

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



**Testování citlivosti vankomycin rezistentních a
vankomycin citlivých enterokoků na vybrané
biocidy**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Martina Malíková

Vedoucí bakalářské práce: PharmDr. Ondřej Jand'ourek, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Irena Hanovcová, CSc.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2019

Poděkování

Ráda bych poděkovala své konzultantce, paní doktorce Hanovcové za trpělivost a cenné rady, dále pak paní doktorce Petře Polcarové za možnost se na tomto zajímavém úkolu podílet a za inspiraci. Svým kolegyním Kristýně Voženílkové, Aleně Solárové a Martě Bernardové za podporu a skvělou spolupráci na praktické části této práce. Chci také poděkovat zbylým členům Katedry epidemiologie Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany za jejich podporu.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala pod vedením konzultanta. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 10.5.2019

Martina Malíková

OBSAH

1. ABSTRAKT	6
2. ABSTRACT	7
3. POUŽITÉ ZKRATKY	8
4. ÚVOD	9
5. CÍL PRÁCE	10
6. TEORETICKÁ ČÁST	11
6.1 Rod <i>Enterococcus</i>	11
6.1.1 Obecná charakteristika a morfologie	11
6.1.2 Kultivace	12
6.1.3 Antigenní struktura a biochemické vlastnosti	13
6.1.4 Patogenita a patogenezé	13
6.1.5 Léčba	14
6.2 Vankomycin	14
6.3 Vankomycin-rezistentní enterokoky	15
6.3.1 Epidemiologie VRE	15
6.3.2 Původ a zdroje VRE	15
6.3.3 Rezistence k vankomycinu	16
6.3.4 Fenotyp VanA a VanB	16
6.3.5 Klinický význam VRE	17
6.4 Biocidy	18
6.4.1 Vlastnosti dezinfekčních látek	18
6.4.2 Účinnost na jednotlivé mikroorganismy	18
6.4.3 Způsoby provádění dezinfekce	19
6.4.4 Druhy chemických látek s dezinfekčním účinkem	19
6.4.5 Kontrola účinnosti dezinfekce	23
7. PRAKTICKÁ ČÁST	25

7.1 Metoda testování.....	25
7.1.1 Reagencie	25
7.1.2 Dezinfekční prostředky	26
7.1.3 Testované mikroorganismy.....	28
7.1.4 Pracovní postup.....	28
8. VÝSLEDKY.....	33
8.1 Účinné dezinfekce	33
8.2 Neúčinné dezinfekce.....	35
8.3 Dezinfekce s rozdílným účinkem.....	36
8.4 Vliv rezistence k vankomycinu na účinnost dezinfekčních prostředků	38
9. DISKUZE	39
10. ZÁVĚR.....	44
11. SEZNAM TABULEK	45
12. SEZNAM OBRÁZKŮ	46
13. POUŽITÁ LITERATURA.....	47

1. ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra lékařských a biologických věd

Studijní obor: Zdravotnická bioanalýtika

Kandidát: Martina Malíková

Vedoucí bakalářské práce: PharmDr. Ondřej Jandourek, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Irena Hanovcová, CSc.

Název bakalářské práce: Testování citlivosti vankomycin rezistentních a vankomycin citlivých enterokoků na vybrané biocidy

Vankomycin rezistentní enterokoky (VRE) patří mezi jedny z nejčastějších příčin nozokomiálních nákaz. Cílem této práce bylo určit citlivost vankomycin rezistentních a vankomycin citlivých enterokoků k vybraným biocidům, které jsou součástí dezinfekčních programů ve zdravotnických zařízeních.

Při testování účinnosti dezinfekčních prostředků jsme postupovali dle české technické normy ČSN EN 1040 – Chemické dezinfekční přípravky a antiseptika – Kvantitativní zkouška s použitím suspenze ke stanovení základního baktericidního účinku chemických dezinfekčních přípravků a antiseptik – Metoda zkoušení a požadavky (fáze 1). Použili jsme diluční metodu s neutralizátorem. Testovali jsme celkem 10 kmenů *Enterococcus faecium*.

