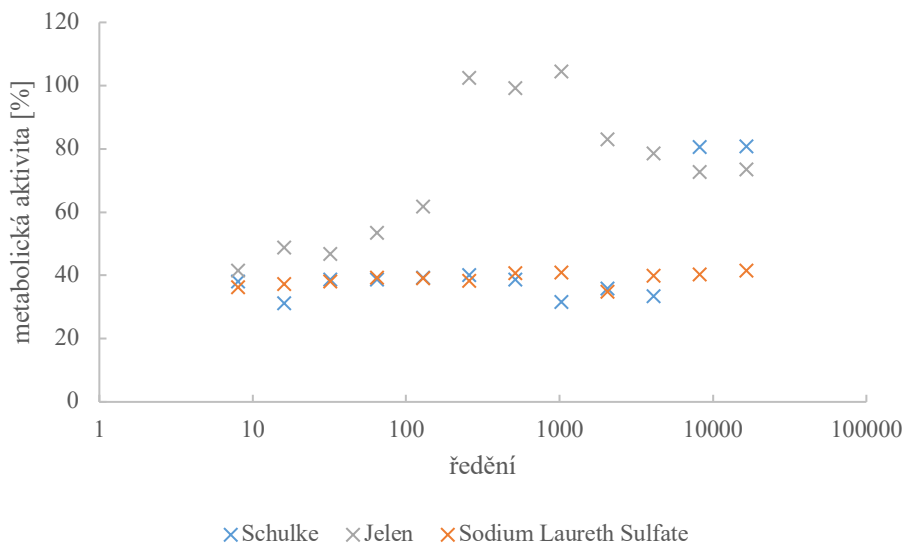
Obr. 19 Resazurinový test (mýdlo z toalet, Dove + kontroly)

U vzorku tekutého mýdla se viabilita kultury drží na konstantních hodnotách. Zvláštní trend vykazuje tuhé mýdlo Dove, u kterého životaschopnost buněk s narůstajícím ředěním nejprve klesá a poté opět roste. Výsledky jsou zobrazeny na grafu 19.



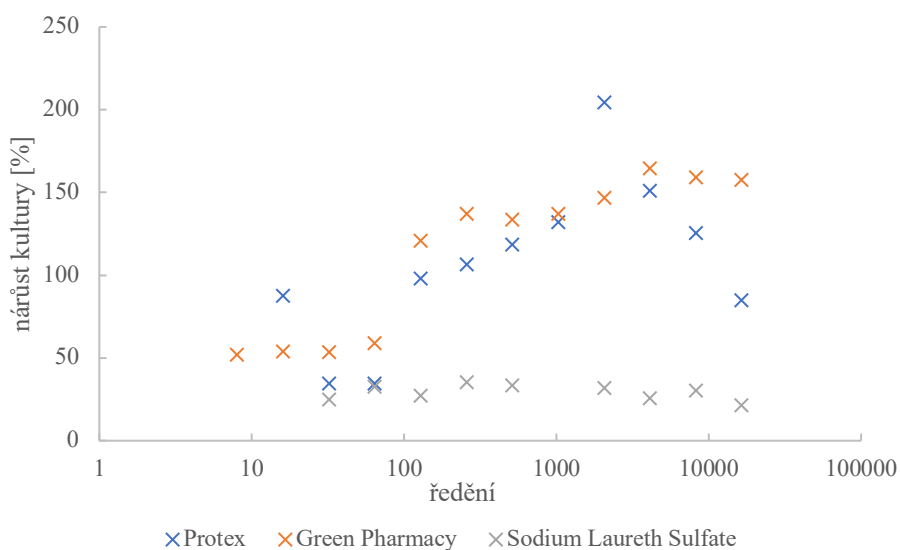
Obr. 20 Vliv dezinfekčního prostředku na růst mikroorganismů (Schulke, Jelen + kontroly)

Tekuté mýdlo Schulke potlačuje růst bakterie i při vysokém zředění. Minimální inhibiční koncentrace mýdla je při zředění 4096krát. Univerzální mýdlo Jelen má minimální inhibiční koncentraci při zředění 64krát. Následně kultura skokově roste a nárůst se stále zvyšuje. Kontrolní roztok obou vzorků vykazuje vysokou antimikrobiální účinnost i při vysokém zředění.



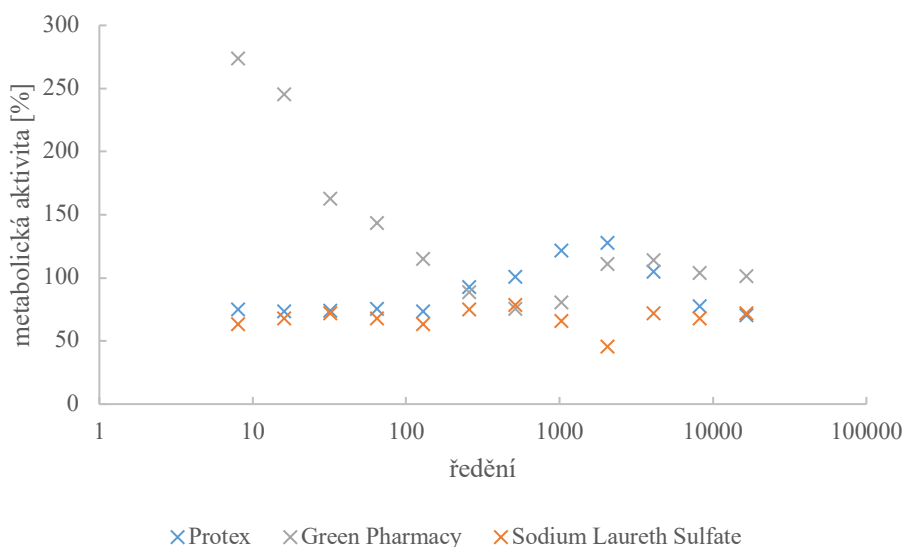
Obr. 21 Resazurinový test (Schulke, Jelen + kontroly)

Při testování univerzálního mýdla Jelen vykazuje kultura nejvyšší viabilitu při ředění 256-1024krát.



Obr. 22 Vliv dezinfekčního prostředku na růst mikroorganismů (Protex, Green pharmacy, + kontrola SLS)

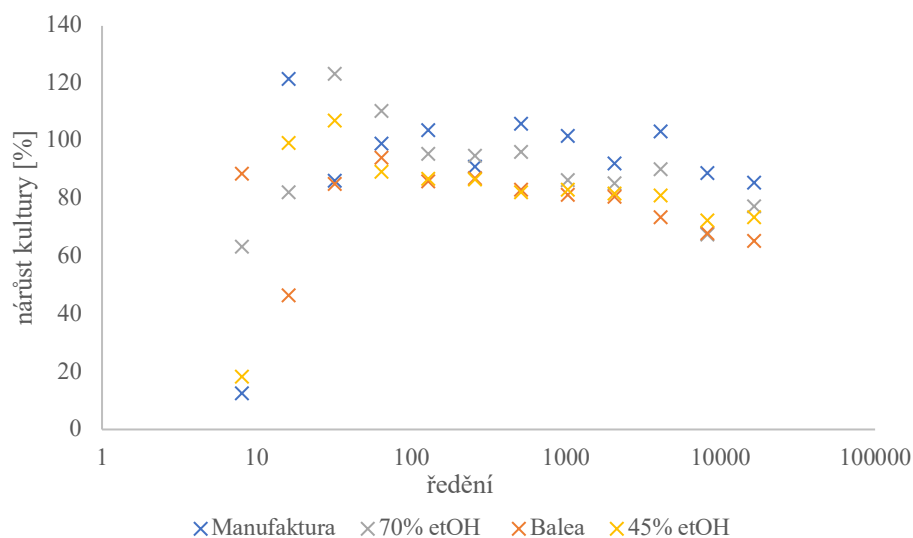
Antibakteriální mýdlo Protex nepůsobí na bakterii *Micrococcus luteus* dostatečně účinně. Už při nízkém zředění byl zaznamenán nárůst bakterie na více než 50 %. Druhý vzorek tuhého mýdla také neprokázal potřebnou antibakteriální schopnost.



Obr. 23 Resazurinový test (Protex, Green pharmacy, SLS)

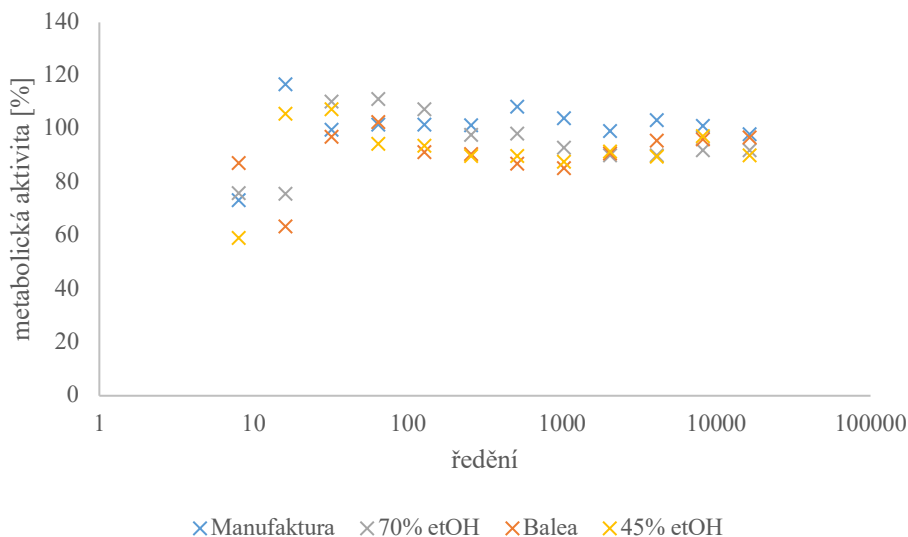
Viabilita kultury při použití tuhého mýdla Green Pharmacy je vysoká a výrazně překračuje 100 %. U antibakteriálního mýdla Protex se viabilita pohybuje mezi 60 a 100%.

5.1.2 Výsledky testů antimikrobiálních prostředků na bakterii *Serratia marcescens*



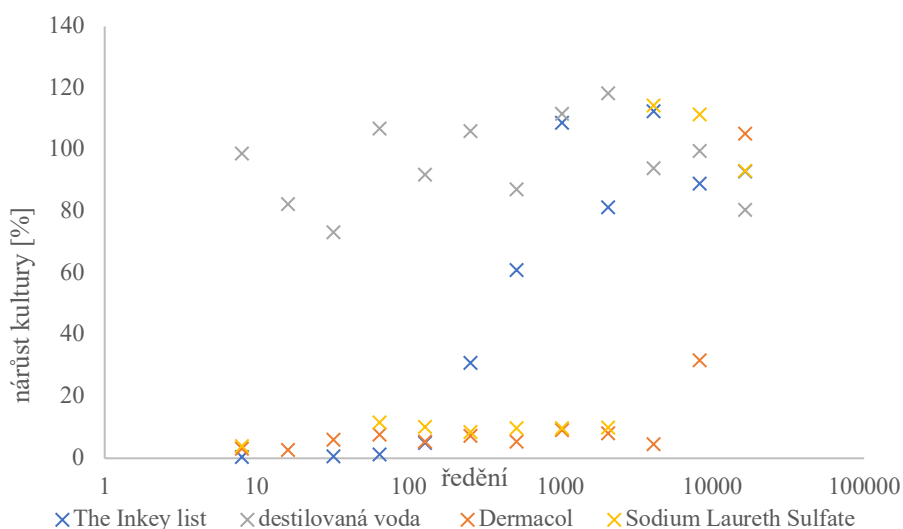
Obr. 24 Vliv dezinfekčního prostředku a odpovídající kontroly na růst mikroorganismů (Manufaktura, Balea)

Vzorek dezinfekce od značky Manufaktura vykazuje antimikrobiální aktivitu pouze do ředění 12krát a méně. Následně je zaznamenán prudký nárůst kultury, a to až ke 100 %. Kontrola k tomuto vzorku také nevykazuje vůči této bakterii příliš velkou antimikrobiální aktivitu, nárůst kultury se rychle zvyšuje a následně se ustaluje. Vzorek Balea s obsahem 45% ethanolu se chová obdobně jako jeho kontrola a kultura vůči nim vykazuje vysokou odolnost - viz Obr. 24



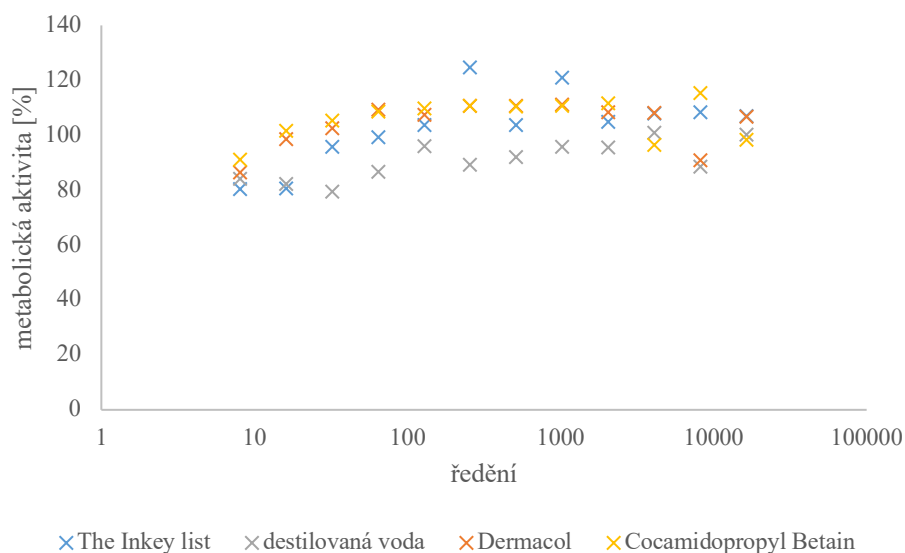
Obr. 25 Resazurinový test (Manufaktura, Balea)

Viabilita kultury se pohybuje při nízkém zředění okolo 60-80 % Při vyšším ředění, než 16krát se hodnota viability posouvá ke 100 %.



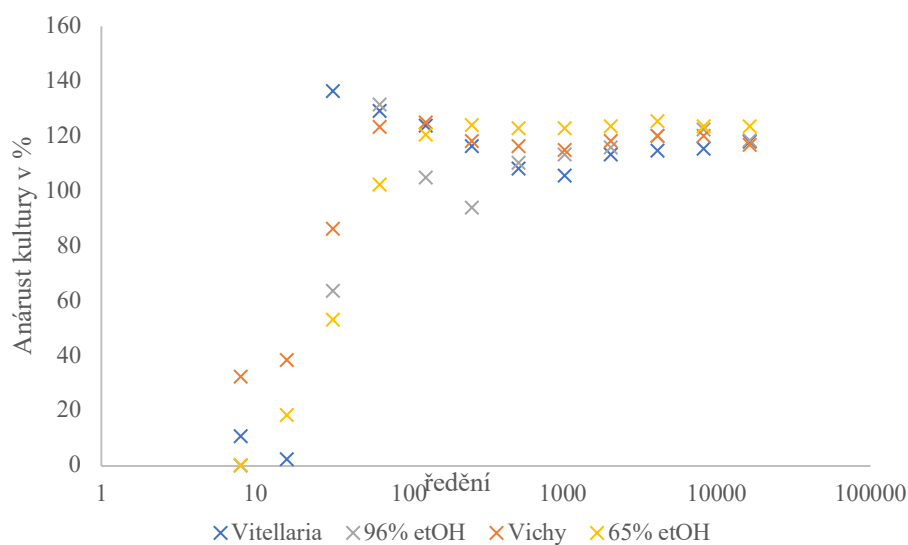
Obr. 26 Vliv dezinfekčního prostředku a odpovídající kontroly na růst mikroorganismů (The Inkey list, Dermacol)

Poměrně přijatelný antimikrobiální účinek proti *Serratia marcescens* ukázal čistící gel s obsahem kyseliny salicylové (The Inkey list), kdy začíná kultura mírně narůstat až při 128krát naředěné dezinfekci. Následně se s rostoucím ředěním nárůst kultury postupně zvyšuje. Nejlepších výsledků proti této bakterii dosahuje antibakteriální mýdlo Dermacol, které účinně potlačuje růst kultury i při velmi vysokém naředění. Procentuální nárůst kultury se zvyšuje až při překročení hranice naředění 8192krát. Křivka kontrolního roztoku Sodium Laureth Sulfátu jeho křivku kopíruje.



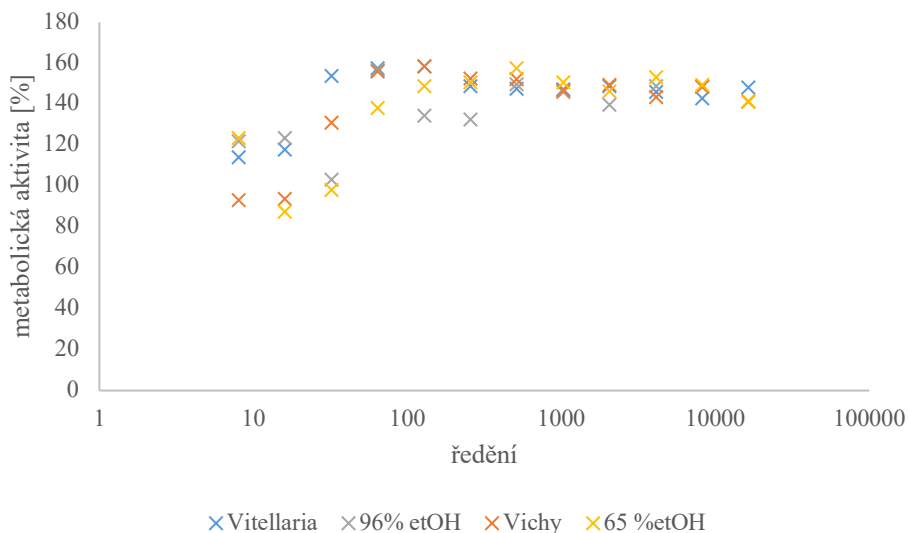
Obr. 27 Resazurinový test (The Inkey list, Dermacol)

Viabilita je u obou dezinfekcí přes 80 %.



