

Vliv teploty a znečištění na baktericidní účinnost dezinfekčních přípravků

The effect of temperature and contamination on bactericidal activity of disinfectants

Jan Urban

Souhrn • Summary

Při zjišťování vlivu teploty a znečištění na baktericidní účinnost dezinfekčních přípravků byla k testování vybrána kvantitativní suspenzní metoda pro DP používané v potravinářství, průmyslu, domácnostech a veřejných prostorech. Jedná se o ČSN EN 1276 [4], která je prvním krokem při testování baktericidní účinnosti DP v této oblasti použití (Fáze 2, Stupeň 1).

Při zjišťování vlivu teploty byly nastaveny ve zkoušce teploty 20 °C a 40 °C. Pro testování vlivu znečištění byly použity tři interferující látky, konkrétně nízké (bovinní albumin 0,3 g/l) a vyšší (bovinní albumin 3,0 g/l) znečištění a znečištění pro použití DP v mlékárenství (odstředěné mléko 10,0 g/l).

Ke stanovení baktericidní účinnosti jsme použili zástupce grampozitivních bakterií *Staphylococcus aureus* a *Enterococcus hirae* a gramnegativních bakterií *Pseudomonas aeruginosa* a *Escherichia coli*.

Výsledky zkoušek potvrdily důležitost stanovení podmínek zkoušky. Zkušební teplota a znečištění (interferující látka) mají významný vliv na stanovení baktericidní účinnosti DP.

V našem testování byl zjištěn vliv znečištění při jedné teplotě na výsledek zkoušky. U všech třech zkoušených znečištění byl vliv na délku doby působení DP a u některých testovaných bakterií i na vyšší účinné koncentrace DP. Při nízkém znečištění byla baktericidní účinnost DP nejlepší (kratší expozice a nižší koncentrace DP) a u znečištění pro oblast mlékárenství byla baktericidní účinnost naopak nejhorší (delší expozice a vyšší koncentrace DP).

To test the effect of temperature and contamination on bactericidal activity of disinfectants, the quantitative suspension test was chosen as used in the food and other industries, households, and public spaces. The test procedure is based on ČSN EN 1276 [4] and is the first step in testing bactericidal activity of disinfectants in this area of use (Phase 2, Level 1).

To test the effect of temperature, the test temperatures of 20 °C and 40 °C were selected. To test the effect of contamination, three interfering substances were used: bovine albumin at a concentration of 0.3 g/l (low contamination level), bovine albumin at a concentration of 3.0 g/l (high contamination level), and skimmed milk at a concentration of 10.0 g/l (dairy industry contamination level).

*For the purposes of bactericidal activity testing, representatives of Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus* and *Enterococcus hirae*) and Gram-negative bacteria (*Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*) were used.*

The testing results confirmed the importance of choosing adequate test conditions. Both the test temperature and contamination level (interfering substance) have a significant effect on the outcome of bactericidal activity testing of disinfectants.

At the same temperature, the contamination level was found to influence the test result. All three contamination levels tested showed an effect on the disinfectant exposure time required to achieve bactericidal activity and, for some test bacteria, on the disinfectant concentration required to achieve bactericidal activity. The disinfectants tested showed the highest bactericidal activity at a low contamination level (a shorter exposure time and a lower concentration of the disinfectant were required to achieve bactericidal activity) and the lowest bactericidal activity at the dairy industry contamination level (a longer exposure time and a higher concentration of the disinfectant were required to achieve bactericidal activity).

Zprávy CEM (SZÚ, Praha) 2019; 28(11–12): 466–468

Klíčová slova: baktericidní účinnost, interferující látka, zkušební teplota

Key words: bactericidal activity, interfering substance, test temperature

ÚVOD

Při stanovení baktericidní účinnosti dezinfekčních přípravků (DP) zjišťujeme koncentraci a dobu působení při kterých DP vykazuje baktericidní účinnost (splňuje kritéria – pokles v log řádech pro určitou zkušební metodu). Neméně důležité jsou i další 2 parametry testování, konkrétně

znečištění (interferující látka) a zkušební teplota, které mají být nastaveny tak, aby se blížily co nejvíce podmínkám prostředí, při kterých se bude DP používat.

Výběr zkušebních metod taky závisí na tom, pro jakou oblast testování je DP určen (zdravotnictví, potravinářství, veterinární péče). Zkušební metody by měly být vždy dvě, suspenzní test (fáze 2, stupeň 1) a test napodobující praktické použití DP (fáze 2, stupeň 2). Podle ČSN EN 14885 „Chemické dezinfekční přípravky a antiseptika – použití evropských norem pro chemické dezinfekční přípravky a antiseptika“ [1] jsou metody testování stanoveny pro 3 oblasti, ve kterých se DP používají, a to pro oblast zdravotnictví,

v oblasti veterinární péče a v oblasti potravinářství, průmyslu, domácnostech a veřejných prostorech.