Z 13 testovaných biocidů byly 4 zcela účinné. Jednalo se o přípravky s vyšší koncentrací aldehydů, kyselinou peroxooctovou a aktivním chlorem. U 6 dezinfekčních přípravků jsme zaznamenali rozdílnou účinnost u jednotlivých kmenů. U většiny těchto přípravků šlo o kvarterní amoniové sloučeniny, a to samostatně nebo v kombinaci s peroxidem vodíku, aldehydy nebo glukoprotaminem. Tři dezinfekční prostředky se ukázaly jako zcela neúčinné, hlavními účinnými látkami byly kvarterní amoniové sloučeniny, alkoholy a chlorhexidin.

Do skupiny neúčinných biocidů patří i nejužívanější alkoholový dezinfekční prostředek na ruce Sterillium®, což může být jedna z příčin šíření VRE prostřednictvím rukou zdravotnických pracovníků. Zvýšený výskyt VRE je hlavně na jednotkách intenzivní péče vážným problémem, je tedy potřeba přijmout taková protiepidemická opatření, která zamezí šíření VRE mezi pacienty a zdravotnickými pracovníky.

Klíčová slova: enterokoky, *Enterococcus faecium*, VRE, biocidy

2. ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Study program: Healthcare bioanalytics

Candidate: Martina Malíková

Thesis supervisor: PharmDr. Ondřej Jand'ourek, Ph.D.

Consultant: RNDr. Irena Hanovcová, CSc.

Title of bachelor thesis: Testing the sensitivity of vancomycin-resistant and vancomycin-sensitive enterococci on selected biocides

Vancomycin resistant enterococci (VRE) are one of the most common causes of nosocomial infections. The aim of this work was to determine the sensitivity of vancomycin-resistant and vancomycin-sensitive enterococci to selected biocides, which are part of disinfection programs in healthcare facilities.

When testing the effectiveness of disinfectants, we followed the Czech technical standard ČSN EN 1040 - Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative suspension test to determine the basic bactericidal effect of chemical disinfectants and antiseptics - Test method and requirements (Phase 1). We used a dilution method with a neutralizer. We tested a total of 10 *Enterococcus faecium* strains.

Four out of the 13 biocides tested were completely effective. These were agents with a higher concentration of aldehydes, with peracetic acid and active chlorine. We observed different efficacy in individual strains for six disinfectants. Most of these products were quaternary ammonium compounds, alone or in combination with hydrogen peroxide, aldehydes or glucoprotamine. Three disinfectants proved to be completely ineffective, the main active ingredients were quaternary ammonium compounds, alcohols and chlorhexidine.

Ineffective biocides include Sterillium®, the most widely used alcoholic hand disinfectant, which can be one of the causes of VRE spreading through the hands of healthcare professionals. Especially in intensive care units, the increased incidence of VRE is a serious problem, so there is a need for anti-epidemic measures to prevent the spread of VRE between patients and healthcare professionals.

Key words: enterococci, *Enterococcus faecium*, VRE, biocides

3. POUŽITÉ ZKRATKY

PYR – pyrrolidonylpeptidáza (enzym)

LAP – leucinaminopeptidáza (enzym)

GIT – gastrointestinální trakt

MIC – minimální inhibiční koncentrace

VRE – vankomycin rezistentní enterokok

VSE – vankomycin citlivý enterokok

KAS – kvarterní amoniové sloučeniny

CFU – „Colony Forming Units“, tedy počet bakterií tvořících kolonie

4. ÚVOD

Enterokoky tvoří přirozenou součást střevní mikroflóry člověka. Řadí se mezi podmíněné patogeny, přičemž nejčastěji bývají původci nozokomiálních infekcí močových či dýchacích cest, chirurgických ran, případně i krevního řečiště. Léčba těchto infekcí je velmi komplikovaná pro jejich rozsáhlou přirozenou rezistenci a v poslední době také pro jejich získanou rezistenci k vankomycinu, který je v léčbě enterokokových infekcí zpravidla považován za antibiotikum poslední volby. Infekce způsobené vankomycin rezistentními enterokoky postihují pacienty nejen na jednotkách intenzivní péče, ale i na běžných odděleních. Jejich výskyt v nemocničním prostředí přináší celou řadu komplikací z pohledu klinického, terapeutického, mikrobiologického a také finančního. Pro zamezení přenosu a šíření vankomycin rezistentních enterokoků je nezbytné zavedení vhodných protiepidemických opatření. Velmi významným opatřením je pravidelné užívání účinných dezinfekčních prostředků v rámci preventivní i represivní dezinfekce, které zabrání přenosu vankomycin rezistentních enterokoků mezi pacienty, zdravotníky i v prostředí. Jelikož jsou však vankomycin rezistentní enterokoky poměrně odolné bakterie a vykazují rezistenci k řadě chemických látek včetně některých užívaných biocidů, představuje toto opatření mnohdy praktický problém.