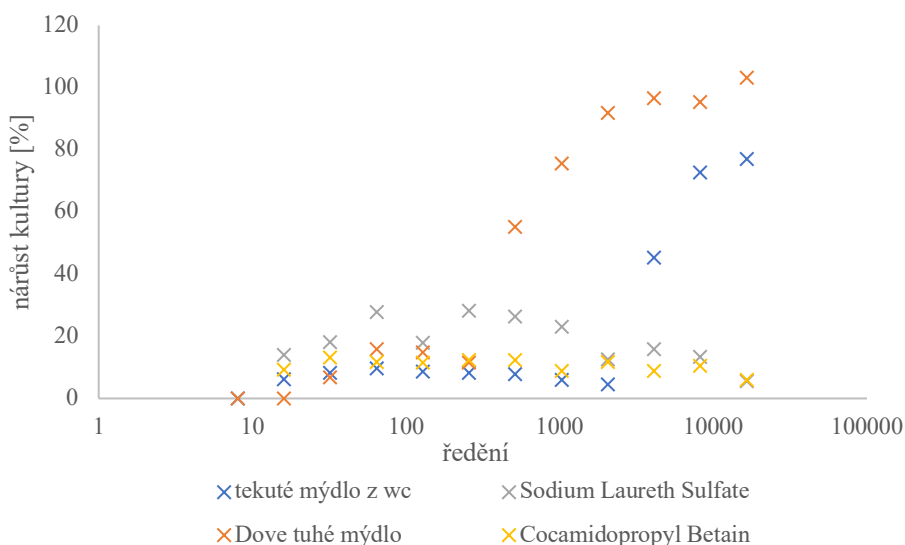
Obr. 28 Vliv dezinfekčního prostředku a odpovídající kontroly na růst mikroorganismů (Vitellaria, Vichy)

Dezinfekce Vitellaria s 96% ethanolu vykazuje bakteriostatické vlastnosti při ředění 16krát a méně. Následně kultura začíná prudce růst. Stejným způsobem na bakterii účinkuje 96% roztok ethanolu. Dezinfekce Vichy s obsahem 65% ethanolu účinkuje stejně jako její kontrolní roztok jen při nízkém ředění. Následně se nárůst zvyšuje a ustaluje na téměř konstantní hodnotě - viz Obr. 28.



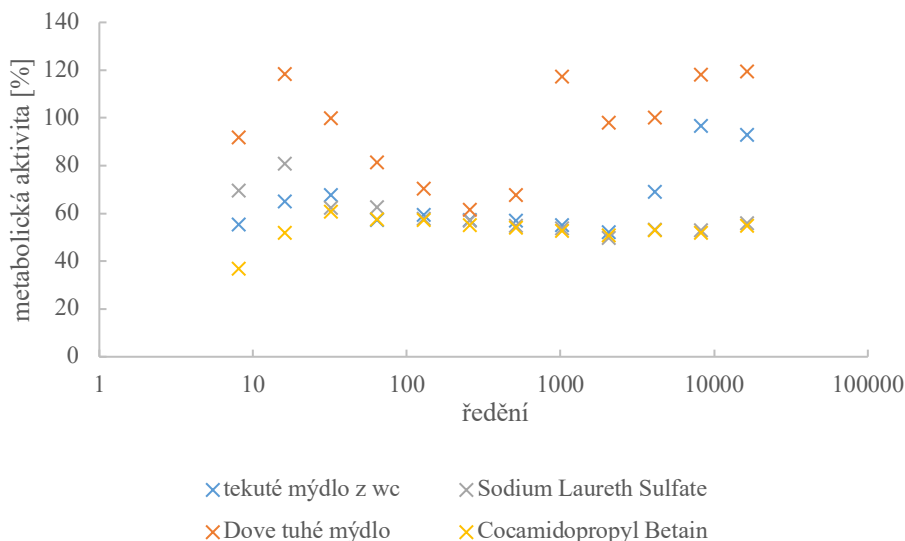
Obr. 29 Resazurinový test (*Vitellaria*, Vichy)

Při použití laboratorní dezinfekce je viabilita kultury i při nízkém zředění přes 100 %. Dezinfekční gel Vichy se chová obdobně.



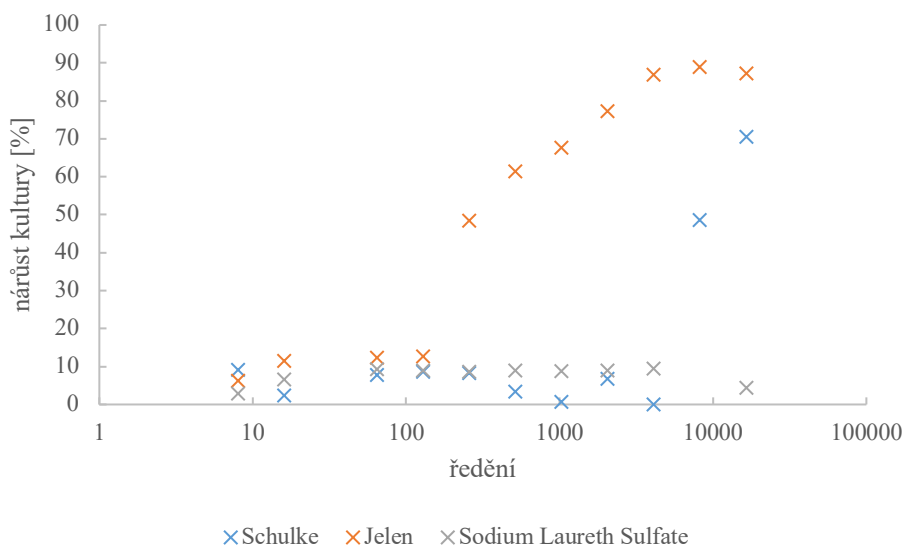
Obr. 30 Vliv dezinfekčního prostředku a odpovídající kontroly na růst mikroorganismů (mýdlo z toalet, Dove)

Tekuté mýdlo inhibuje růst bakterie *Serratia marcescens* a udržuje nárůst kultury na zhruba 10–15 %. Maximální možné zředění mýdla, při kterém je schopné růst bakterie inhibovat, je 2048krát. Následně kultura narůstá o desítky procent. U tuhého mýdla značky Dove je hodnota maximálního možného zředění 64krát a výrazně zaostává za odpovídajícím kontrolním roztokem Cocamidopropyl Betainu, který udržuje růst bakterie i při vysokém zředění pod 10 %.



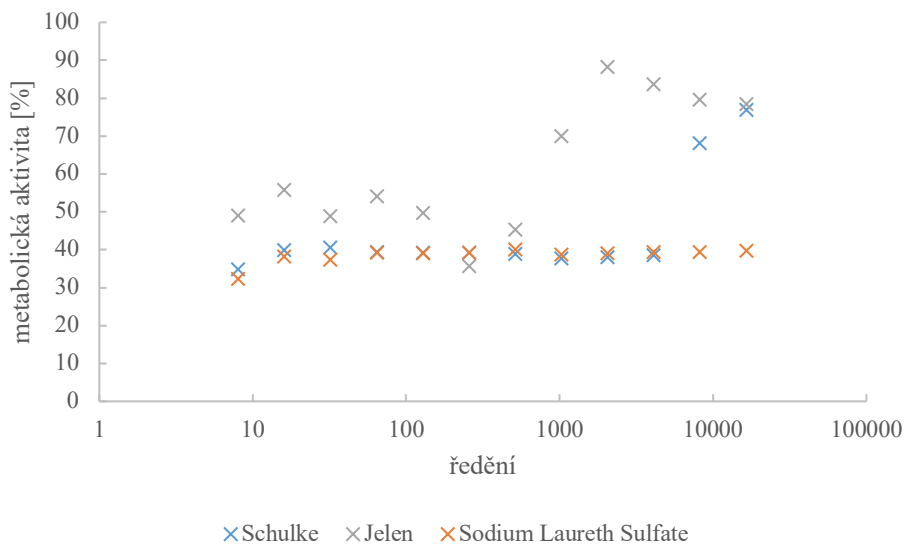
Obr. 31 Resazurinový test (mýdlo z toalet, Dove)

Životaschopnost buněk se při nízkém zředění tekutého mýdla drží na zhruba 60 %. Při dalším zředění roste. U tuhého mýdla se viabilita nejprve nad 100 %, poté se sníží na 67 % a při zředění 1024krát opět naroste nad 100 %.



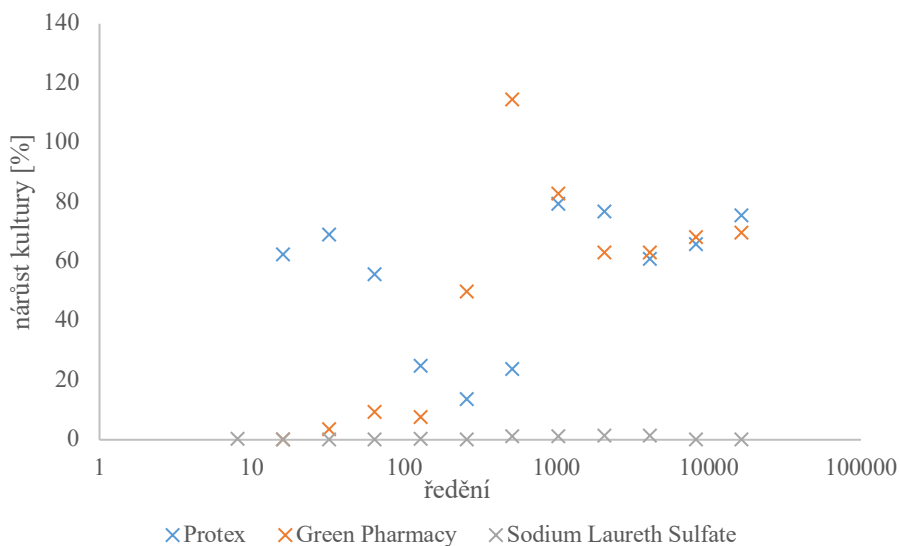
Obr. 32 Vliv dezinfekčního prostředku a odpovídající kontroly na růst mikroorganismů (Schulke, Jelen)

Tekuté mýdlo Schulke účinně inhibuje růst bakteriální kolonie, a to i při velmi vysokém zředění. Minimální koncentrace mýdla, při kterém zabraňuje růstu bakterie, je při zředění 4096krát. Poté kultura narůstá až o 50 %. Univerzální mýdlo Jelen umožňuje bakteriální kultuře nárůst při nízkém ředění na 8-12 %, po naředění více než 100krát se procentuální nárůst kultury zvyšuje o desítky procent. Maximální možné zředění mýdla před tímto skokovým nárůstem je 128krát, jak je patrné z Obr. 32.



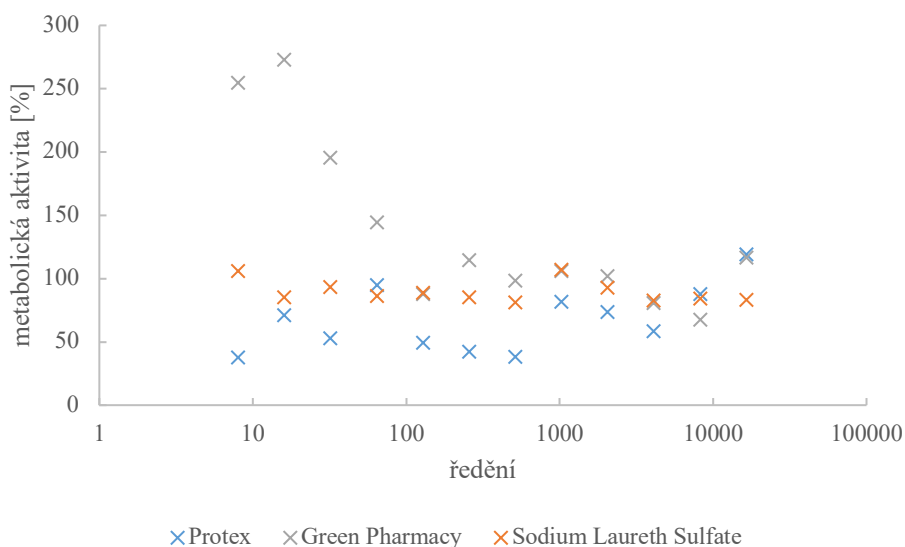
Obr. 33 Resazurinový test (Schulke, Jelen)

Ze závislosti na grafu je patrné že, nejvyšší viabilitu vykazuje kultura SM při použití mýdla Jelen a zředění 2048krát, a to 88 %. Nejnižší hodnoty dosahuje při zředění 256 (35 %). U použití tekutého mýdla Schulke je nejvyšší životaschopnost kultury při nejvyšším zředění (78 %).



Obr. 34 Vliv dezinfekčního prostředku a odpovídající kontroly na růst mikroorganismů (Protex, Green pharmacy, SLS)

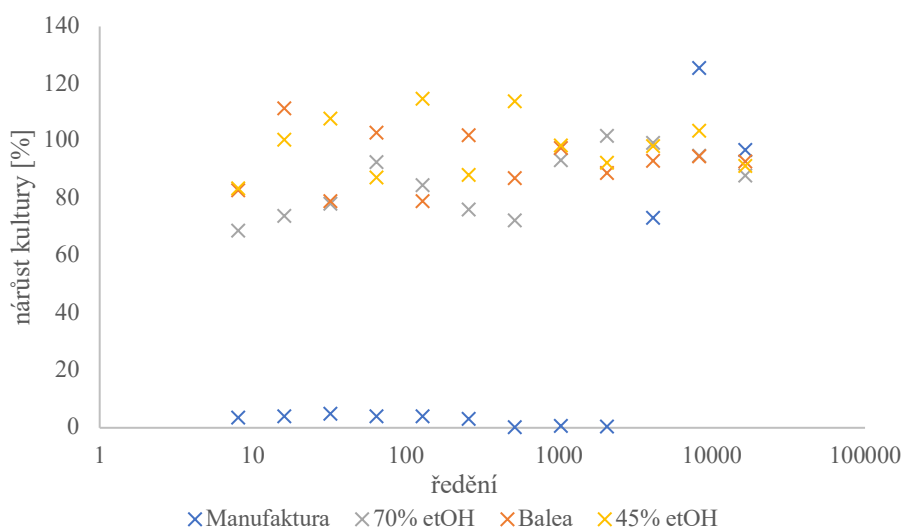
Mýdlo Protex neprokázalo dostatečnou antimikrobiální účinnost vůči této bakterii. Druhé tuhé mýdlo inhibuje růst bakterie při zředění 32, 64 a 128krát. Následně kultura narůstá až na 50 % a dále stoupá. SLS účinně růst bakteriální kultury potlačuje, a to i přes vysoké zředění.



Obr. 35 resazurin (Protex, Green pharmacy, SLS)

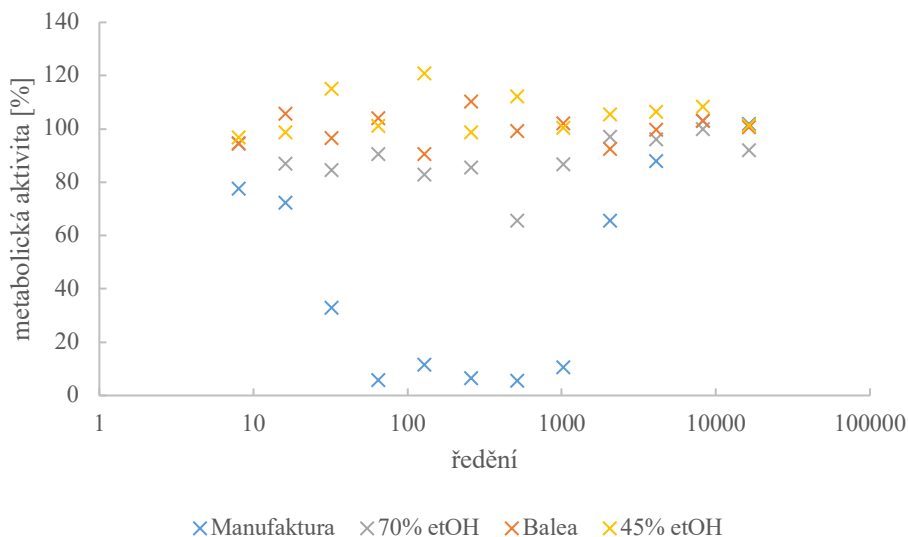
Vysokou viabilitu vykazuje kultura při použití tuhého mýdla Green Pharmacy.

5.1.3 Výsledky testů antimikrobiálních prostředků na bakterii *Escherichia coli*



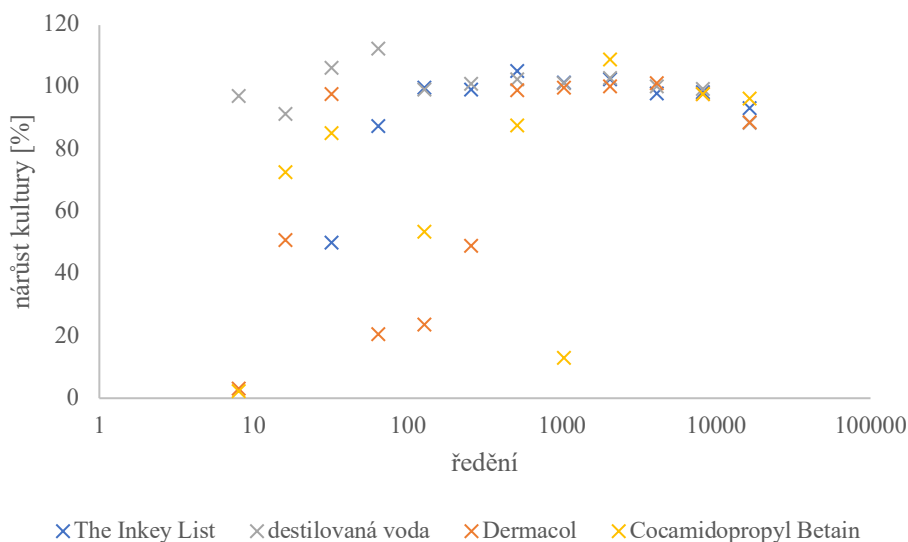
Obr. 36 Vliv dezinfekčního prostředku a odpovídající kontroly na růst mikroorganismů (Manufaktura, Balea)

Z grafu je patrné, že dezinfekce značky Manufaktura potlačuje růst bakterie *Escherichia coli* i při vysokém zředění. Zlomový bod, kdy dezinfekce přestává mít dostatečné bakteriostatické vlastnosti, nastává při překročení hranice naředění 2048krát. Kontrolní roztok této dezinfekce nepotlačuje růst kultury v takové míře jako vzorek mýdla. Druhý vzorek (Balea), stejně jako jeho kontrola nevykazuje dostatečný bakteriostatický účinek.



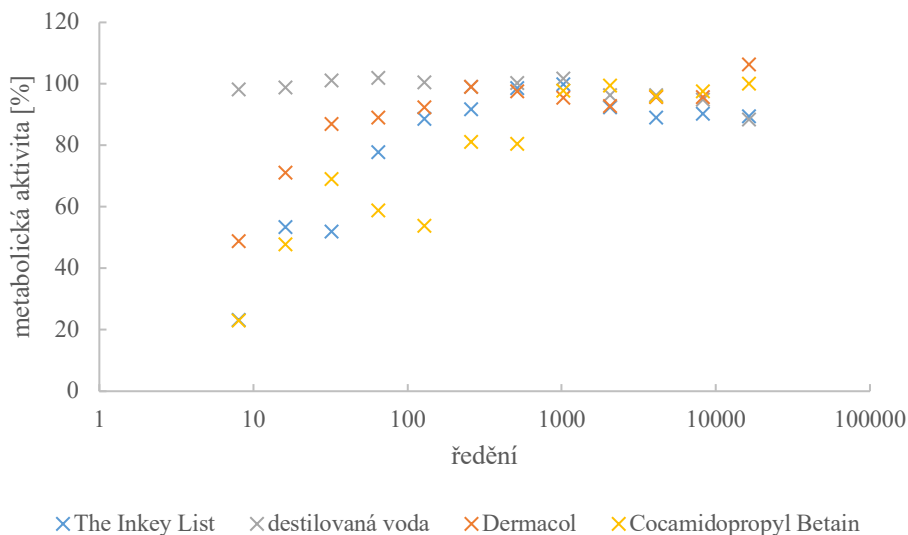
Obr. 37 Resazurinový test (Manufaktura, Balea)

Zvláštní trend je vidět na grafu Obr. 37 Resazurin, kdy při použití dezinfekce Manufaktura se viabilita nejprve dostává až na 77 %, následně klesá až při ředění 1024krát dosahuje pouze 5-10 %. Poté opět roste až na 88 %. Při použití dezinfekce Balea je životaschopnost kultury konstantně okolo 95 %.