Kvantitativní zkoušky s použitím suspenze ke stanovení baktericidního účinku chemických dezinfekčních přípravků a antiseptik mají tyto podmínky u sledovaných parametrů zkoušky.

Kvantitativní suspenzní metoda pro DP používané v oblasti zdravotnictví je ČSN EN 13727+A2 [2]. Zkušební teplota se nastavuje dle použití DP. U DP, které se používají k dezinfekci nástrojů jsou teploty v rozmezí 20 až 70 °C a DP k povrchové dezinfekci mají interval 4 až 30 °C. Znečištění (interferující látky) jsou nízké (bovinní albumin 0,3 g/l) a/nebo vyšší (bovinní albumin 3,0 g/l plus beraní erytrocyty 3,0 ml/l) znečištění.

Kvantitativní suspenzní metoda pro DP používané v oblasti veterinární péče je ČSN EN 1656 [3]. Norma udává tyto parametry: Závazná zkušební teplota je 10 °C, dodatkové teploty 4 °C, 20 °C a 40 °C, Znečištění (interferující látky) jsou nízké (bovinní albumin 3,0 g/l) a/nebo vyšší (bovinní albumin 10,0 g/l plus kvasnicový extrakt 10,0 g/l) znečištění.

Kvantitativní suspenzní metoda pro DP používané v potravinářství, průmyslu, domácnostech a veřejných prostorech je ČSN EN 1276 [4]. Norma udává tyto parametry: Závazná zkušební teplota je 20 °C, dodatkové teploty 4 °C, 10 °C, 30 °C a 40 °C, Závazné znečištění (interferující látky) jsou nízké (bovinní albumin 0,3 g/l) a/nebo vyšší (bovinní albumin 3,0 g/l) znečištění, dodatkové interferující látky jsou pro konkrétní použití DP v mlékárenství, v pivovarnictví, ve výrobě alkoholických a nealkoholických nápojů, pro čištění na místě, v kosmetické výrobě a ve farmaceutickém průmyslu.

TESTOVANÉ MIKROORGANISMY

K testování jsme použili mikroorganismy dle ČSN EN 1276 [4], ke stanovení baktericidní účinnosti zástupce grampozitivních bakterií *Staphylococcus aureus* (ATCC¹ 6538) a *Enterococcus hirae* (ATCC¹ 10541) a gramnegativních bakterií *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC¹ 15442) a *Escherichia coli* (ATCC¹ 10536).

TESTOVANÉ PŘÍPRAVKY

Pro testování jsme použili Chlorový dezinfekční přípravek. Účinná látka tohoto DP je chlornan sodný. Tento dezinfekční přípravek se používá na dezinfekci ploch a povrchů. Zkušební koncentrace přípravku byly stanoveny na 0,25 %, 0,50 %, 1 %, 2 % a 3 %.

METODY TESTOVÁNÍ

V naší studii jsme se zaměřili na testování kvantitativní suspenzní metodou pro DP používané v potravinářství, průmyslu, domácnostech a veřejných prostorech. Jedná se o ČSN EN 1276 „Kvantitativní zkouška s použitím suspenze ke stanovení baktericidního účinku chemických dezinfekčních přípravků a antiseptik“ [4]. Testování bude probíhat při dobách působení (expozicích) 5, 15, 30 a 60 minut.

Pro sledované 2 parametry zkoušky jsme si stanovili tyto limity. Pro znečištění: nízké (bovinní albumin 0,3 g/l) a vyšší

(bovinní albumin 3,0 g/l) znečištění a znečištění pro použití DP v mlékárenství (odstředěné mléko 10,0 g/l). Testované zkušební teploty byly 20 °C a 40 °C.

Při hodnocení baktericidní účinnosti DP podle kvantitativní suspenzní metody ČSN EN 1276 [4] musí dojít k poklesu počtu CFU² o 5 log řádů.

Použitá metoda je v NRL pro dezinfekci a sterilizaci akreditované ČIA³ dle ČSN EN ISO/IEC 17025:2018.

VÝSLEDKY

Přípravek při zkušební teplotě 20±1 °C vykazoval baktericidní účinnost podle ČSN EN 1276 [4] na grampozitivní bakterii *Staphylococcus aureus* při nízkém znečištění po zředění na koncentraci 2 % při době působení 15 minut a po zředění na koncentraci 3 % za 5 minut, při vyšším znečištění po zředění na koncentraci 2 % při době působení 30 minut a po zředění na koncentraci 3 % za 5 minut a při znečištění pro mlékárenství po zředění na koncentraci 2 % při době působení 60 minut a po zředění na koncentraci 3 % za 5 minut.