5. CÍL PRÁCE

Cílem práce je určit citlivost vankomycin rezistentních a vankomycin citlivých enterokoků k vybraným biocidům, které jsou součástí dezinfekčních programů ve zdravotnických zařízeních. V této práci se rovněž zabýváme porovnáním vlivu rezistence enterokoků k vankomycinu s účinností dezinfekčních prostředků.

6. TEORETICKÁ ČÁST

6.1 Rod *Enterococcus*

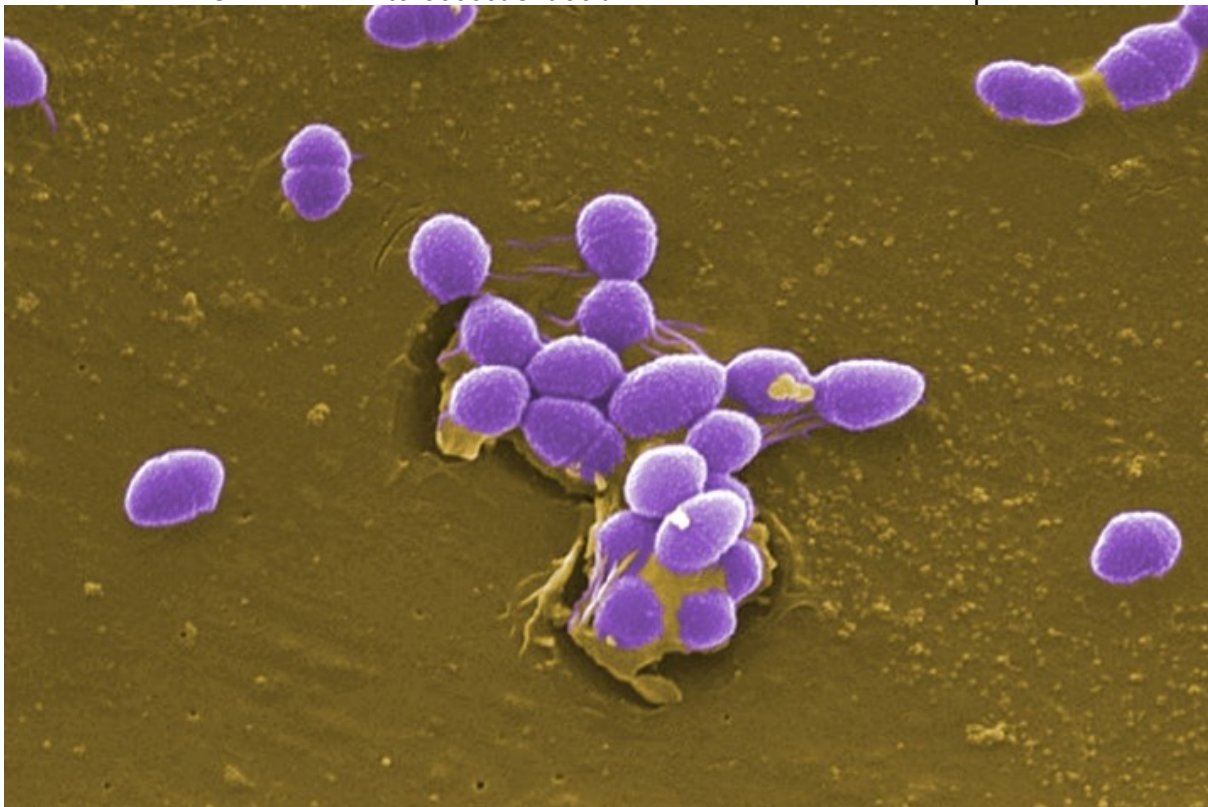
6.1.1 Obecná charakteristika a morfologie

Enterokoky patří mezi grampozitivní koky, oválného až lehce protáhlého tvaru, které jsou uspořádány ve dvojicích, krátkých řetězcích nebo drobných shlucích. Jedná se o fakultativně anaerobní bakterie, které jsou kataláza negativní. Některé kmeny mohou produkovat pseudokatalázu (Votava *et al.*, 2003).