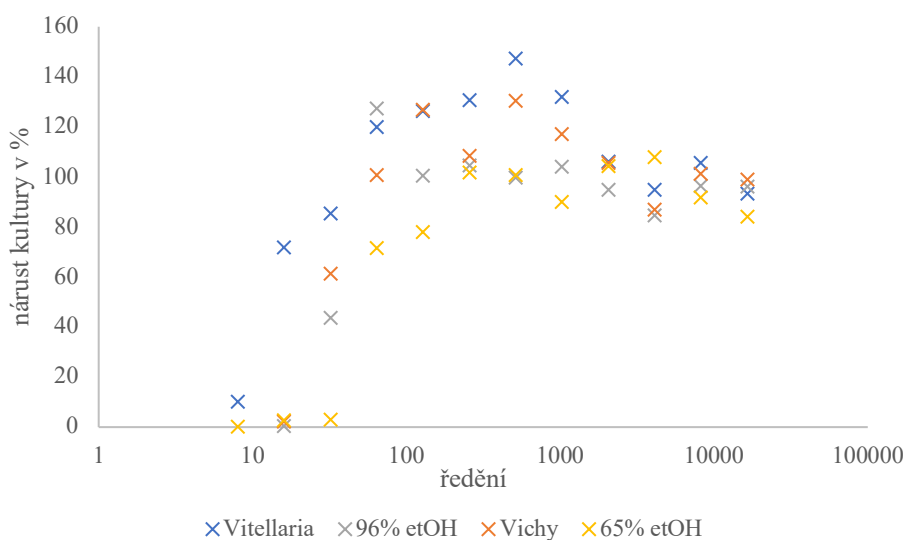
Obr. 38 Vliv dezinfekčního prostředku a odpovídající kontroly na růst mikroorganismů (The Inkey list, Dermacol)

Ze zpracovaných dat na Obr. 38 vyplývá, že při použití obou vzorků, The Inkey List a Dermacol, kultura se zvyšujícím se zředěním postupně narůstá.



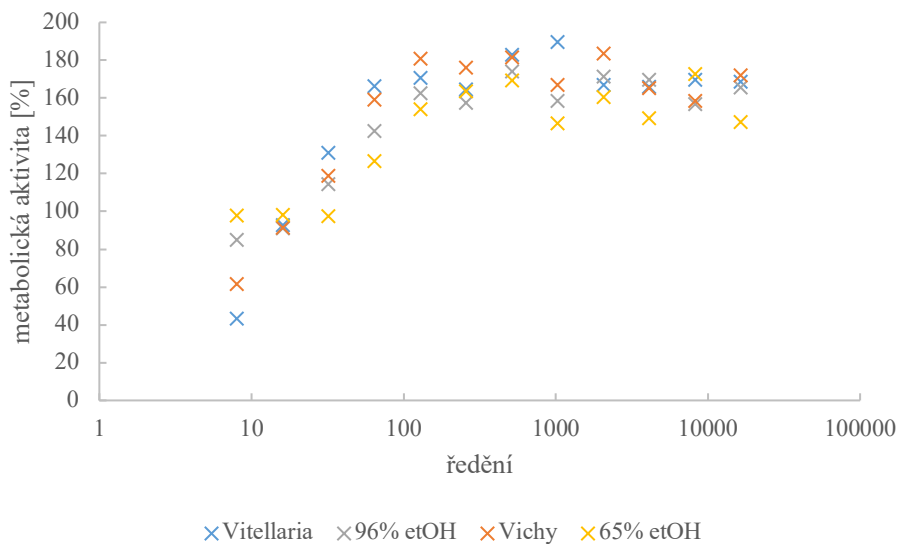
Obr. 39 Resazurinový test (The Inkey list, Dermacol)

Viabilita kultury u obou testovaných vzorku se zvyšujícím se ředění roste, až nakonec nabývá hodnoty 100 % - viz Obr. 39 Resazurin.



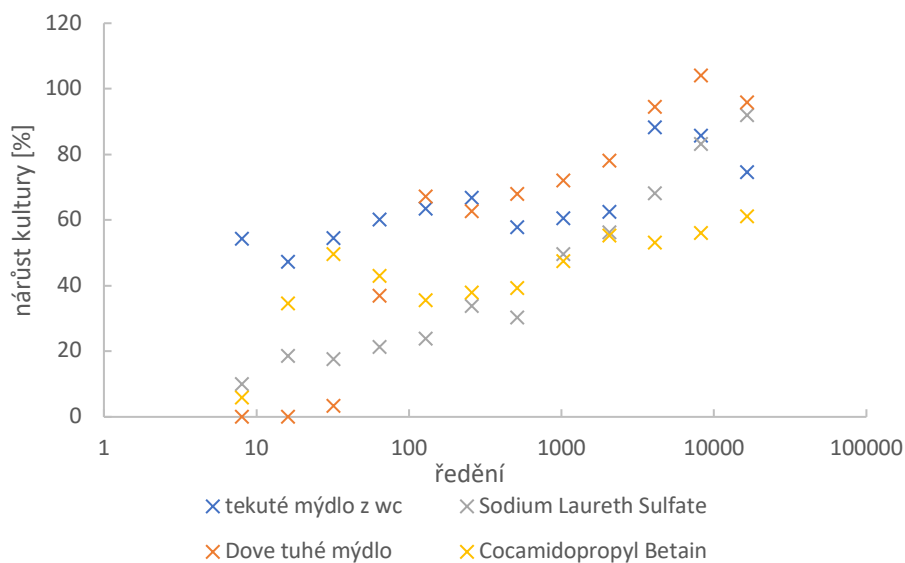
Obr. 40 Vliv dezinfekčního prostředku a odpovídající kontroly na růst mikroorganismů (Vitellaria, Vichy)

Oba vzorky i jejich kontroly prokazují antimikrobiální účinek při nízkém ředění. Se zvyšujícím se ředěním roste nárůst kultury do vysokých procentuálních hodnot u obou testovaných vzorků a jejich kontrol, jak je patrné z Obr. 40.



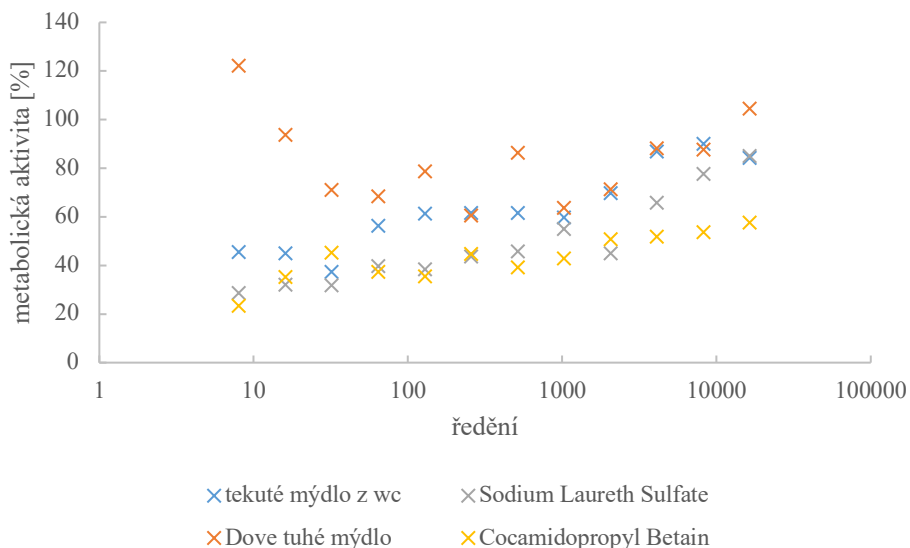
Obr. 41 Resazurinový test (*Vitellaria*, *Vichy*)

U obou vzorků i jejich kontrol postupně narůstá viabilita kultury, jak ukazuje Obr. 41 Resazurin.



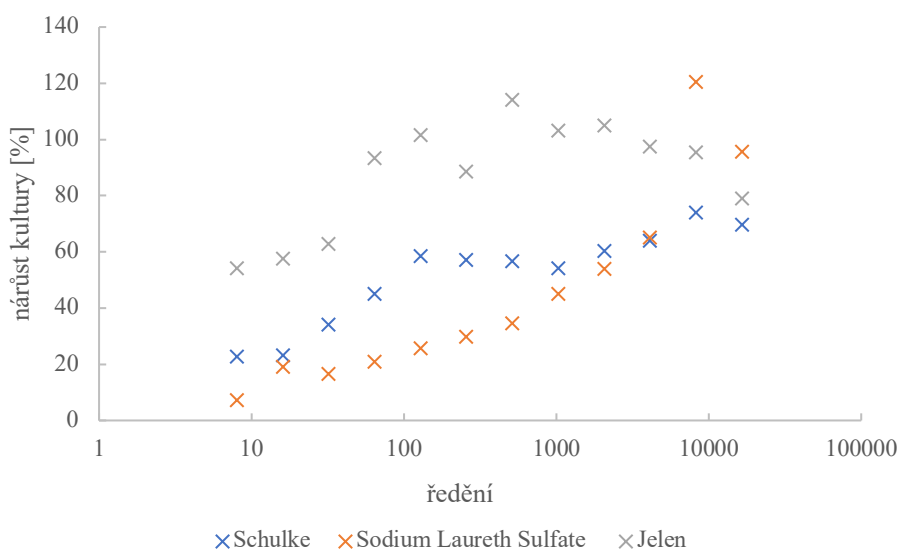
Obr. 42 Vliv dezinfekčního prostředku a odpovídající kontroly na růst mikroorganismů (mýdlo z toalet, Dove)

Tuhé mýdlo Dove prokázalo antibakteriální účinky při nízkém ředění, následně kultura narůstá. Tekuté mýdlo nezabraňuje nárůstu mikroorganismů *E.coli* v dostatečné míře a bakterie i při nízkém ředění narůstají až na 60 %. Kontrolní roztoky se chovají velmi podobně. Se zvyšujícím se ředěním se jejich antimikrobiální schopnost rovnoměrně snižuje (Obr. 42).



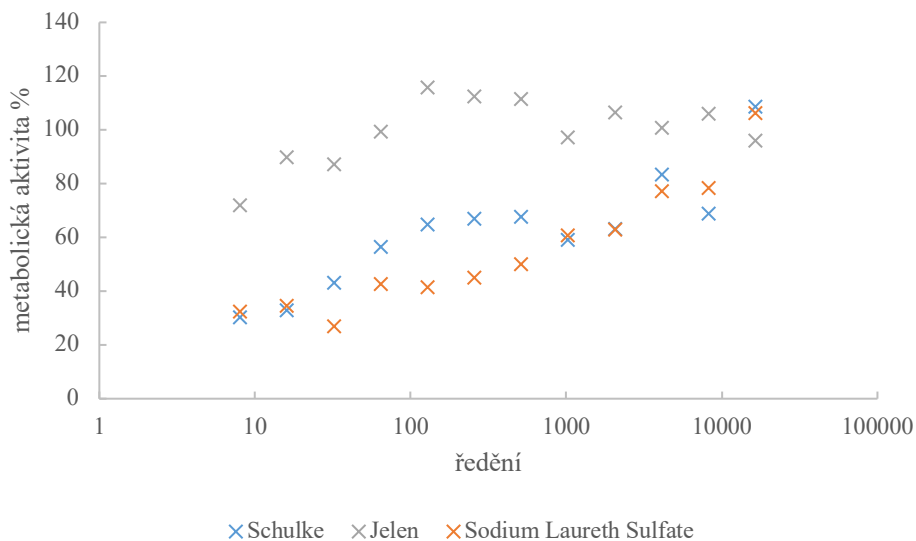
Obr. 43 Resazurinový test (mýdlo z toalet, Dove)

U tekutého mýdla životaschopnost kultury *E.coli* narůstá při postupném ředění z 45 % na konečných 87 %. U Dove mýdla je nejvyšší viabilita při zředění 8krát (Obr. 43 Resazurin).



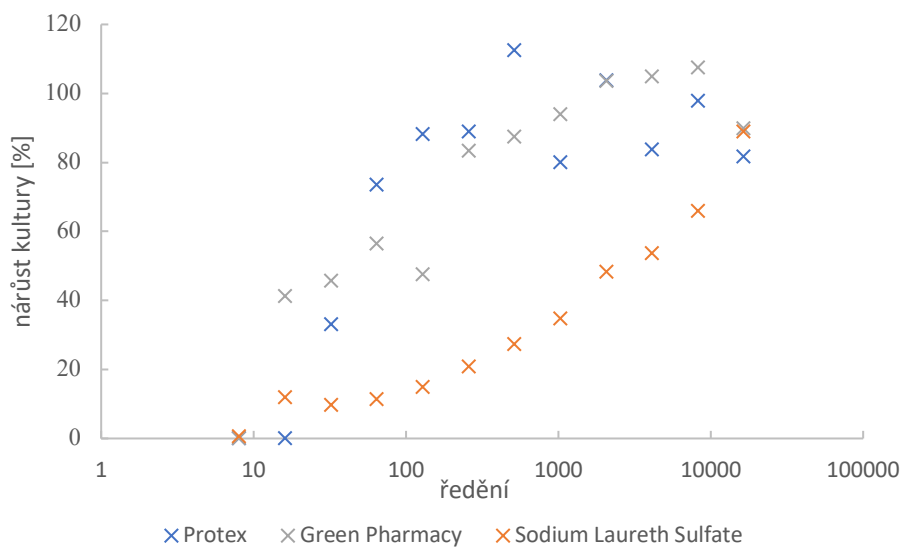
Obr. 44 Vliv dezinfekčního prostředku a odpovídající kontroly na růst mikroorganismů (Schulke, Jelen)

Při testování vzorku Schulke bakterie *E.coli* narůstají podle Obr. 44 i při nízkém ředění. Nárůst při nejnižším zředění je okolo 20 % a postupně se zvyšuje. Při nejvyšším zředění je hodnota nárůstu až 70 %. Kontrolní roztok SLS s menšími odchylkami kopíruje křivku vzorku. Horších výsledků dosáhlo univerzální mýdlo Jelen, u kterého i přes nízké ředění bakteriální kolonie narůstají až na 60 %.



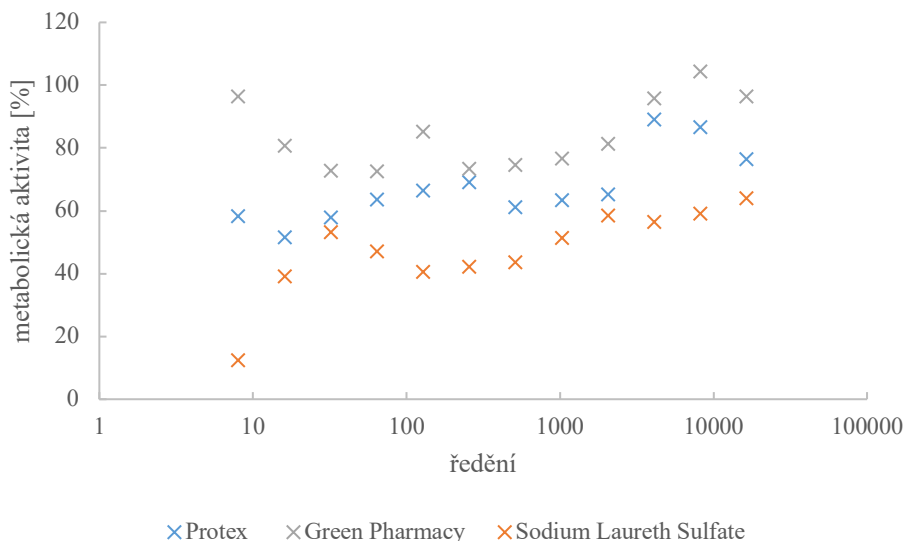
Obr. 45 Resazurinový test (Schulke, Jelen)

U tekutého mýdla Schulke se viabilita kultury zvyšuje postupně z 32 % při nejnižším zředění až na 100% při nejvyšším. U antibakteriálního mýdla Jelen není trend postupný a nejvyšší viabilita je vykázána při zředění 128krát.



Obr. 46 Vliv dezinfekčního prostředku a odpovídající kontroly na růst mikroorganismů (Protex, Green pharmacy, SLS)

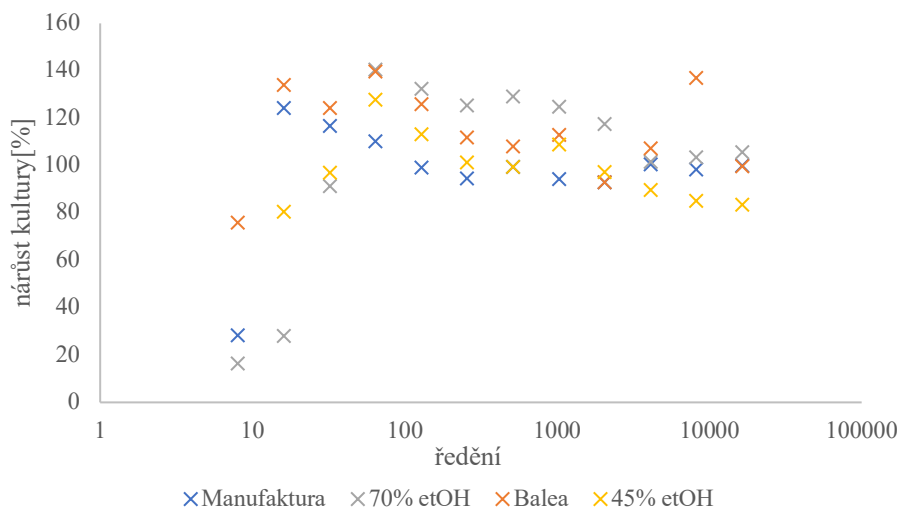
Vzorky obou tuhých mýdel neprokázali dostatečnou antimikrobiální aktivitu vůči *E.coli* (Obr. 46).