Přípravek při zkušební teplotě 40±1 °C vykazoval baktericidní účinnost podle ČSN EN 1276 [4] na grampozitivní bakterii *Staphylococcus aureus* při nízkém znečištění po zředění na koncentraci 1 % při době působení 15 minut a po zředění na koncentraci 2 % za 5 minut, při vyšším znečištění po zředění na koncentraci 1 % při době působení 30 minut a po zředění na koncentraci 2 % za 5 minut a při znečištění pro mlékárenství po zředění na koncentraci 1 % při době působení 60 minut, po zředění na koncentraci 2 % za 15 minut a v koncentraci 3 % za 5 minut.

Při porovnání znečištění (interferujících látek) vykazoval DP baktericidní účinnost významné rozdíly v dobách působení. Nejkratší doby znečištění byly u nízkého znečištění a nejdelší expozice mělo znečištění pro mlékárenství. Mezi zkušebními teplotami byly signifikantní rozdíly baktericidní účinnosti jak v koncentracích DP, tak v jeho dobách působení. DP vykazoval lepší účinnost při zkušební teplotě 40±1 °C.

Přípravek při zkušební teplotě 20±1 °C vykazoval baktericidní účinnost podle ČSN EN 1276 [4] na grampozitivní bakterii *Enterococcus hirae* při nízkém znečištění po zředění na koncentraci 2 % při době působení 15 minut a po zředění na koncentraci 3 % za 5 minut, při vyšším znečištění po zředění na koncentraci 2 % při době působení 30 minut a po zředění na koncentraci 3 % za 5 minut a při znečištění pro mlékárenství po zředění na koncentraci 2 % při době působení 60 minut a po zředění na koncentraci 3 % za 5 minut.

Přípravek při zkušební teplotě 40±1 °C vykazoval baktericidní účinnost podle ČSN EN 1276 [4] na grampozitivní bakterii *Enterococcus hirae* při nízkém a vyšším znečištění po zředění na koncentraci 1 % při době působení 30 minut, po zředění na koncentraci 2 % za 15 minut a v koncentraci 3 % za 5 minut a při znečištění pro mlékárenství po zředění na koncentraci 1 % při době působení 60 minut, po zředění na koncentraci 2 % za 30 minut a v koncentraci 3 % za 5 minut.

Při porovnání znečištění (interferujících látek) vykazoval DP baktericidní účinnost významné rozdíly v dobách působení. Nejkratší doby znečištění byly u nízkého znečištění a nejdelší expozice mělo znečištění pro mlékárenství. Mezi

zkušebními teplotami byly signifikantní rozdíly baktericidní účinnosti jak v koncentracích DP, tak v jeho dobách působení. DP vykazoval lepší účinnost při zkušební teplotě 40 ± 1 °C.

Přípravek při zkušební teplotě 20 ± 1 °C vykazoval baktericidní účinnost podle ČSN EN 1276 [4] na gramnegativní bakterii *Pseudomonas aeruginosa* při nízkém a vyšším znečištění po zředění na koncentraci 1 % při době působení 5 minut a při znečištění pro mlékárenství po zředění na koncentraci 1 % při době působení 30 minut a po zředění na koncentraci 2 % za 5 minut.

Přípravek při zkušební teplotě 40 ± 1 °C vykazoval baktericidní účinnost podle ČSN EN 1276 [4] na gramnegativní bakterii *Pseudomonas aeruginosa* při nízkém znečištění po zředění na koncentraci 0,25 % při době působení 60 minut, po zředění na koncentraci 0,5 % za 15 minut a po zředění na koncentraci 1 % za 5 minut, při vyšším znečištění po zředění na koncentraci 0,5 % při době působení 15 minut a po zředění na koncentraci 1 % za 5 minut a při znečištění pro mlékárenství po zředění na koncentraci 0,5 % při době působení 60 minut, po zředění na koncentraci 1 % za 15 minut a v koncentraci 2 % za 5 minut.

Při porovnání znečištění (interferujících látek) vykazoval DP baktericidní účinnost významné rozdíly v dobách působení i v koncentracích DP (při zkušební teplotě 40 ± 1 °C). Nejkratší doby znečištění byly u nízkého znečištění a nejdelší expozice mělo znečištění pro mlékárenství. Mezi zkušebními teplotami byly signifikantní rozdíly baktericidní účinnosti jak v koncentracích DP, tak v jeho dobách působení. DP vykazoval lepší účinnost při zkušební teplotě 40 ± 1 °C.

Přípravek při zkušební teplotě 20 ± 1 °C vykazoval baktericidní účinnost podle ČSN EN 1276 [4] na gramnegativní bakterii *Escherichia coli* při nízkém znečištění po zředění na koncentraci 2 % při době působení 15 minut a po zředění na koncentraci 3 % za 5 minut, při vyšším znečištění po zředění na koncentraci 2 % při době působení 30 minut a po zředění na koncentraci 3 % za 5 minut a při znečištění pro mlékárenství po zředění na koncentraci 2 % při době působení 60 minut a po zředění na koncentraci 3 % za 5 minut.