Enterokoky jsou součástí přirozené mikroflóry gastrointestinálního traktu lidí i zvířat. Často se vyskytují v surovinách a potravinách živočišného původu, odkud se dostávají do vnějšího prostředí, ve kterém mohou díky své odolnosti vůči nepříznivým podmínkám dlouhodobě přežívat a případně se i množit (Kolář, 2018).

Přibližně 90 % enterokokových infekcí je způsobeno druhem *Enterococcus faecalis*, dalších 7 % pak vyvolává bakterie *Enterococcus faecium* (Obr. 1). Další druhy se při infekcích uplatňují jen vzácně (Votava *et al.*, 2003).

Obrázek 1 *Enterococcus faecium* v elektronovém mikroskopu



Zdroj obrázku: CDC, dostupné na: <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=12803>

6.1.2 Kultivace

Enterokoky jsou nenáročné na kultivaci, na krevním agaru rostou jako šedobílé kolonie o velikosti 1-3 mm (Obr. 2). V okolí kolonií je často vidět zóna viridace, výjimečně β -hemolýza, existují ovšem i kmeny bez hemolýzy. Některé druhy enterokoků také produkují žlutý pigment, jako například *E. casseliflavus*, *E. mundtii* a *E. flavescens*. Pohyblivé kmeny jsou *E. gallinarium*, *E. casseliflavus*, *E. flavescens*, z části pohyblivý je i *E. faecium*. Pro kultivaci enterokoků lze použít i selektivní diagnostickou půdu Slanetz-Bartley, která obsahuje azid sodný, trifenyltetrazoliumchlorid a glukózu. Enterokoky na této půdě rostou v růžových až červených koloniích (Votava *et al.*, 2003).

Obrázek 2 *Enterococcus faecium* - kultivace na krevním agaru



Zdroj obrázku:

<https://www.microbiologyinpictures.com/bacteria%20photos/enterococcus%20faecalis%20photos/enterococcus%20faecalis%2001.jpg>

6.1.3 Antigenní struktura a biochemické vlastnosti

Společným skupinovým antigenem pro enterokoky je antigen D, tedy glycerol-teichoová kyselina, která je navázána na buněčnou stěnu. Dříve tento antigen běžně sloužil k identifikaci enterokoků (Domig *et al.*, 2003). V současnosti existují přesnější způsoby identifikace založené na molekulárně-biologických metodách (Manero *et al.*, 1999). V případě druhu *Enterococcus avium* dochází také k syntéze skupinového polysacharidu, který přísluší k serologické skupině Q.

Humánní enterokoky jsou pyrrolidonylpeptidáza čili PYR-pozitivní a leucinaminopeptidáza neboli LAP-pozitivní, tedy hydrolyzují pyrrolidonyl- β -naftylamid a leucin- β -naftylamid. Rovněž hydrolyzují eskulin, a to i v přítomnosti 40 % žluči, tyto složky obsahuje žluč-eskulinový agar. Rostou na půdách, které obsahují až 6,5 % NaCl. Teplotní rozmezí pro jejich růst je 10-45 °C. Enterokoky jsou vysoce odolné, jsou schopny růstu při pH 4,8-11 a přežijí i půlhodinové zahřátí na 60 °C (Votava *et al.*, 2003).

Přežití enterokoků nebrání ani prostředí s nízkým obsahem vody, byly izolovány z výrobků ze sušeného masa, mléka a fermentovaných masných výrobků. U řady kmenů enterokoků je popisována zvýšená odolnost k některým chemickým látkám včetně dezinfekčních prostředků (např. k látkám na bázi kvarterních amoniových solí), které jsou používány ve zdravotnictví a v potravinářském průmyslu (Kolář, 2018).