Obr. 47 Resazurinový test (Protex, Green pharmacy, SLS)

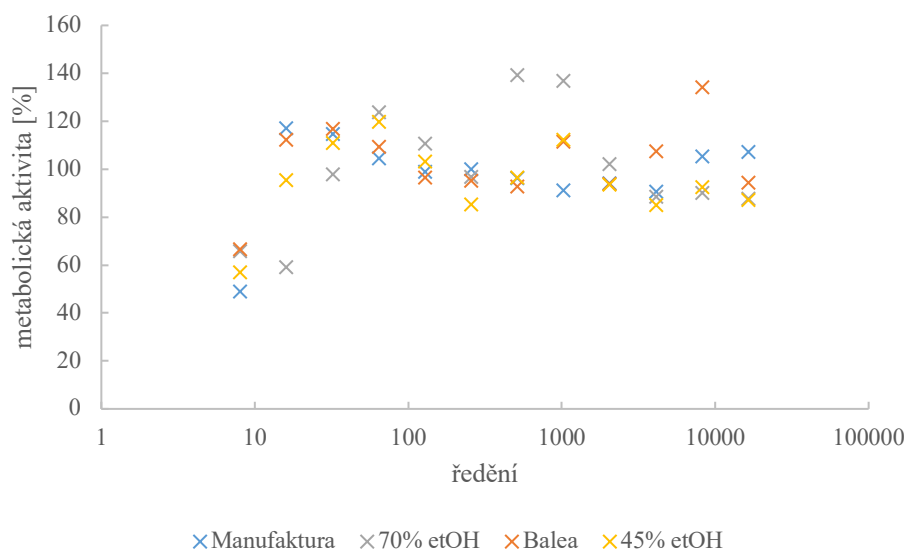
U tuhého mýdla Green Pharmacy je nejvyšší viabilita kultury *E.coli* při zředění 8192krát. V případě antibakteriálního mýdla Protex se viabilita pohybuje od 58 % do 89 % podle zředění mýdla. Výsledky jsou vidět na grafu Obr. 47 Resazurin

5.1.4 Výsledky testů antimikrobiálních prostředků na bakterii *Cultibacterium acnes*



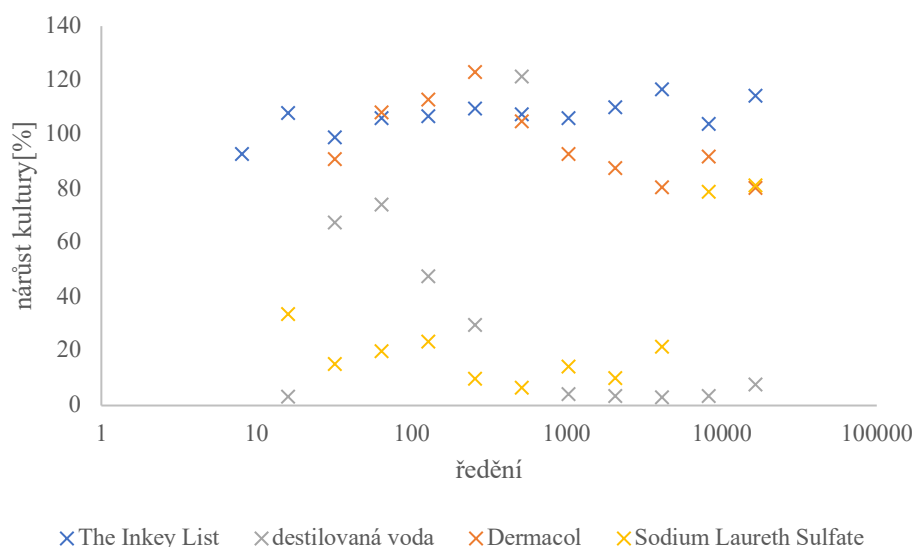
Obr. 48 Vliv dezinfekčního prostředku a odpovídající kontroly na růst mikroorganismů (Manufaktura, Balea)

Kultura bakterie *Cultibacterium acnes* narostla při použití dezinfekce Manufaktura a její kontroly i při nízkém ředění na 20-30 %. Větší ředění dezinfekce už nemá na růst kultury téměř žádný vliv. Vzorek dezinfekce Balea neprokázal vůči této bakterii dostatečnou antimikrobiální aktivitu a kopíruje křivku jeho kontroly (Obr. 48).



Obr. 49 Resazurinový test (Manufaktura, Balea)

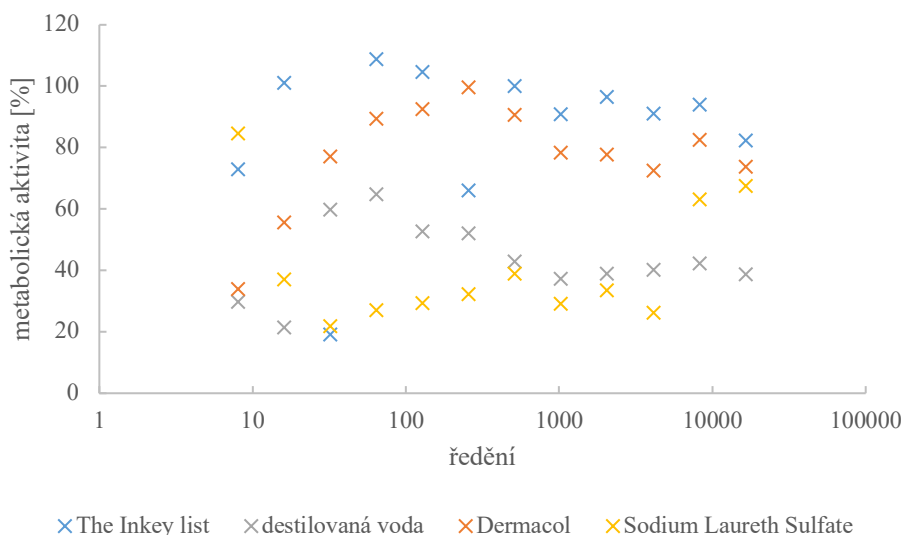
Viabilita kultury u prvního vzorku je při nejnižším zředění 49 %. Při ředění 16krát stoupá na ke 100 %. Následně se její hodnoty drží na přibližně stejné úrovni. U vzorku dezinfekce Balea je při nejnižším ředění viabilita 66 %. Nejvyšší hodnoty viability pak kultura dosahuje při zředění 8192krát, a to 134 %. Kontroly obou vzorků se chovají obdobně. Výsledky jsou znázorněny na Obr. 49 Resazurin



Obr. 50 Vliv dezinfekčního prostředku a odpovídající kontroly na růst mikroorganismů (The Inkey list, Dermacol)

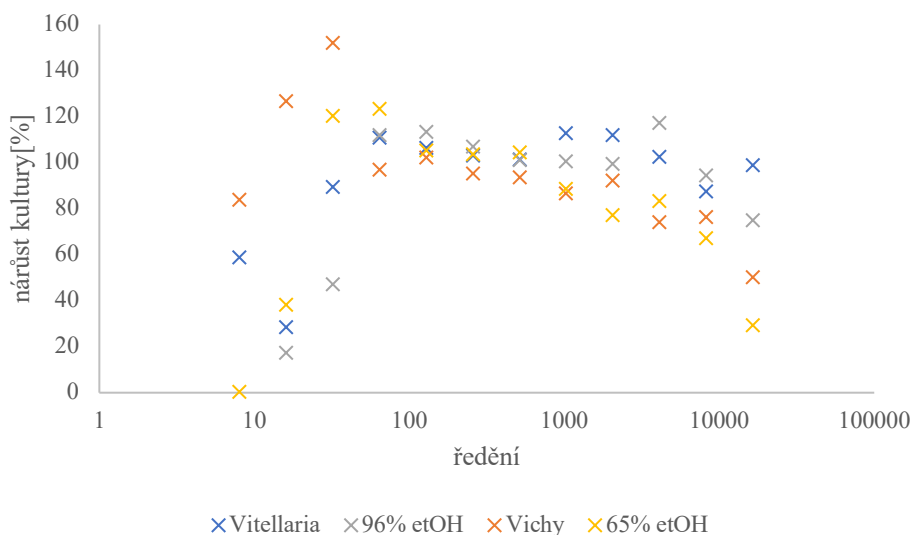
Gel s obsahem 2% kyseliny salicylové (The Inkey List) neprokázal proti narostlé kultuře potřebnou antimikrobiální účinnost. Kyselina salicylová je složkou, která se v kosmetice proti této bakterii používá velmi často. Jelikož je gel primárně určen k použití na pokožku obličeje, musí splňovat určitou šetrnost a nenarušovat kožní bariéru. Tyto vlastnosti mu pravděpodobně zabraňují likvidovat bakteriální kolonii v takové koncentraci, jaké jsme ho v laboratoři

vystavili. Mýdlo značky Dermacol nesplnilo očekávanou antimikrobiální účinnost, jak je patrné z Obr. 50.



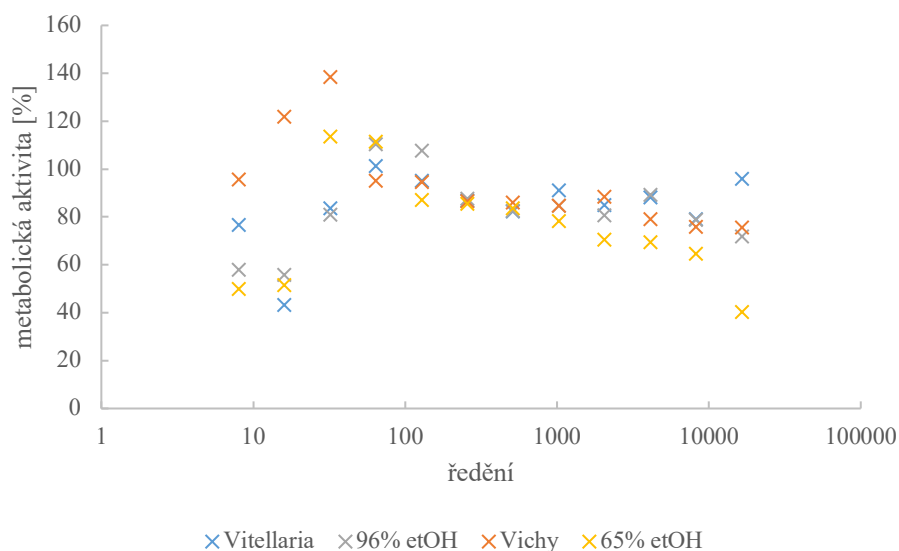
Obr. 51 Resazurinový test (The Inkey list, Dermacol)

Při použití vzorku The Inkey list dosahuje kultura nejvyšší viability při zředění vzorku 64krát (108 %). U antibakteriálního mýdla Dermacol je životaschopnost kultury nejvíce 99 %, a to při zředění mýdla 256krát. Data zobrazuje graf na Obr. 51 Resazurin



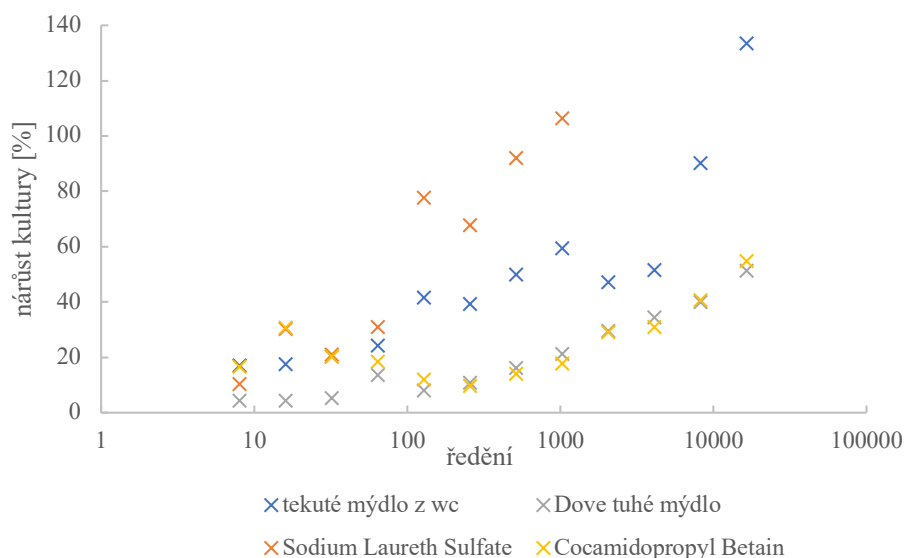
Obr. 52 Vliv dezinfekčního prostředku a odpovídající kontroly na růst mikroorganismů (Vitellaria, Vichy)

Oba vzorky i kontroly podle grafu Obr. 52 částečně inhibují nárůst kultury pouze při nízkém ředění.



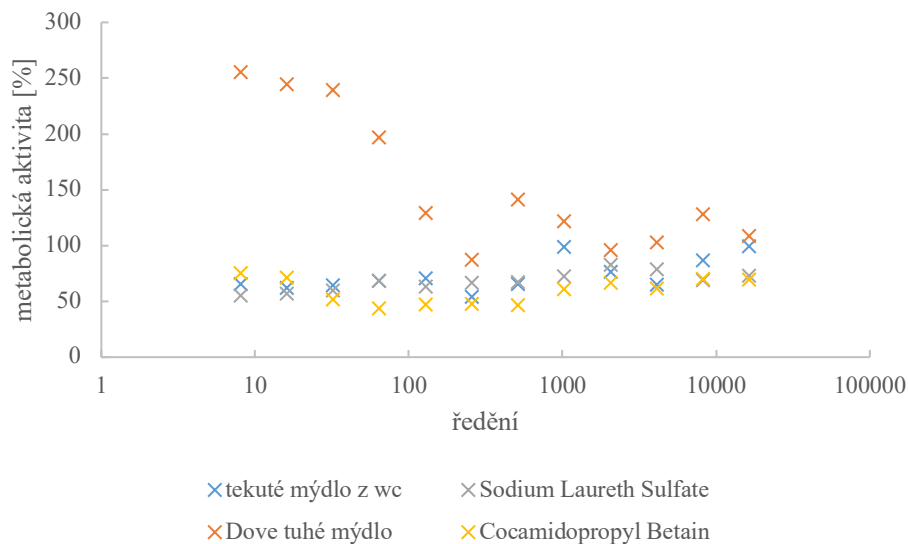
Obr. 53 Resazurinový test (*Vitellaria*, Vichy)

Nejvyšší viabilita při použití prvního vzorku je 96 % při nejvyšším zředění dezinfekce. U vzorku značky Vichy je nejvyšší hodnota viability 138 %, a to při zředění 32krát.



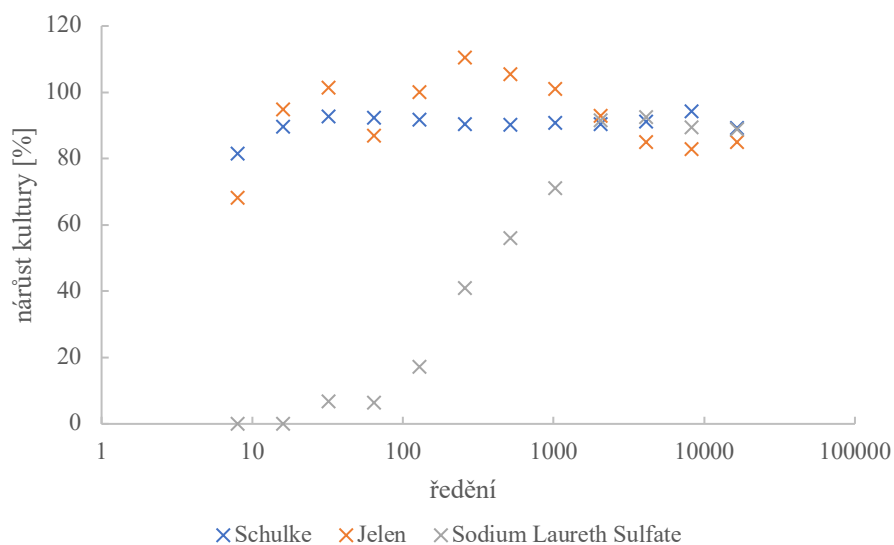
Obr. 54 Vliv dezinfekčního prostředku a odpovídající kontroly na růst mikroorganismů (mýdlo z toalet, Dove)

Z prvních dvou vzorků mýdel nejlépe inhibuje růst bakterií tuhé mýdlo Dove, které při nízkém ředění potlačuje jejich nárůst do 10 %. Minimální inhibiční koncentrace vzorku je koncentrace mýdla při zředění 128krát. Následně začínají kolonie exponenciálně růst. Kontrolní roztok se chová obdobně jako odpovídající vzorek. U vzorku tekutého mýdla je pozorován nárůst zhruba 15 % při nízkém ředění a následně roste do vysokých hodnot (Obr. 54).

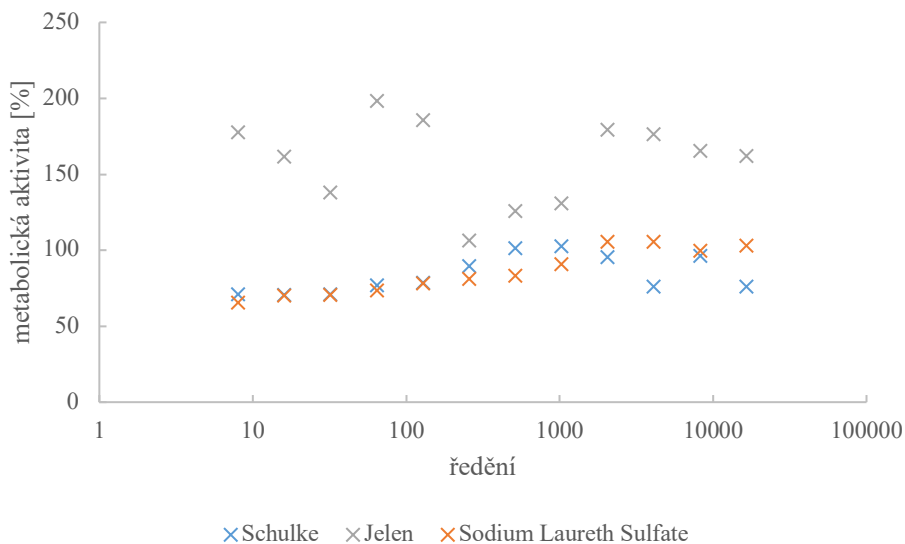


Obr. 55 Resazurinový test (mýdlo z toalet, Dove)

Vysoké viability dosahuje kultura CA při zředění 8, 16 a 32krát. Dále její viabilita klesá. Viabilita kultury u tekutého mýdla se pohybuje kolem 80 %.