Přípravek při zkušební teplotě 40 ± 1 °C vykazoval baktericidní účinnost podle ČSN EN 1276 [4] na gramnegativní bakterii *Escherichia coli* při nízkém a vyšším znečištění po zředění na koncentraci 0,25 % při době působení 5 minut a při znečištění pro mlékárenství po zředění na koncentraci 0,5 % při době působení 15 minut a v koncentraci 1 % za 5 minut.

Při porovnání znečištění (interferujících látek) vykazoval DP baktericidní účinnost významné rozdíly v dobách působení i v koncentracích DP (při zkušební teplotě 40 ± 1 °C). Nejkratší doby znečištění byly u nízkého znečištění a nejdelší expozice mělo znečištění pro mlékárenství. Mezi zkušebními teplotami byly signifikantní rozdíly baktericidní účinnosti jak v koncentracích DP, tak v jeho dobách působení. DP vykazoval lepší účinnost při zkušební teplotě 40 ± 1 °C.

ZÁVĚR

Výsledky zkoušek potvrdili důležitost stanovení podmínek zkoušky. Zkušební teplota a znečištění (interferující látka) mají významný vliv na stanovení baktericidní účinnosti DP.

V našem testování byl zjištěn vliv znečištění při jedné teplotě na výsledek zkoušky. U všech třech zkoušených znečištění byl vliv na délku doby působení DP a u některých testovaných bakterií i na výši účinné koncentrace DP. Při nízkém znečištění byla baktericidní účinnost DP nejlepší (kratší expozice a nižší koncentrace DP) a u znečištění pro oblast mlékárenství byla baktericidní účinnost naopak nejhorší (delší expozice a vyšší koncentrace DP).

Sledování vlivu teploty na baktericidní účinnost jasně prokázalo, že se vzrůstající zkušební teplotou se zvyšuje i účinnost námi testovaného DP při jednom konkrétním znečištění. DP byl testován při teplotách 20 °C a 40 °C. Největší skok v účinnosti DP vlivem zkušební teploty byl zaznamenán u gramnegativní bakterie *Escherichia coli*.

Je důležité testovat při zkoušce všechny závazné zkušební mikroorganismy, protože i toto testování nám potvrdilo, že mohou být rozdílné výsledky mezi jednotlivými druhy bakterií i mezi zástupci gram pozitivních a gram negativních bakterií.

Testování prokázalo důležitost výběru zkoušky pro stanovení baktericidní či jiné účinnosti DP. Musí se nejdříve určit, v jaké oblasti použití se bude DP používat. V prvním kroku se provede kvantitativní suspenzní test. Pokud DP prokáže účinnost tak následuje druhý krok a provedení zkoušky napodobující praktické použití přípravku. Pro testování se využívají zkoušky dle Evropských norem, pokud EN na testování určitých mikroorganismů nebo způsobů použití DP neexistují, tak se použijí jiné dostupné metody testování. Suspenzní test i test napodobující praktické použití DP se musí provádět za stejných podmínek zkoušky, konkrétně ve stejných koncentracích, dobách působení, zkušebních teplotách, znečištěních a se stejnými zkušebními mikroorganismy. Nastavené parametry zkoušek musí co nejvíce odpovídat podmínkám praktického používání DP.

¹ATCC – American Type Culture Collection; ²CFU – Colony Forming Units; ³ČIA – Český institut pro akreditaci

LITERATURA

1. ČSN EN 14885 – Chemické dezinfekční přípravky a antiseptika – Použití evropských norem pro chemické dezinfekční přípravky a antiseptika
2. ČSN EN 13727+A2 – Chemické dezinfekční přípravky a antiseptika – Kvantitativní zkouška s použitím suspenze ke stanovení baktericidní aktivity v oblasti zdravotnictví – Metoda zkoušení a požadavky (fáze 2 / stupeň 1)
3. ČSN EN 1656 – Chemické dezinfekční přípravky a antiseptika – Kvantitativní zkouška s použitím suspenze ke stanovení baktericidního účinku chemických dezinfekčních přípravků a antiseptik používaných v oblasti veterinární péče – Metoda zkoušení a požadavky (fáze 2 / stupeň 1)
4. ČSN EN 1276 – Chemické dezinfekční přípravky a antiseptika – Kvantitativní zkouška s použitím suspenze ke stanovení baktericidního účinku chemických dezinfekčních přípravků a antiseptik používaných v potravinářství, průmyslu, domácnostech a veřejných prostorách – Metoda zkoušení a požadavky (fáze 2 / stupeň 1)

Ing. Jan Urban, Ph.D.
vedoucí Oddělení pro DDD, CEM – SZÚ