6.1.4 Patogenita a patogeneze

Enterokoky neprodukují toxiny. Faktory virulence mohou být secernované produkty jako želatináza, která hydrolyzuje např. kolagen, želatinu či hemoglobin, či substance typu feromonu, která může díky vlivu na neutrofilů regulovat zánětlivou odpověď. Dalšími faktory virulence mohou být kolonizační faktory, mezi které patří agregační substance (např. fimbrie, které umožní navázání na epitelové buňky) nebo sacharidové adheziny, které zajišťují adhezenci k buňkám střeva a pochvy. Enterokoky produkují také bakteriociny, jako je např. cytolyzin, který jim usnadňuje kolonizaci sliznic pomocí inhibice růstu jiných grampozitivních bakterií.

Enterokoky se řadí mezi podmíněné patogeny a mohou způsobovat různé závažné endogenní i exogenní infekce. Enterokokové infekce se nejčastěji vyskytují v nemocničním prostředí. Většinou postihují dlouhodobě hospitalizované polymorbidní pacienty se zavedenými močovými či intravaskulárními katétry, kteří podstoupili terapii antibiotiky zpravidla s širokým spektrem účinku. Enterokoky způsobují převážně infekce močových cest, nitrobřišní infekce, ale i infekce ran či dýchacích cest. Méně

často se vyskytuje enterokoková endokarditida, která postihuje hlavně uživatele injekčních drog a starší osoby. Ojediněle mohou být enterokoky původci bakteriemií, katérových sepsí, meningitid, peritonitid, osteomyelitid, infekcí žlučových cest a gynekologických zánětů (Votava *et al.*, 2003).

První klinicky popsané úmrtí z důvodu enterokokové infekce bylo zaznamenáno již v roce 1899. Jednalo se o infekční endokarditidu způsobenou kmenem *E. faecalis*. Nemocným byl 37letý muž, který po 18 dnech od vzniku prvních klinických příznaků zemřel. O 115 let později došlo k úmrtí pacienta s febrilní neutropenií, kdy infekci vyvolal vankomycin rezistentní kmen *E. faecium* (Kolář, 2018).

6.1.5 Léčba

Enterokoky jsou přirozeně rezistentní k řadě antibiotik, zejména k beta-laktamům (penicilinům a cefalosporinům všech generací), dále k linkosamidům, kyselině nalidixové, případně i k nízkým hladinám klindamycinu a aminoglykosidů. Přirozená rezistence se mírně liší mezi jednotlivými druhy enterokoků, tudíž vhodnou léčbu je třeba stanovit na základě výsledků testování citlivosti na antibiotika. Citlivé bývají enterokoky zpravidla k ampicilinu, gentamicinu a vankomycinu (Hollenbeck *et al.*, 2012).

V případě lehčích infekcí močového traktu se doporučuje použít ampicilin nebo aminopeniciliny s inhibitory bakteriálních beta-laktamáz jako je kyselina klavulanová nebo sulbaktam (Votava *et al.*, 2003; Kolář, 2018). Zejména u infekcí způsobených druhem *E. faecalis*, který má zpravidla dobrou citlivost k aminopenicilinům, je ampicilin považován za lék volby. Avšak u kmene *E. faecium* došlo od druhé poloviny 70. let minulého století k výraznému zvýšení minimální inhibiční koncentrace (MIC) ampicilinu (ze 4 na 64 mg/l). Během dalšího desetiletí se rozšířil fenotyp s vysokou rezistencí k ampicilinu (MIC > 128 mg/l) (Galloway-Peña *et al.*, 2009). K léčbě infekcí, které byly způsobeny těmito ampicilin-rezistentní kmeny se začaly používat glykopeptidy, konkrétně tedy vankomycin a teikoplanin (Kolář, 2018). V léčbě raných infekcí, abdominálních sepsí, urosepsí a endokarditid lze aplikovat kombinaci aminoglykosidů s penicilinem, ampicilinem nebo již zmiňované glykopeptidy vankomycin a teikoplanin (Votava *et al.*, 2003).