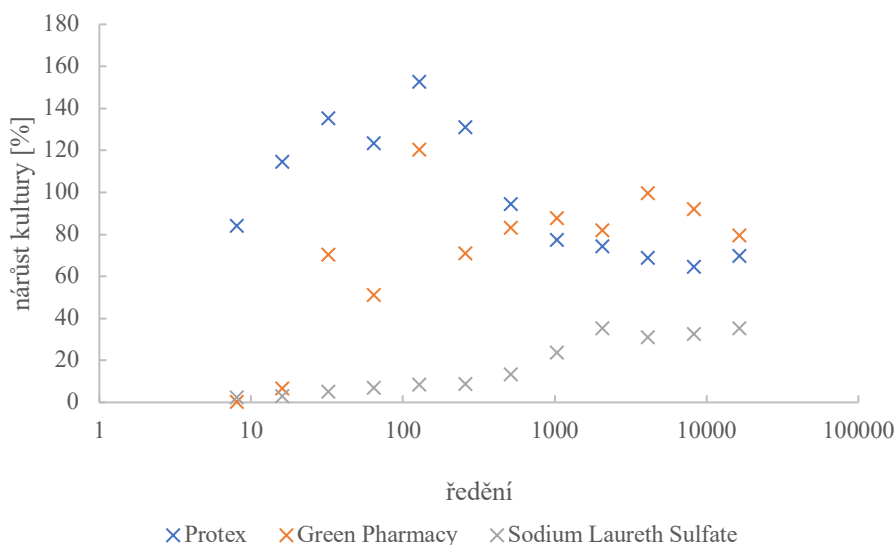


Obr. 56 Vliv dezinfekčního prostředku a odpovídající kontroly na růst mikroorganismů (Schulke, Jelen)



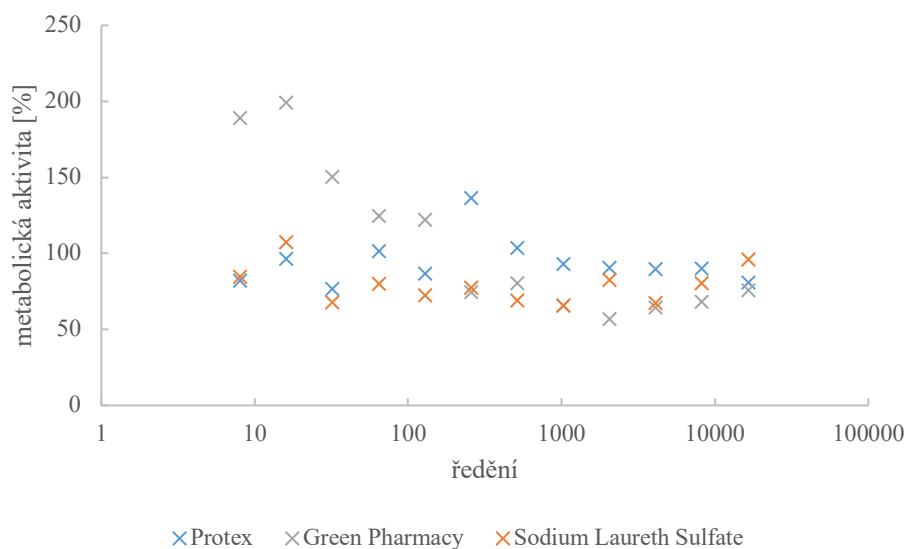
Obr. 57 Resazurinový test (Schulke, Jelen)

Při použití univerzálního mýdla Jelen dosahuje kultura vysoké viability (až k 200 %). U druhého vzorku je životaschopnost kultury až 100 % (Obr. 57 Resazurin).



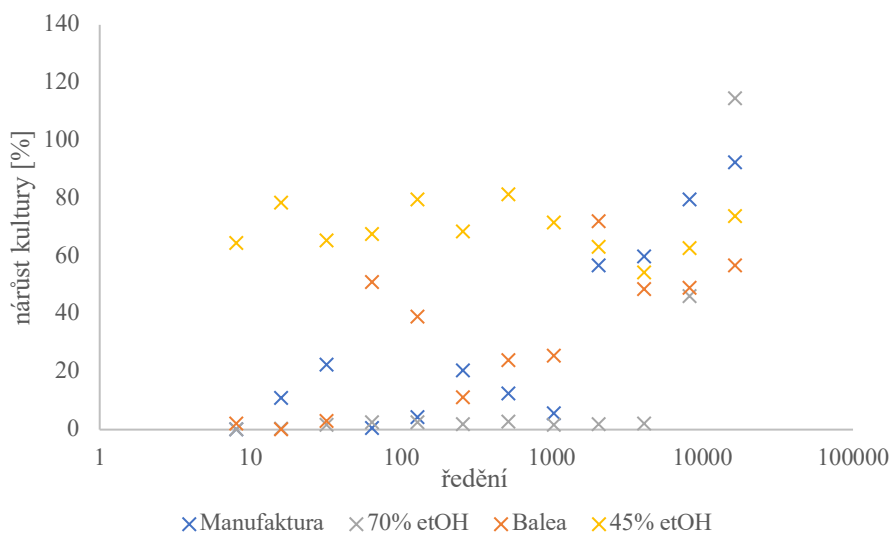
Obr. 58 Vliv dezinfekčního prostředku a odpovídající kontroly na růst mikroorganismů (Protex, Green pharmacy, SLS)

Z grafu na Obr. 58 Vliv dezinfekčního prostředku a odpovídající kontroly na růst mikroorganismů (Protex, Green pharmacy, SLS) je patrné, že nejvyšší antibakteriální účinek prokázaly kontrolní roztoky. Ze vzorků má nejlepší výsledky tuhé mýdlo Green Pharmacy, jehož minimální inhibiční koncentrace je při zředění 16krát. Při dalším ředění je jeho účinnost nedostatečná. Ani jeden z ostatních testovaných vzorků nemá vůči bakterii *Cultibacterium acnes* dostatečnou účinnost.



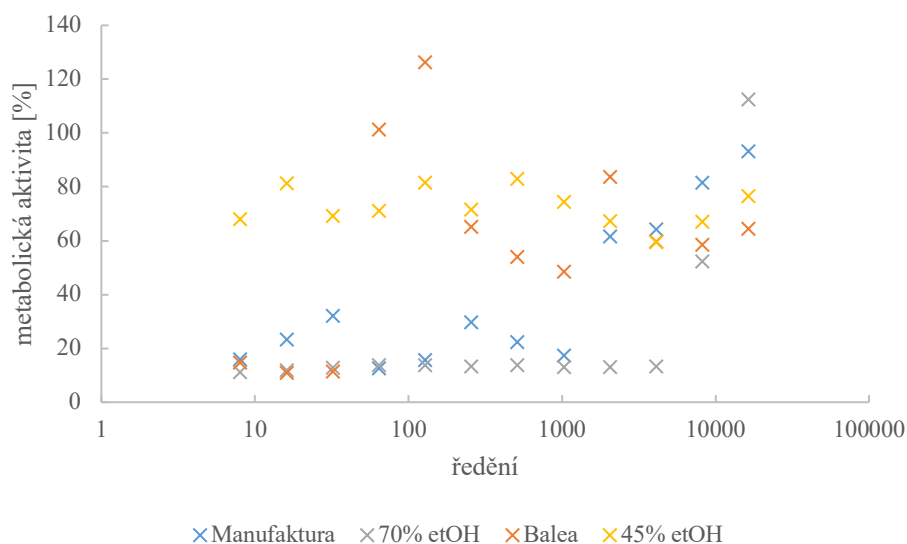
Obr. 59 Resazurinový test (Protex, Green pharmacy, SLS)

5.1.5 Výsledky testů antimikrobiálních prostředků na bakterii *Staphylococcus epidermidis*



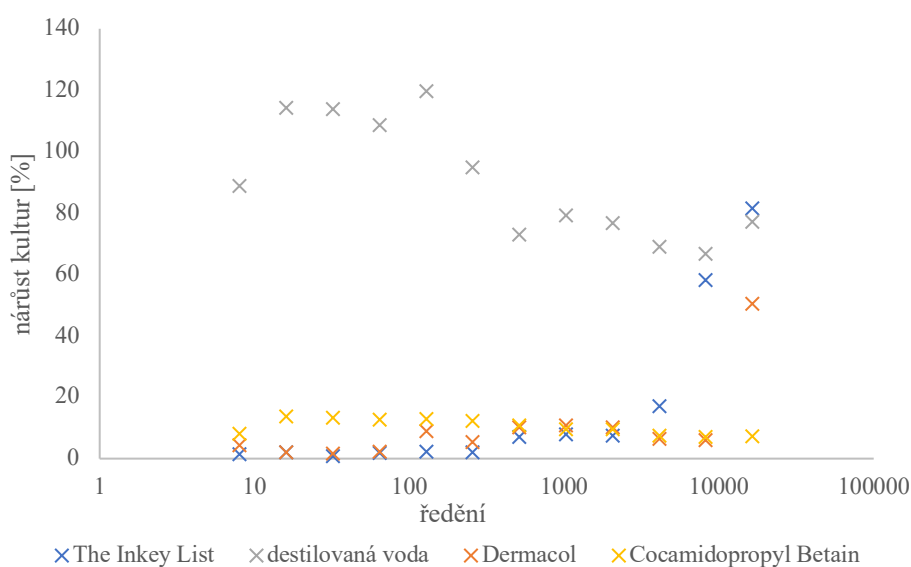
Obr. 60 Vliv dezinfekčního prostředku a odpovídající kontroly na růst mikroorganismů (Manufaktura, Balea)

Z grafu na Obr. 60 je patrné, že při použití 70% ethanolu byl růst kultury inhibován i při vysokém zředění. Minimální inhibiční koncentrace pro tuto bakterii je koncentrace dezinfekce při zředění 4096krát. O něco nižší minimální inhibiční koncentraci má vzorek Manufaktura.



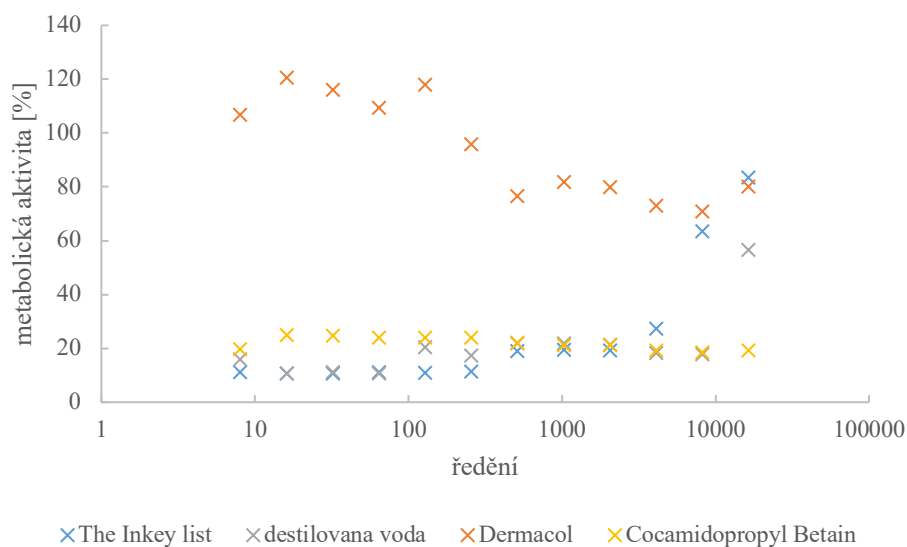
Obr. 61 Resazurinový test (Manufaktura, Balea)

U dezinfekce značky Manufaktura dosahuje viabilita kultury nejvyšší hodnoty při nejvyšším zředění (tj. 16384krát). U dezinfekce Balea stoupá viabilita až k 126 %, a to při zředění 128krát (Obr. 61 Resazurin)



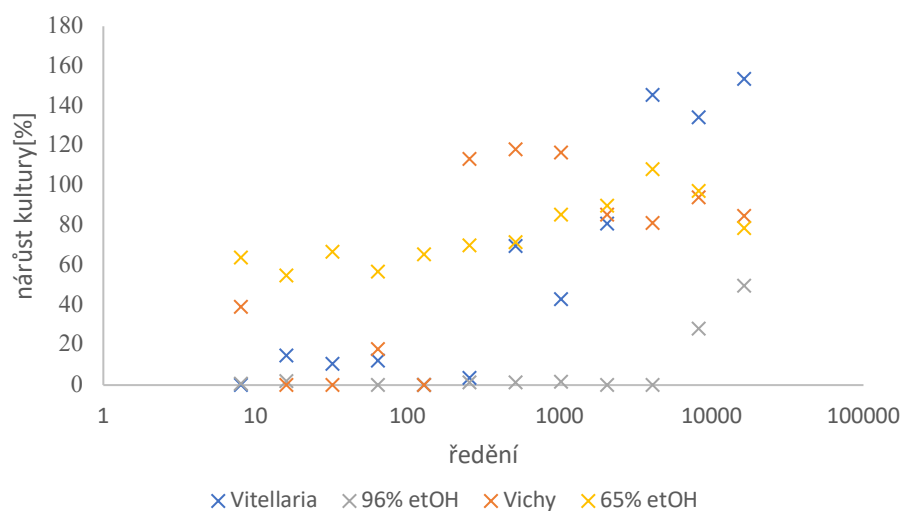
Obr. 62 Vliv dezinfekčního prostředku a odpovídající kontroly na růst mikroorganismů (The Inkey list, Dermacol)

Oba vzorky účinně inhibují růst bakterie *Staphylococcus epidermidis*, jak je patrné z Obr. 62.



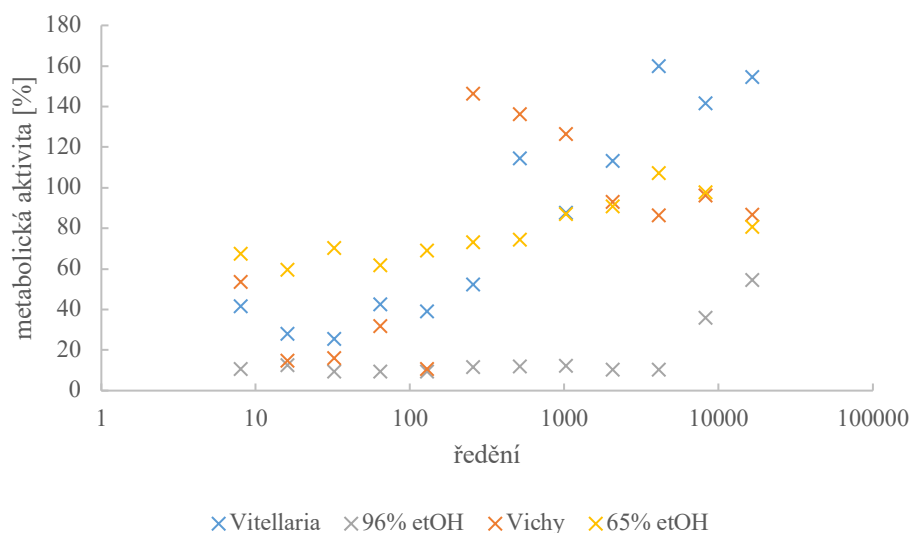
Obr. 63 Resazurinový test (The Inkey list, Dermacol)

Kultura vykazuje vysokou viabilitu v případě testování mýdla Dermacol a dosahuje až 100 %. U vzorku Inkey list se viabilita nejprve pohybuje do 10 %. Až od zředění gelu 4096krát se zvýší na 28 %. Nejvyšší je její viabilita při nejvyšším zředění, a to 80 % (Obr. 63 Resazurin



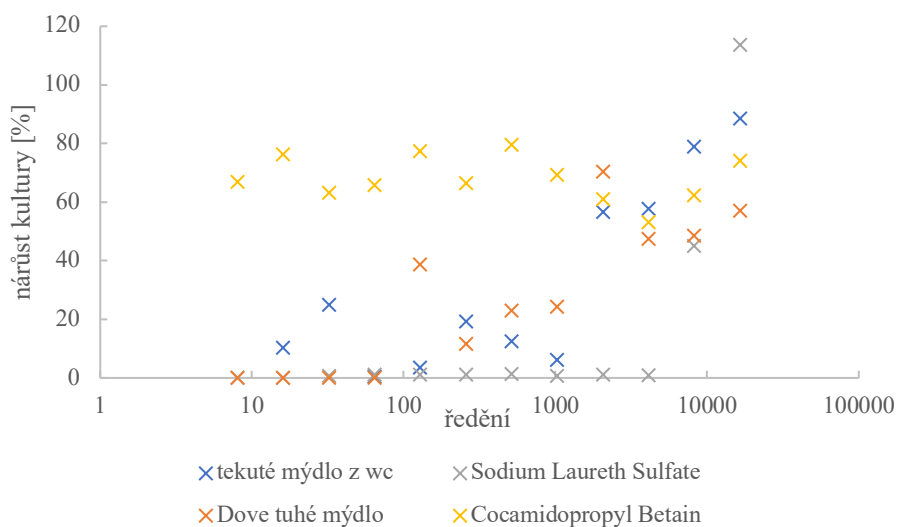
Obr. 64 Vliv dezinfekčního prostředku a odpovídající kontroly na růst mikroorganismů (Vitellaria, Vichy)

Roztok 96% ethanolu účinně likviduje bakteriální kolonie i při vysokém ředění. Bakterie začínají růst až při velmi nízké koncentraci dezinfekce, zhruba při zředění 8000krát, jak ukazuje Obr. 64.



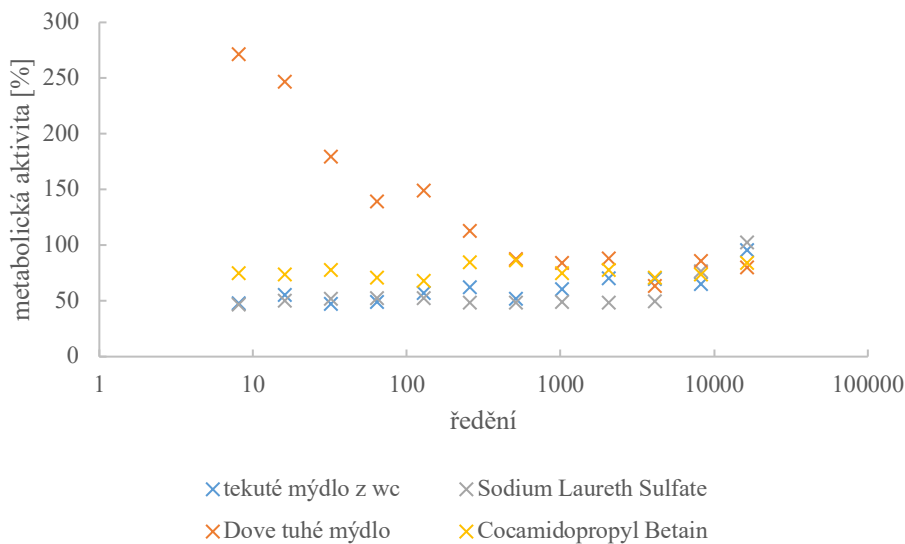
Obr. 65 Resazurinový test (*Vitellaria*, Vichy)

Viabilita kultury je nejvyšší při použití vzorku *Vitellaria*, a to přes 150 %.