6.2 Vankomycin

Vankomycin se řadí mezi glykopeptidová antibiotika a používá se při léčbě infekcí způsobovaných grampozitivními bakteriemi. Na světový trh byl uveden v 50.

letech a jeho původní indikací byla léčba infekcí způsobených bakterií *Staphylococcus aureus* rezistentní k penicilinu. O třicet let později došlo k významnému nárůstu užívání vankomycinu zejména z důvodu šíření methicilin rezistentní mutanty *S. aureus* (MRSA). V současnosti je indikován pro léčbu závažných, mnohdy život ohrožujících infekcí, způsobených grampozitivními bakteriemi včetně enterokoků, které nejsou citlivé k jiným méně toxickým antibiotikům (Levine, 2006).

Účinek vankomycinu spočívá v jeho navázání se na C-terminální konec D-alanyl-D-alaninový zbytek pentapeptidu buněčné stěny grampozitivních bakterií, čímž inhibuje její syntézu. Vankomycin nepůsobí na gramnegativní bakterie (Cetinkaya *et al.*, 2000).

6.3 Vankomycin-rezistentní enterokoky

6.3.1 Epidemiologie VRE

K první izolaci vankomycin rezistentního enterokoka (VRE) došlo v Evropě v roce 1986, v USA pak o rok později. Následně se tyto kmeny rychle rozšířily po nemocnicích celého světa a zařadily se tak mezi nejvýznamnější světové nozokomiální patogeny (O'Driscoll *et al.*, 2015). V Evropě je nejvyšší procento enterokoků rezistentních k vankomycinu na Kypru, v Irsku, Litvě, Rumunsku či sousedním Slovensku (ECDC, EARS-Net., 2017). V České republice došlo k prvnímu záchytu VRE v roce 1997 na Hemato-onkologické klinice Fakultní nemocnice Olomouc (Kolář, 2018). V současnosti se vyskytují i v dalších českých nemocnicích včetně Fakultní nemocnice v Hradci Králové (dosud nepublikovaná data). Počet vankomycin-rezistentních kmenů *Enterococcus faecium* se v ČR pohybuje v rozmezí 4,4–11,5 %. Tyto hodnoty udávají pouze počet vankomycin-rezistentních kmenů zachycených v izolátech z krve, neukazují tedy celkovou prevalenci VRE v komunitní i nemocniční populaci, včetně nosičství v GIT, ani výskyt VRE u zvířat (SZÚ, EARS-Net, 2018).

6.3.2 Původ a zdroje VRE

VRE v Evropě pravděpodobně pocházejí z chovů hospodářských zvířat, kterým byl podáván avoparcin, což je glykopeptidové antibiotikum a jehož používání bylo v roce 1997 v Evropě zakázáno. U zvířat, kterým byl avoparcin aplikován, byl zaznamenán vyšší záchyt VRE, po zákazu jeho používání se četnost výskytu VRE u zvířat i u lidí snížila. Obecně je užívání antibiotik jako růstových stimulátorů v Evropské unii zakázáno, protože mimo jiné mohou tyto přípravky způsobovat vznik zkrřížené

rezistence jako právě u vankomycinu a růstového stimulantu avoparcinu (Bager *et al.*, 1997; Klare *et al.*, 1999; O'Driscoll *et al.*, 2015; Acar *et al.*, 2000).

Hospodářská zvířata, u nichž jsou enterokoky součástí střevní mikrobioty, tak představují jeden z možných primárních zdrojů VRE. K přenosu dochází buď přímým kontaktem s infikovaným zvířetem nebo kontaminací potravinového řetězce, a to cestou potravin živočišného původu. Dalšími zdroji pak mohou být lidé s kolonizací VRE v gastrointestinálním traktu (GIT), která je mnohdy asymptomatická, případně pacienti se symptomatickou infekcí (močových cest, ran, dýchacích cest atd.). Původ těchto VRE může být jak endogenní, po působení selektivního tlaku pacientem užívaných antibiotik s následným přerůstáním VRE, či exogenní, kdy došlo k přenosu VRE mezi pacienty, případně došlo k přenosu na pacienta z rukou nemocničního personálu, zdravotnických pomůcek či prostředí (Kolář, 2018; Harbarth *et al.*, 2002; Bonten *et al.*, 2001).