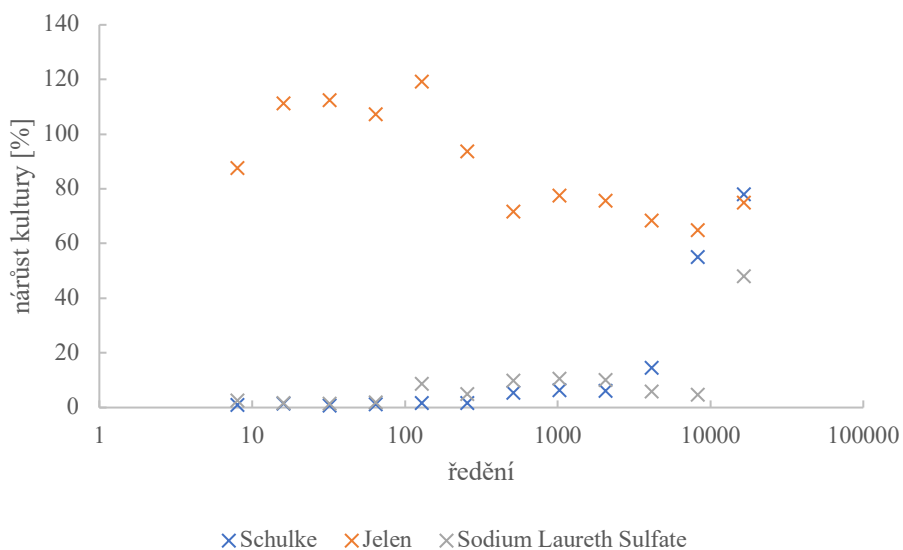
Obr. 66 Vliv dezinfekčního prostředku a odpovídající kontroly na růst mikroorganismů (mýdlo z toalet, Dove)

Vzorek tekutého mýdla má minimální inhibiční koncentraci při zředění 32krát. Při vyšším zředění bakterie rychle narůstají. Vzorek tuhého mýdla Dove prokázal nejvyšší antimikrobiální schopnost do zředění 64krát. Následně se antimikrobiální účinek snižuje (Obr. 66).



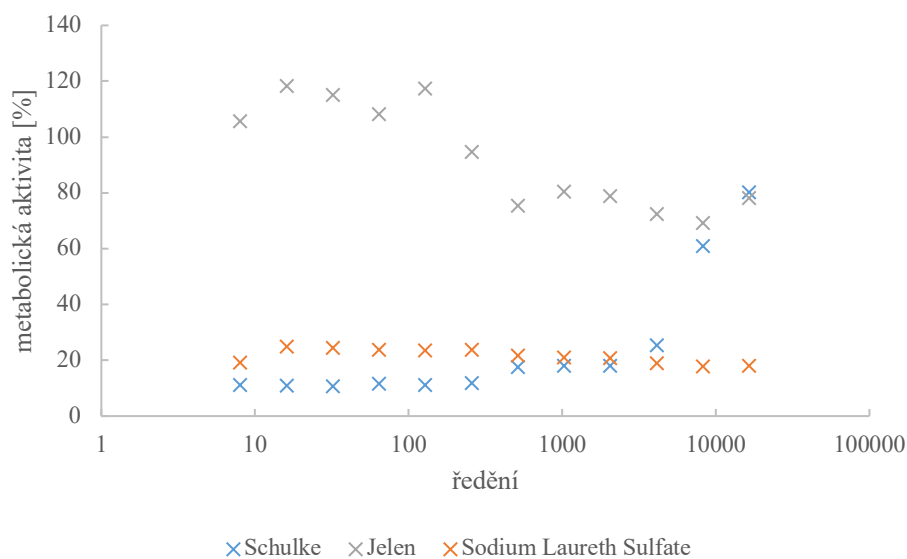
Obr. 67 Resazurinový test (mýdlo z toalet, Dove)

Zvláštní trend vykazuje kultura v přítomnosti tuhého mýdla Dove. Se zvyšujícím se ředěním viabilita kultury klesá, což může souviset mimo jiné i s charakterem tohoto mýdla a obsahem lipidické složky.



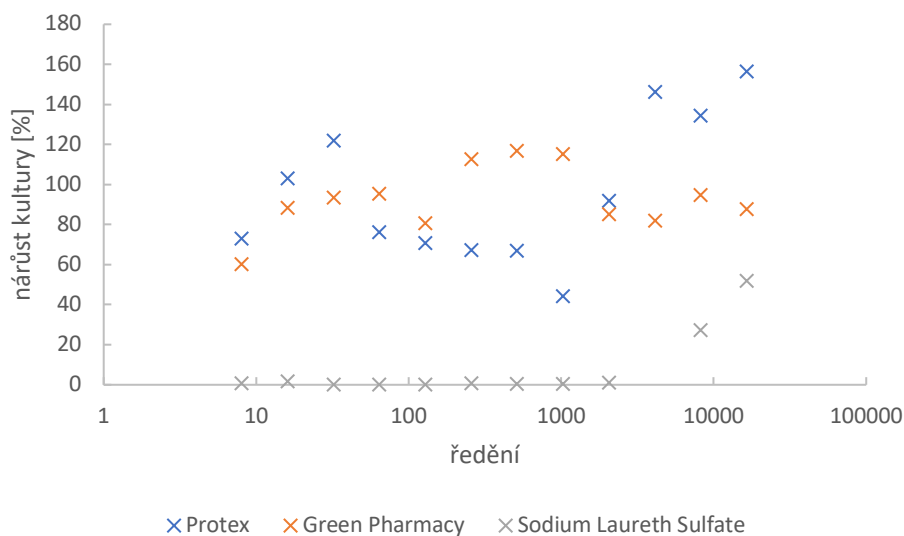
Obr. 68 Vliv dezinfekčního prostředku a odpovídající kontroly na růst mikroorganismů (Schulke, Jelen)

Mýdlo Schulke odebrané v laboratoři prokazatelně inhibuje růst bakterie i při vysokém zředění. Zřetelný růst bakterie začíná až při zředění mýdla větším než 8000krát. Univerzální mýdlo Jelen neprokázalo dostatečnou účinnost, jak je patrné z Obr. 68. Důvodem může být jeho omezená rozpustnost a značná tvrdost.



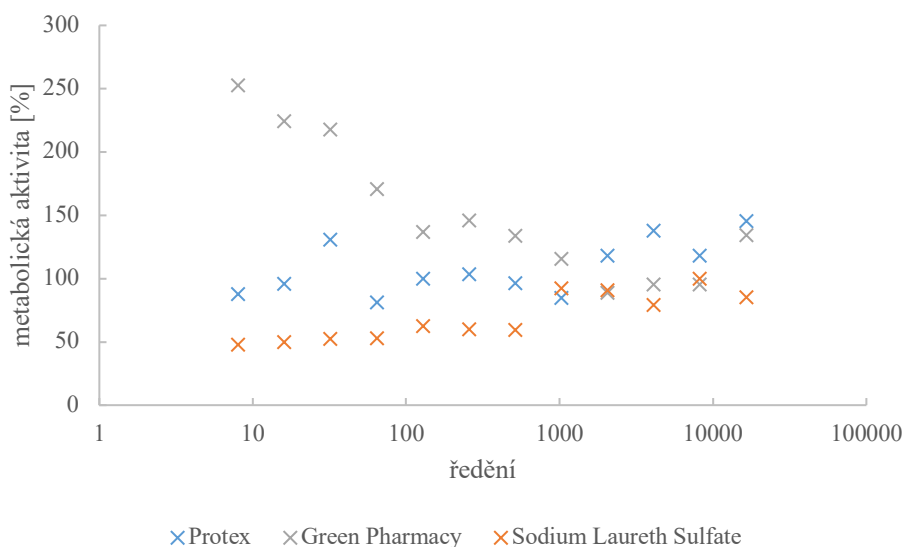
Obr. 69 Resazurinový test (Schulke, Jelen)

Nejvyšší viability dosahuje kultura při použití univerzálního mýdla Jelen. Viabilita se pohybuje u 100 %. U mýdla je viabilita nejvyšší při nejvyšším zředění, a to 78 %.



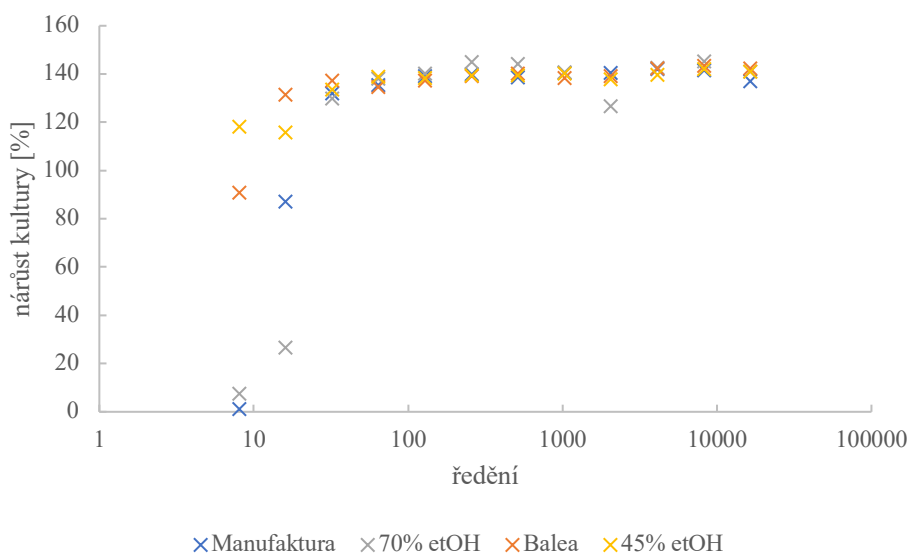
Obr. 70 Vliv dezinfekčního prostředku a odpovídající kontroly na růst mikroorganismů (Protex, Green pharmacy, SLS)

Při testování obou mýdel došlo podle grafu Obr. 70 ihned k nárůstu kultury až na 80 %. Sodium Laureth Sulfate bakterii inhibuje i při vyšším zředění.



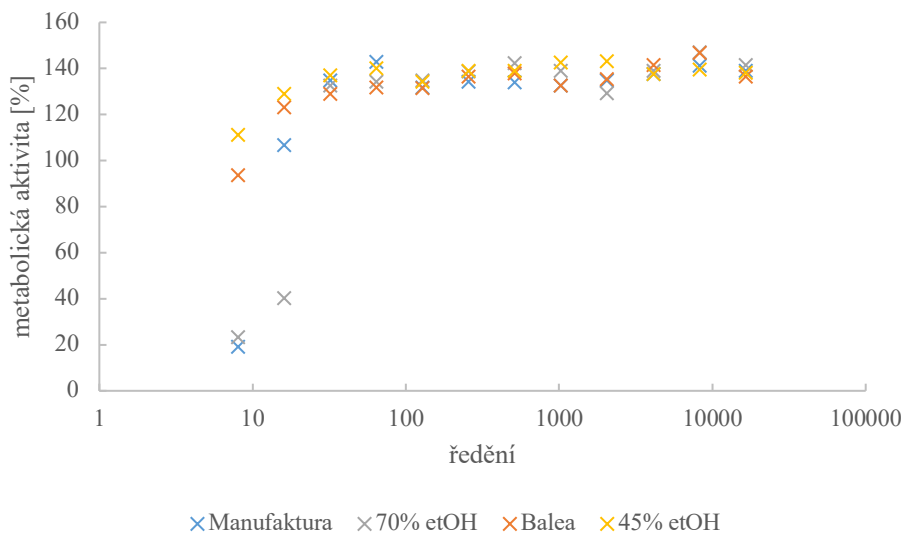
Obr. 71 Resazurinový test (Protex, Green pharmacy, SLS)

5.1.6 Výsledky testů antimikrobiálních prostředků na kvasince *Candida glabrata*



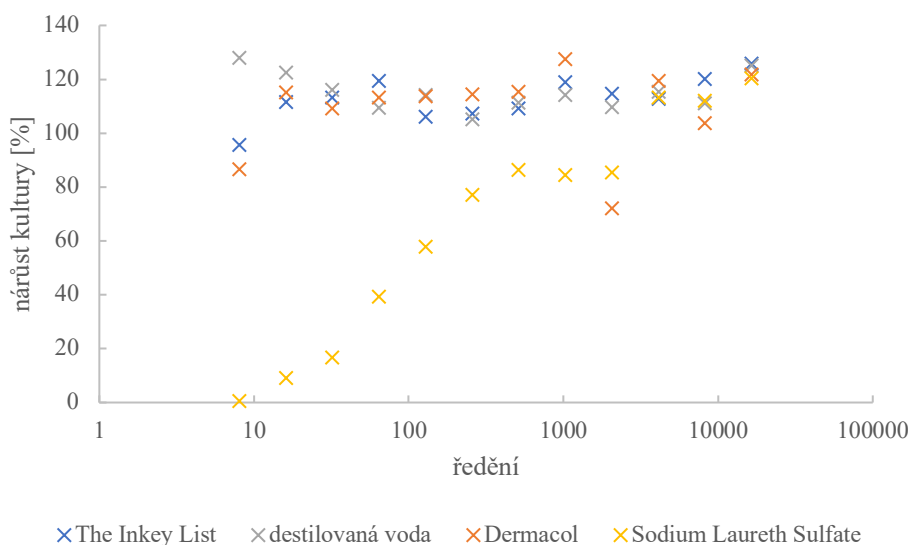
Obr. 72 Vliv dezinfekčního prostředku a odpovídající kontroly na růst mikroorganismů (Manufaktura, Balea)

Z grafu Obr. 72 je patrné, že nejvíce inhibuje růst mikroorganismu vzorek Manufaktura a její kontrola 70% ethanol, ale pouze při zředění 8krát. Při tomto zředění je tedy stanovena minimální inhibiční koncentrace vzorku. Už při zředění vzorku Manufaktury 16krát narůstají bakterie až na 87 %, u kontrolního roztoku na 26 %. Vzorek Balea má podstatně horší výsledky a neproказuje dostatečnou antimikrobiální aktivitu. Kultura narůstá i při velmi nízkém zředění až ke 100 %. Obdobně se chová i kontrola druhého vzorku.



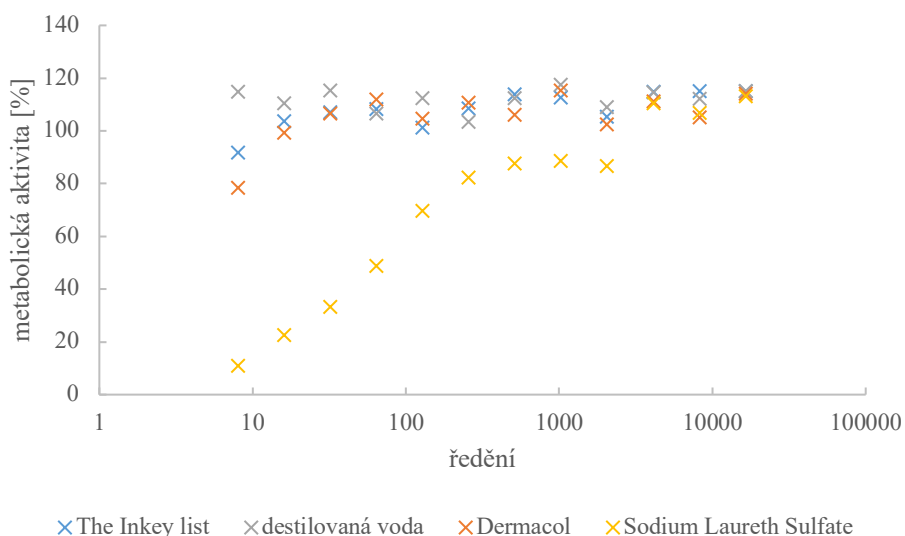
Obr. 73 Resazurinový test (Manufaktura, Balea)

U prvního vzorku je viabilita kultury při nízkém zředění 19 %. Následně narůstá až ke 100 %. U druhého vzorku se viabilita bez ohledu na ředění drží nad 93 %.



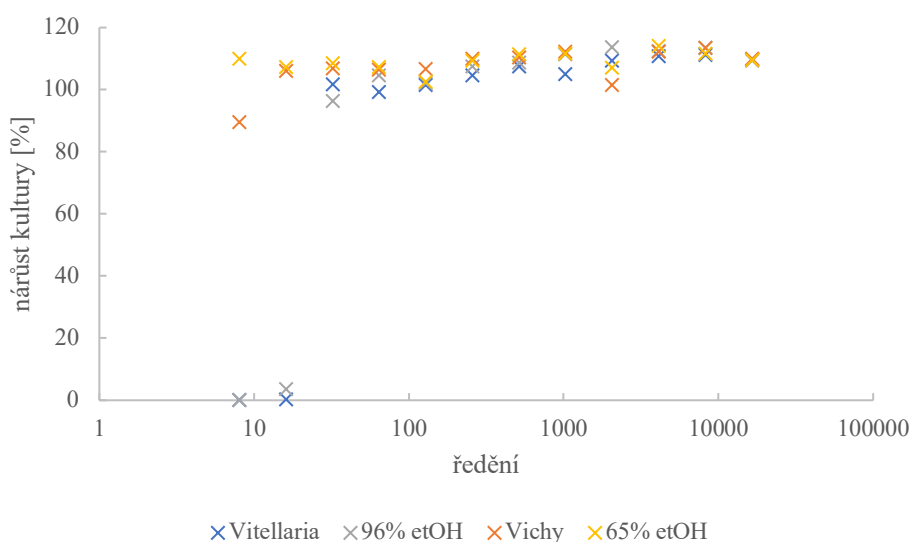
Obr. 74 Vliv dezinfekčního prostředku a odpovídající kontroly na růst mikroorganismů (The Inkey list, Dermacol)

Ani jeden ze vzorků nevykazuje antimikrobiální účinnost vůči kvasince. Kontrolní roztok SLS inhibuje její růst alespoň při nižších zředěních, následně růst kultury prudce stoupá (Obr. 74).



Obr. 75 Resazurinový test (The Inkey list, Dermacol)

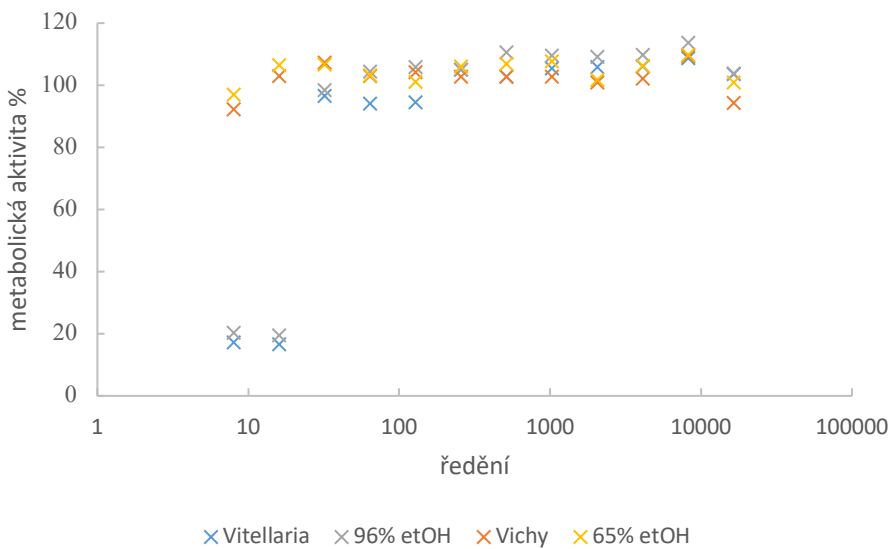
Viabilita kultury CG je velmi vysoká u obou vzorků. Při porovnání dat nárůstu kultury Obr. 74 Vliv dezinfekčního prostředku a odpovídající kontroly na růst mikroorganismů (The Inkey list, Dermacol) a měření metabolické aktivity Obr. 75 Resazurinový test (The Inkey list, Dermacol) je patrné, že jak vzorek firmy The Inkey list, tak i od firmy Dermacol výrazně neovlivnily nárůst bakteriální kultury ani její metabolickou aktivitu vůči kontrole, kde buňky měly dostatek živin. Jen kontrola SLS vykazuje antimikrobiální účinek vůči kvasince *Candida glabrata*, a to až do naředění 256krát, kdy je hodnota nárůstu kultury na 76,9 % a její metabolická aktivita se pohybuje okolo 69,8 %.



Obr. 76 Vliv dezinfekčního prostředku a odpovídající kontroly na růst mikroorganismů (Vitellaria, Vichy)

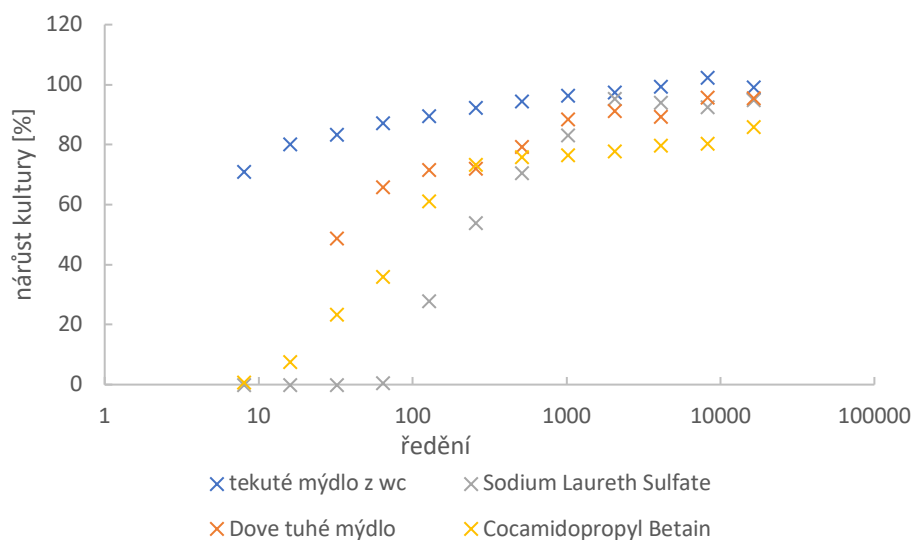
96% ethanol potlačuje růst kvasinky při zředění 8krát a 16krát. Při vyšších zředěních se nárůst kultury zvyšuje. Vzorek dezinfekce od značky Vichy nemá podle Obr. 76 proti kvasince

Candida glabrata měřitelný účinek. Totéž bylo potvrzeno i při měření metabolické aktivity kvasinkové kultury na Obr. 77 Resazurinový test (Vitellaria, Vichy)



Obr. 77 Resazurinový test (Vitellaria, Vichy)

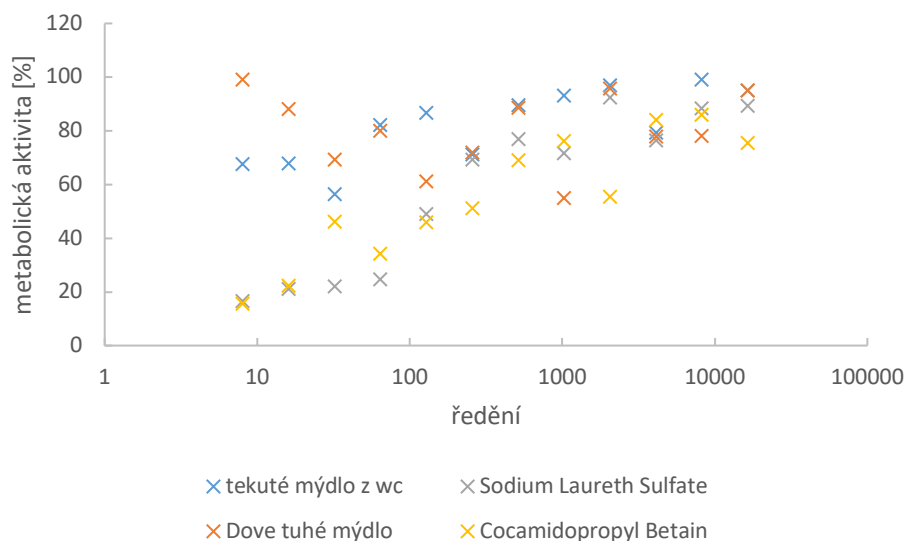
U vzorku značky Vitellaria je viabilita kultury při nízkém zředění poměrně nízká - 19 %. Vzorek tedy vykazuje mírný antifungální účinek do naředění 16krát. I metabolická aktivita kvasinkové kultury je pro tato naředění velice nízká a pohybuje se okolo 20 %. Dále narůstá do vysokých hodnot.



Obr. 78 Vliv dezinfekčního prostředku a odpovídající kontroly na růst mikroorganismů (mýdlo z toalet, Dove)

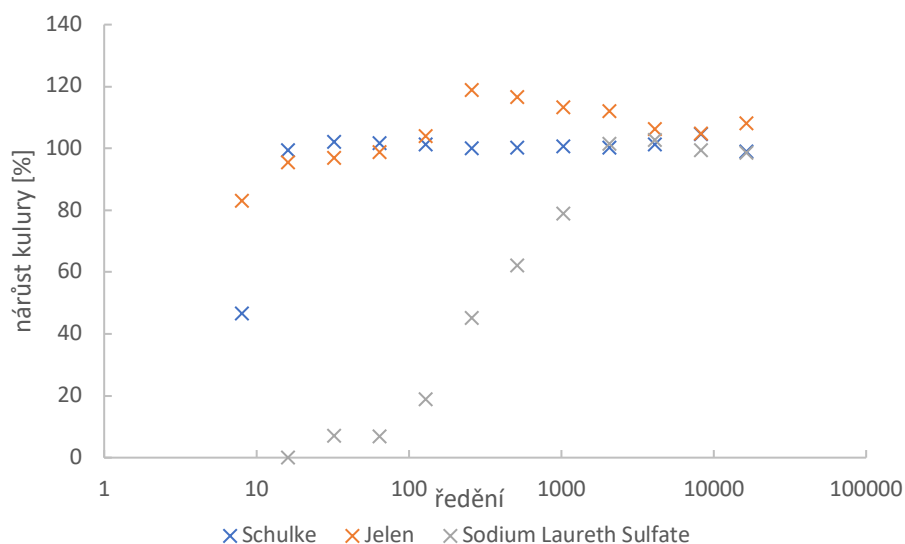
Vzorek tekutého mýdla není schopen potlačit růst kvasinky ani při nízkém zředění. Už při zředění 8krát kvasinka narůstá až na 70 %. Tento nárůst se následně zvyšuje. Tuhé mýdlo Dove

vykazuje antimikrobiální schopnost při ředění 8 a 16krát a inhibuje tak nárůst do 7 %. Lepší antimikrobiální aktivitu vykazují kontrolní roztoky vzorků, avšak také se jejich antimikrobiální účinek s postupným zředěním snižuje (Obr. 78).



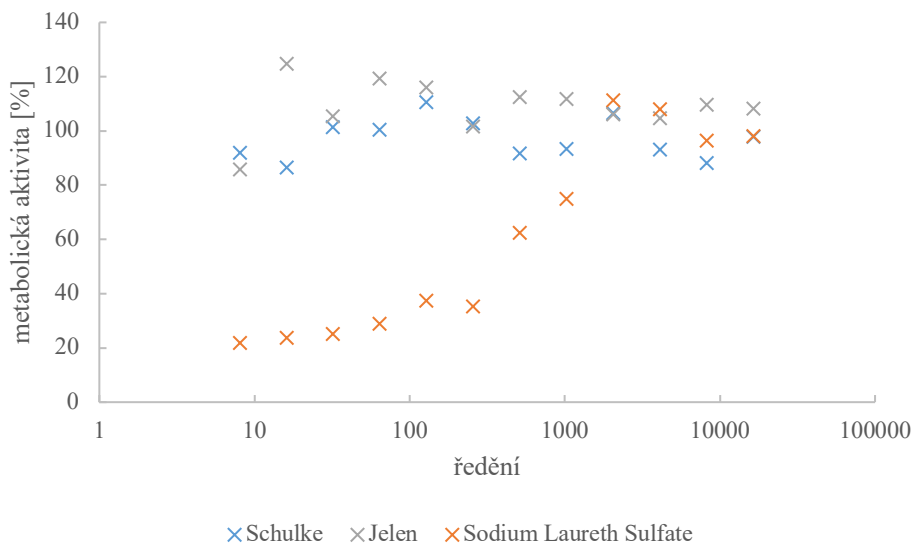
Obr. 79 Resazurinový test (mýdlo z toalet, Dove)

Metabolická aktivita bakteriální kultury je nejvyšší při použití tuhého mýdla Dove a dosahuje při zředění 8 a 16krát až 100 %. I u vzorku tekutého mýdla je viabilita kultury poměrně vysoká a roste ke 100 %.



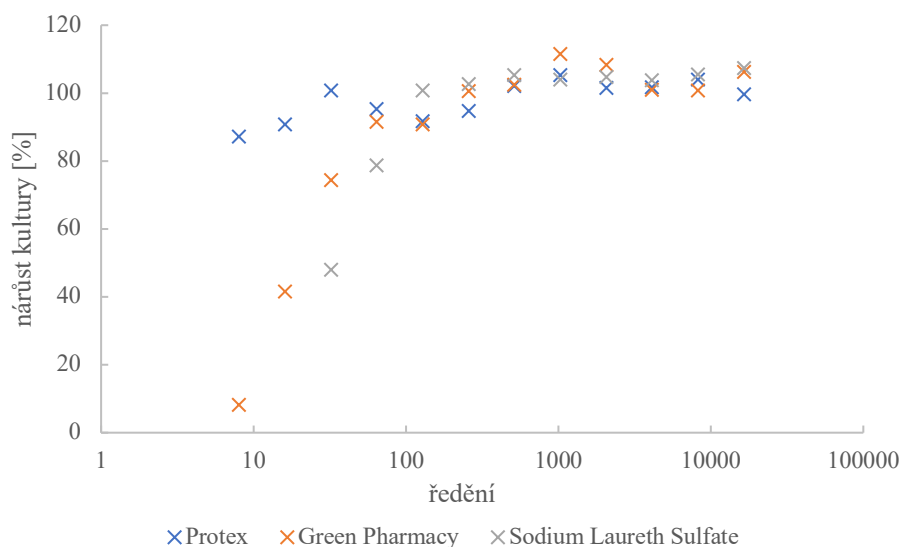
Obr. 80 Vliv dezinfekčního prostředku a odpovídající kontroly na růst mikroorganismů (Schulke, Jelen)

Při testování tekutého mýdla Schulke kvasinka narůstá na 46 % už při nejnižším zředění. Dále se její nárůst zvyšuje. Univerzální mýdlo Jelen neprokázalo potřebný antimikrobiální účinek vůči této kvasince, jak je patrné z Obr. 80.



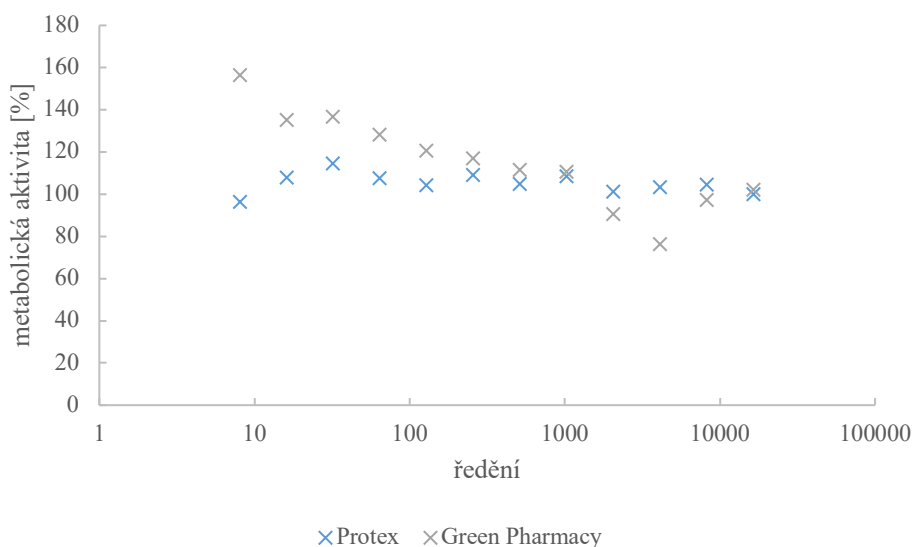
Obr. 81 Resazurinový test (Schulke, Jelen)

Životaschopnost kultury je u prvního vzorku poměrně vysoká - 90 %. U druhého vzorku je drží mírně nad 100 procenty. Oba vzorky tedy významně neovlivnily nárůst kvasinkové kultury. Naopak kontrola SLS opět růst kvasinkové kultury inhibovala, a to až do naředění 1024krát.



Obr. 82 Vliv dezinfekčního prostředku a odpovídající kontroly na růst mikroorganismů (Protex, Green pharmacy, SLS)

Tuhé mýdlo Green Pharmacy umožňuje mikroorganismům narůst při zředění 8krát na 8 %. Při zředění 16krát už je tento nárůst 41 %. Dále se nárůst skokově zvyšuje o desítky procent až se nakonec ustaluje na 100 % při zředění 256krát (Obr. 82).



Obr. 83 Resazurinový test (Protex, Green pharmacy, SLS)

U antibakteriálního mýdla Protex se viabilita kultury pohybuje na hranici 100 % bez ohledu na ředění mýdla. U druhého vzorku je viabilita opět vysoká a přesahuje 100 %.

Ze všech vyhodnocených dat lze říci, že nejširší účinek vůči všem testovaným mikroorganismům mělo antibakteriální mýdlo Dermacol, které se vyznačuje nejlepšími výsledky při vyhodnocení MIC koncentrace. Z mýdel dosáhlo nejlepších výsledků tekuté mýdlo odebrané na toaletách.

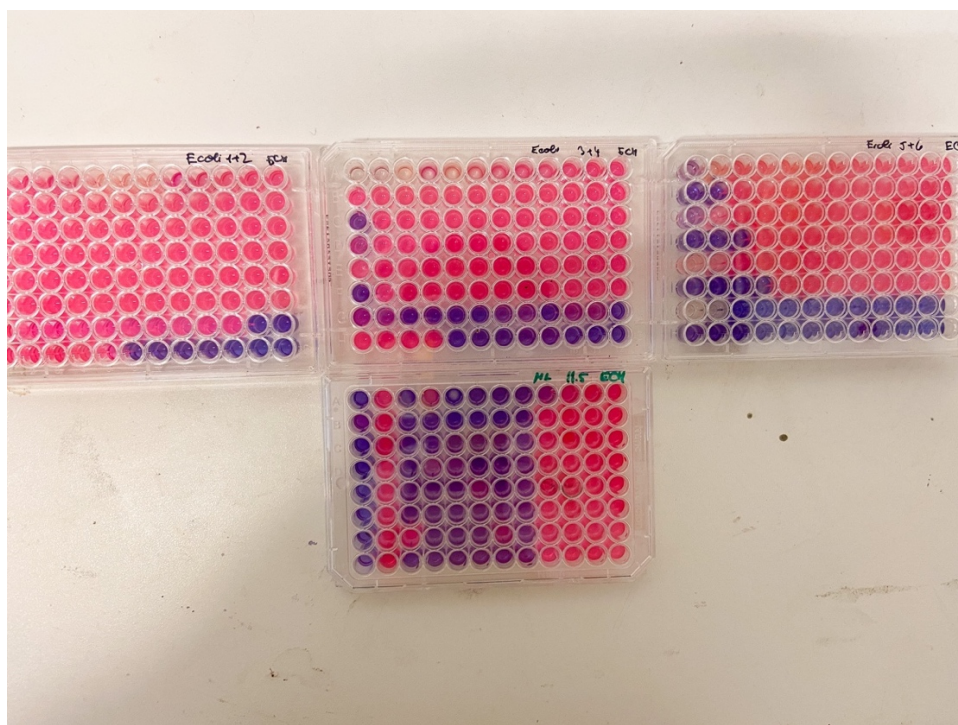
Výsledky pro další vzorku shrnují následující tabulky: Tabulka 8 Souhrnný přehled MIC u vzorků gelů Tabulka 9 Souhrnný přehled MIC u vzorků mýdel.

Tabulka 8 Souhrnný přehled MIC u vzorků gelů

mikroorganismus	MIC jednotlivých vzorků (násobek zředění)					
	Manufaktura	Balea	The Inkey list	Dermacol	Vitellaria	Vichy
ML	32x	32x	4096x	16384x	32x	64x
SM	8x	16384x	2048x	8192x	16x	32x
EC	4096x	8x	64x	1024x	32x	32x
CA	8x	8x	8x	32x	32x	8x
SE	16384x	16384x	8x	16384x	2048x	128x
CG	16x	8x	8x	8x	16x	8x

Tabulka 9 Souhrnný přehled MIC u vzorků mýdel

mikroorganismus	MIC jednotlivých vzorků (násobek zředění)					
	tekuté mýdlo z WC	Dove tuhé mýdlo	Schulke	Jelen	Protex	Green Pharmacy
ML	2048x	256x	4096x	64x	128x	64x
SM	16384x	8192x	16384x	16384x	16384x	256x
EC	16384x	32x	16384x	64x	256x	1024x
CA	8192x	16384x	16384x	64x	8x	64x
SE	16384x	16384x	16384x	8x	2048x	128x
CG	4096x	16384x	16x	64x	16x	128x



Obr. 84 Testování viability bakterie *E.coli*, a *M. luteus* pomocí resazurinového testu

Jak již bylo řečeno výše, resazurin způsobuje zbarvení obsahu jamek z modré na růžovou, podle toho, jak jsou jeho buňky metabolicky aktivní.

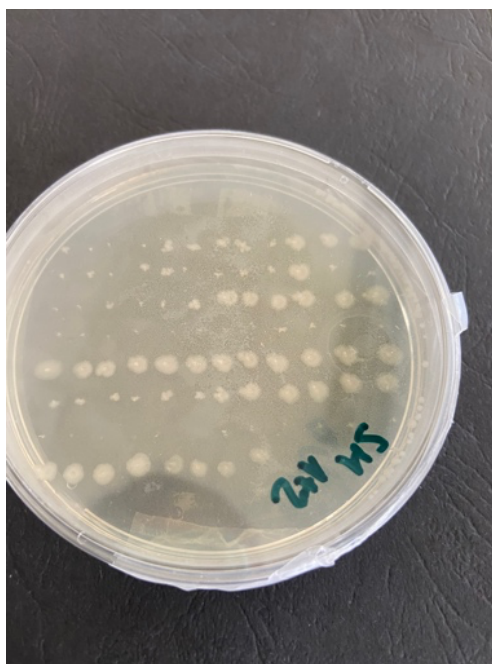
5.2 Vyhodnocení testu baktericidní účinnosti

Výsledky agarové metody ukazují, jaký byl nárůst kultury na agarových plotnách po 24 hodinách kultivace. Pro ilustraci jsou v této kapitole vloženy fotografie agarových ploten. Nejnižší baktericidní koncentrace u bakterie *Micrococcus luteus* je u vzorku tekutého mýdla z toalet. U kultury *Serratia marcescens* je to vzorek antibakteriálního mýdla Dermacol se zředěním 4096krát. V případě bakterie *Escherichia coli* je baktericidní koncentrace stejná u všech vzorků, které alespoň v nejnižším zředění bakterii usmrcují. Bakterii *Cultibacterium*

acnes jsou schopny účinně ničit pouze dezinfekce Manufaktura a Vitellaria, a to pouze v nejnižším zředění. U *Staphylococcus epidermidis* je baktericidní koncentrace nejnižší u vzorku dezinfekce Balea. V případě jediné testované kvasinky *Candida glabrata* je tato koncentrace nejnižší hned u čtyřech vzorků, a to Vitellaria, Dove tuhé mýdlo, Jelen tuhé mýdlo a Green Pharmacy tuhé mýdlo.

Tabulka 10 Výsledky agarové diluční metody

vzorek	Baktericidní koncentrace pro jednotlivé MO (násobek zředění vzorku)					
	ML	SM	EC	CA	SE	CG
Manufaktura gel	-	8x	-	8x	8x	8x
Balea gel	-	8x	-	-	16x	-
The Inkey list	-	128x	8x	-	-	-
Dermacol mýdlo	8x	4096x	8x	-	8x	8x
Vitellaria gel	8x	8x	8x	8x	8x	16x
Vichy gel	-	-	8x	-	8x	-
tekuté mýdlo z WC	256x	64x	8x	-	8x	8x
Dove tuhé mýdlo	128x	128x	-	-	8x	16x
Jelen tuhé mýdlo	32x	8x	8x	-	8x	16x
Protex tuhé mýdlo	16x	-	8x	-	8x	-
Green Pharmacy tuhé mýdlo	8x	64x	8x	-	8x	16x



Obr. 85 Příklad testování pomocí agarové plotnové metody na bakterii *Serratia marcescens* – tekuté mýdlo z WC, Dove tuhé mýdlo

6 ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce bylo ověření antimikrobiální aktivity běžně dostupných dezinfekčních přípravků na ruce, čistících gelů na obličej a víceúčelových mýdel. K měření byly použity dvě metody. Nejprve byla zvolena bujónová diluční metoda, v rámci, které byl proveden také test metabolické aktivity s barvivem resazurin. Druhou použitou metodou byla agarová metoda, při které byla stanovena minimální baktericidní koncentrace vzorků.

Prostřednictvím bujónové diluční metody bylo zjištěno, že růst bakterie *Micrococcus luteus* je z testovaných vzorků nejlépe potlačován dezinfekčním prostředkem antibakteriální mýdlo Dermacol, který vykazoval stabilní antimikrobiální výsledky při všech ředěních (8-16384krát). I při vysokých zředěních se růst bakterie pohyboval v rozmezí 16–35 %. Nejlepších výsledků při nízkém ředění (8 a 16krát) dosahuje dezinfekce Vitellaria, která nárůst *Micrococcus luteus* inhibuje na 0 až 11 %. Pokud jde o testovaná mýdla, největší antimikrobiální aktivitu prokázal vzorek tekutého mýdla Schulke, který spolehlivě potlačuje růst kultury do 4,5 % (do zředění 4 096krát). Dobré výsledky prokázal i vzorek mýdla odebraného na toaletách fakulty, které umožňuje bakteriím narůst na maximálně 14 % (do zředění 1 024krát).

V případě bakterie *Serratia marcescens* byl nejlepší antimikrobiální účinek prokázán u vzorku antibakteriálního mýdla Dermacol, kdy nárůst činil 4,48 % a tekutého mýdla Schulke, které stabilně inhibuje růst do 10 % (oba vzorky do zředění 4096krát).

Pokud jde o bakterii *Escherichia coli*, tak nejlépe byl její růst potlačen dezinfekcí značky Manufaktura, která účinně inhibuje růst bakterie tak, že je její nárůst do 0,5 % (do zředění 2048krát). Toto naředění je hodnotou MIC pro uvedený dezinfekční prostředek, jelikož následně bakteriální kultura prudce narůstá. U vzorků mýdel nebyla prokázána srovnatelná antimikrobiální účinnost.

U bakterie *Cultibacterium acnes* nebyl prokázán významný antibakteriální účinek u žádné z testovaných dezinfekcí. Dezinfekce, které alespoň v malé míře inhibují růst bakterie jsou Vichy a Vitellaria, ale pouze při nejnižším ředění. Z mýdel byl nejlepší účinek zaznamenán u tuhého mýdla Dove, při jehož použití růst bakterie lineárně narůstá od 0 do 50 % v závislosti na zředění vzorku.

V případě bakterie *Staphylococcus epidermidis* opět prokázal velmi dobrý antimikrobiální účinek vzorek antibakteriálního mýdla Dermacol, který udržuje její nárůst do 10 % (do zředění 8192krát). Z mýdel nejlépe potlačuje její růst mýdlo Schulke, a to do 14 % (do zředění 4096krát).

Proti kvasince *Candida glabrata* nebyl prokázán znatelný antimikrobiální účinek u žádného z testovaných vzorků.

Viabilita kultury, která byla detekována pomocí barviva resazurin, se u všech testovaných mikroorganismů pohybuje v relativně vysokých hodnotách, a to i při nízkém zředění. Nejvyšší viabilitu ze všech testovaných mikroorganismů bez ohledu na zředění vzorku prokázala kvasinka *Candida glabrata*. Podrobné výsledky jsou znázorněny na grafech v praktické části práce.

Pokud jde o agarovou diluční metodu, tak nejvyšší baktericidní účinek vykazovalo antibakteriální mýdlo Dermacol, jehož baktericidní koncentrace je při zředění 4096krát, a to vůči bakterii *Serratia marcescens*. Následuje bakterie *Micrococcus luteus*, u níž je minimální baktericidní koncentrace u vzorku tekutého mýdla z toalet, a to při zředění 256krát. Pokud jde o bakterii

Escherichia coli, tak minimální baktericidní koncentrace je stejná u téměř všech vzorků, a to při zředění 8krát. U vzorků Manufaktura, Balea a Dove tuhého mýdla nebyla minimální baktericidní koncentrace v použitém rozsahu ředění zaznamenána. Bakterii *Cultibacterium acnes* jsou schopny usmrcovat pouze dezinfekce Manufaktura a Vitellaria, a to při ředění 8krát. U *Staphylococcus epidermidis* je baktericidní koncentrace nejnižší u vzorku dezinfekce Balea, a to při zředění 16krát. Pro kvasinku *Candida glabrata* byla změřena minimální baktericidní koncentrace stejná u čtyř vzorků - Vitellaria, Dove tuhé mýdlo, Jelen tuhé mýdlo a Green Pharmacy tuhé mýdlo.

Předložená práce prokázala, že účinek dezinfekčních prostředků dostupných v běžné obchodní síti se může značně lišit jak s ohledem na typ cílového organismu, tak zejména s ohledem na kvalitu výrobků a obsah a typ antimikrobiální složky. Jako nejúčinnější se ukázaly preparáty s obsahem syntetického prostředku Cocamidopropyl Betain a detergentu Sodium Laureth Sulfate, zatímco přípravky s ethanolem (i o vyšší koncentraci) podobnou účinnost nevykazovaly. Dosažené výsledky mohou pomoci při výběru dezinfekčních prostředků pro denní použití, které dokážou zamezit přenosu bakteriální infekce.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] LLOYD, Karen, Andrew STEEN, Joshua LADAU, Junqi YIN, Lonnie CROSBY a Josh NEUFELD. Phylogenetically Novel Uncultured Microbial Cells Dominate Earth Microbiomes. *mSystems* [online]. 2018, **3**(5) [cit. 2021-07-18]. ISSN 2379-5077. Dostupné z: doi:10.1128/mSystems.00055-18
- [2] BIGGERS, Alana. *Gram-positive bacteria* [online]. [cit. 2020-11-21]. Dostupné z: <https://www.healthline.com/health/gram-positive#summary>
- [3] ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ, J. *Grampozitivní bakterie a gramnegativní* [online]. VŠCHT Praha [cit. 2020-11-21].
- [4] BARNETT, J., Roger PAYNE a David YARROW. *Yeasts: characteristics and identification*. 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2000. ISBN 05-215-7396-3.
- [5] ZULKOWSKI, Karen. *Skin Bacteria* [online]. 2013, **26**(5), 231-236 [cit. 2021-03-14]. ISSN 1527-7941. Dostupné z: doi:10.1097/01.ASW.0000428953.13223.fa
- [6] GRICE, Elizabeth a Julia SEGRE. The skin microbiome. *Nature Reviews Microbiology* [online]. 2011, **9**(4), 244-253 [cit. 2021-03-14]. ISSN 1740-1526. Dostupné z: doi:10.1038/nrmicro2537
- [7] DRÉNO, B., S. PÉCASTAINGS, S. CORVEC, S. VERALDI, A. KHAMMARI a C. ROQUES. Cutibacterium acnes (Propionibacterium acnes) and acne vulgaris: a brief look at the latest updates. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* [online]. 2018, **32**, 5-14 [cit. 2021-03-14]. ISSN 09269959. Dostupné z: doi:10.1111/jdv.15043
- [8] ZAENGLEIN, Andrea, Arun PATHY, Bethanee SCHLOSSER et al. Guidelines of care for the management of acne vulgaris. *Journal of the American Academy of Dermatology* [online]. 2016, **74**(5), 945-97333 [cit. 2021-03-14]. ISSN 01909622. Dostupné z: doi:10.1016/j.jaad.2015.12.037
- [9] VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie - vyšetřovací metody*. Brno: Neptun, c2010. ISBN 978-80-86850-04-.
- [10] KOHOUTOVÁ, Jarmila. Klimatizace - zdravotní rizika a prevence [online]. 2008 [cit. 2021-7-28]. Dostupné z: https://www.internimedicina.cz/artkey/int-200805-0007_Klimatizace-zdravotni_rizika_a_prevence.php
- [11] HORÁČEK, Jiří. *Základy lékařské mikrobiologie*. 2000. Praha: Karolinum, 2000. ISBN 80-246-0006-4.
- [12] KAPRÁLEK, František. *Fyziologie bakterií*. 1.vydání. Praha: SPN, 1986.
- [13] GUNTER, Hans. *General microbiology*. 7. Cambridge, 1993. ISBN 978-0-521-43980-0.
- [14] COWAN, Marjorie Murphy. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 1999, **12**(4), 564-582 [cit. 2021-04-10]. ISSN 1098-6618. Dostupné z: doi:10.1128/CMR.12.4.564
- [15] THORNTON SPANN, Candace, Susan TAYLOR a Jeffrey WEINBERG. Topical antimicrobial agents in dermatology. *Clinics in Dermatology* [online]. 2003, **21**(1), 70-77 [cit. 2021-04-10]. ISSN 0738081X. Dostupné z: doi:10.1016/S0738-081X(02)00320-6

- [16] HYNIE, Sixtus. *Farmakologie v kostce*. 2., přeprac. vyd. V Praze: Triton, 2001. ISBN 80-725-4181-1.
- [17] FRENCH, G. L. Bactericidal agents in the treatment of MRSA infections--the potential role of daptomycin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [online]. 2006, **58**(6), 1107-1117 [cit. 2021-03-18]. ISSN 0305-7453. Dostupné z: doi:10.1093/jac/dkl393
- [18] *Antibakteriální chemoterapeutika* [online]. In: . [cit. 2020-12-19]. Dostupné z: http://chemikalie.upol.cz/skripta/zcll/AB_chemoterapeutika.pdf
- [19] *Mechanismy účinku antimikrobiálních látek* [online]. In: . [cit. 2020-12-19]. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/1411/podzim2016/VLLM0522c/um/50564877/65690216/65922811/Mechanismy_ucinku_antimikrobiálních_látek-doplňeni_2014.pdf
- [20] VOTAVA, Miroslav. *Kultivační půdy v lékařské mikrobiologii*. Brno: Hortus, 2000. ISBN 80-238-5058-X.
- [21] JÍLEK, Petr. *Úvod do mikrobiologických vyšetřovacích metod ve zdravotnictví*. Praha: Karolinum, 2002. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 80-246-0459-0.
- [22] BEDNÁŘ, Marek. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Praha: Marvil, 1996. ISBN 80-238-0297-6.
- [23] *Spectrofotometry* [online]. 2013 [cit. 2021-07-21]. Dostupné z: <https://www.nist.gov/programs-projects/spectrophotometry>
- [24] ZÁRUBA, Kamil. *Analytická chemie*. Vydání první. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2016. ISBN 978-80-7080-950-1.
- [25] ŠTORK, Jiří. *Dermatovenerologie*. 2. vyd. Praha: Galén, 2013. ISBN 978-80-7262-898-8.
- [26] SCHLEIFER, K. a W. KLOOS. Isolation and Characterization of Staphylococci from Human Skin I. Amended Descriptions of Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus saprophyticus and Descriptions of Three New Species: Staphylococcus cohnii, Staphylococcus haemolyticus, and Staphylococcus xylosus. *International Journal of Systematic Bacteriology* [online]. 1975, **25**(1), 50-61 [cit. 2021-03-22]. ISSN 0020-7713. Dostupné z: doi:10.1099/00207713-25-1-50
- [27] MADIGAN, M. *Brock Biology of Microorganisms*. ISBN 978-0131443297.
- [28] HEJAZI, A. a F. FALKINER. Serratia marcescens. *Journal of Medical Microbiology* [online]. 1997, **46**(11), 903-912 [cit. 2021-03-22]. ISSN 0022-2615. Dostupné z: doi:10.1099/00222615-46-11-903
- [29] VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie - vyšetřovací metody*. Brno: Neptun, 2010. ISBN 978-80-86850-04-.
- [30] MARTÍNKOVÁ, Jiřina. *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*. 2., zcela přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada Publishing, 2018. ISBN 978-80-247-4157-4.
- [31] KOČMANOVÁ, Iva. *Invazivní mykotické infekce* [online]. 2014 [cit. 2021-07-18]. Dostupné z: <https://www.onkologiecs.cz/pdfs/xon/2014/04/06.pdf>
- [32] OH, Deog-Hwan a Douglas MARSHALL. Antimicrobial activity of ethanol, glycerol monolaurate or lactic acid against Listeria monocytogenes. In: *International Journal of Food Microbiology* [online]. 1993, , s. 239-246 [cit. 2020-12-20]. ISSN 01681605. Dostupné z: doi:10.1016/0168-1605(93)90168-G
- [33] WASZKIEWICZ, Napoleon. *The influence of alcohol on the oral cavity, salivary glands and saliva* [online]. [cit. 2021-04-07]. ISSN 1426-9686. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21542250/>

- [34] WILLIAMSON, Deborah, Glen CARTER a Benjamin HOWDEN. Current and Emerging Topical Antibacterials and Antiseptics: Agents, Action, and Resistance Patterns. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 2017, **30**(3), 827-860 [cit. 2021-04-13]. ISSN 0893-8512. Dostupné z: doi:10.1128/CMR.00112-16
- [35] Chlorhexidinefacts.com. *Chlorhexidin Facts* [online]. [cit. 2020-11-10]. Dostupné z: <https://www.chlorhexidinefacts.com/mechanism-of-action.html>
- [36] *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* [online]. [cit. 2021-04-07]. Dostupné z: doi:10.1002/1435
- [37] DEB, Paul-Cheadle. *A Guide to Hand-Hygiene Agents* [online]. [cit. 2021-04-13]. Dostupné z: <https://www.infectioncontroltoday.com/view/guide-hand-hygiene-agents>
- [38] ENNA, S.J. a David BYLUND. Benzoyl Peroxide. In: *XPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference* [online]. Elsevier, 2007, s. 1-2 [cit. 2020-12-20]. ISBN 9780080552323. Dostupné z: doi:10.1016/B978-008055232-3.61295-4
- [39] BLASKOVICH, Mark, Alysha ELLIOTT, Angela KAVANAGH, Soumya RAMU a Matthew COOPER. In vitro Antimicrobial Activity of Acne Drugs Against Skin-Associated Bacteria. In: *Scientific Reports* [online]. 2019, [cit. 2020-12-20]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-019-50746-4
- [40] WORRET, Wolf-Ingo a Joachim FLUHR. Acne therapy with topical benzoyl peroxide, antibiotics and azelaic acid. In: *JDDG* [online]. 2006, , s. 293-300 [cit. 2020-12-20]. ISSN 1610-0379. Dostupné z: doi:10.1111/j.1610-0387.2006.05931.x
- [41] SAHOO, Jyotirmaya a Sudhir PAIDSETTY. Antimicrobial, analgesic, antioxidant and in silico study of synthesized salicylic acid congeners and their structural interpretation. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences* [online]. 2019, **2**(4), 268-280 [cit. 2021-04-07]. ISSN 2314-808X. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejbas.2015.07.006
- [42] KANTOUCH, A., A. EL-SAYED, M. SALAMA, A. EL-KHEIR a S. MOWAFI. Salicylic acid and some of its derivatives as antibacterial agents for viscose fabric. In: *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2013, , s. 603-607 [cit. 2020-12-20]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2013.09.021
- [43] NOVÁK, Josef. *Fyzikální chemie: Bakalářský kurz*. 2005. Praha: VŠCHT, 2005. ISBN 978-80-7080-559-6.
- [44] ROTTER, M.L. European norms in hand hygiene. *Journal of Hospital Infection* [online]. 2004, **56**, 6-9 [cit. 2020-11-10]. ISSN 01956701. Dostupné z: doi:10.1016/j.jhin.2003.12.024
- [45] ČSN EN 14476: *Chemické dezinfekční přípravky a antiseptika - Kvantitativní zkouška s použitím suspenze ke stanovení virucidního účinku v oblasti zdravotnictví - Metoda zkoušení a požadavky (fáze 2 / stupeň 1)* [online]. [cit. 2021-04-13]. Dostupné z: http://www.technicke-normy-csn.cz/665217-csn-en-14476_4_95017.html
- [46] MCFARLAND, JOSEPH. THE NEPHELOMETER: AN INSTRUMENT FOR ESTIMATING THE NUMBER OF BACTERIA IN SUSPENSIONS USED FOR CALCULATING THE OPSONIC INDEX AND FOR VACCINES. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* [online]. 1907, (14) [cit. 2021-06-25]. ISSN 0098-7484. Dostupné z: doi:10.1001/jama.1907.25320140022001f

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

SLS – Sodium Laureth Sulfate

KTJ – kolonie tvořící jednotky

etOH - ethanol

E.coli – *Escherichia coli*

SM – *Serratia marcescens*

ML – *Micrococcus luteus*

CA – *Cultibacterium acnes*

CG – *Candida glabrata*

SE – *Staphylococcus epidermidis*

NB – Nutrient Broth

YPD – Yeast peptone dextrose

BHI – Brain Heart Infusion

LB – Lysogeny Broth