6.3.3 Rezistence k vankomycinu

Enterokoky, ať již k vankomycinu citlivé nebo rezistentní, disponují vedle přirozené rezistence k mnoha antimikrobním přípravkům také mechanismy rezistence získané. Jelikož mají poměrně tvárný genom, mohou rezistenci (včetně rezistence k vankomycinu) získat transferem plazmidů či transpozonů z rezistentní bakterie na citlivou. Tyto geny rezistence pak mohou šířit dále, a to i na jiné bakteriální kmeny. V roce 2002 byl popsán případ, kdy došlo k přenosu genu vankomycinové rezistence z VRE na bakterii *S. aureus* rezistentní k methicilinu (MRSA) za vzniku vankomycin rezistentního kmene *S. aureus* (VRSA) (Weigel *et al.*, 2003).

Rezistenci enterokoků k vankomycinu můžeme klasifikovat dvěma způsoby, a to buď fenotypově nebo genotypově. Do současnosti bylo popsáno devět genů pro rod *Enterococcus*, které v různé míře zajišťují rezistenci k vankomycinu a teikoplaninu a určují jednotlivé fenotypy. Jedná se o geny *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE*, *vanG*, *vanL*, *vanM* a *vanN*, čemuž odpovídají příslušné fenotypy (VanA, VanB apod.) (O'Driscoll *et al.*, 2015). Rezistence k vankomycinu u VRE vychází ze změny terminální struktury D-alanyl-D-alanyl v peptidoglykanu na D-alanyl-D-laktát nebo D-alanyl-D-serin (Reynolds *et al.*, 2005).

6.3.4 Fenotyp VanA a VanB

U lidí bývají nejčastěji izolovány fenotypy VanA a VanB. Fenotyp VanA je nejrozšířenější. Je podmíněný strukturou D-alanyl-D-laktát na základě genu *vanA*,

který je v plazmidu velmi často umístěn na transpozonu Tn1546 a který se může šířit jednak mezi jednotlivými kmeny enterokoků, tak i z enterokoků na stafylokoky. Fenotyp VanA je rezistentní jak k vankomycinu, tak k teikoplaninu. Klinicky významný je rovněž fenotyp VanB, který je kódován genem *vanB* lokalizovaným na transpozonech Tn5382 a Tn1547, jež jsou součástí chromozomu s rezistencí k vankomycinu, ovšem zachovalou citlivostí k teikoplaninu, které se zpravidla šíří pouze mezi kmeny enterokoků. Byl však již popsán i enterokok s fenotypem VanB, který byl k teikoplaninu rezistentní. Typické MIC vankomycinu a teikoplaninu u VanA a VanB enterokoků zobrazuje Tabulka 1.

Tabulka 1 Minimální inhibiční koncentrace u VanA a VanB enterokoků

Glykopeptid	MIC (mg/l)	
	VanA	VanB
Vankomycin	64-1024	4-1024
Teikoplanin	8-512	0,06-1

Zdroj dat: EUCAST - dostupné na:

http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/NRLs/atb/EUCAS/UCAS/Detekce_mechanismu_rezistence.pdf

K šíření této nebezpečné rezistence dochází přenosem genů, které se nacházejí v mobilních genetických elementech. U fenotypu VanA a VanB existuje možnost přenosu rezistence nejen mezi enterokoky, ale také na jiné patogeny jako např. methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*. Nejrozšířenějším typem VRE je fenotyp VanA. U tohoto fenotypu pak jde o vysokou inducibilní rezistenci k vankomycinu a teikoplaninu. (Kolář, 2018).

6.3.5 Klinický význam VRE

VRE, stejně jako enterokoky citlivé k vankomycinu, mohou způsobit řadu infekcí. Jedná se převážně o nákazy nozokomiální, které postihují zejména oslabené, dlouhodobě hospitalizované pacienty. Léčba závažných infekcí způsobených VRE představuje významný problém, jelikož výběr vhodných antibiotik je značně omezený. Lékem volby je především novější antibiotikum linezolid uvedené do praxe v roce 2000. Vedle klinických a terapeutických komplikací představuje výskyt VRE v nemocničním prostředí také problém z pohledu finančně náročného managementu. K zamezení jejich přenosu a dalšímu šíření je třeba zavádět vhodná hygienická a protiepidemická opatření, mezi která se řadí zejména izolace pacientů a správně prováděná preventivní i represivní dezinfekce včetně důkladné dezinfekce rukou

zdravotnického personálu. Jelikož některé kmeny enterokoků vykazují odolnost proti řadě dezinfekčních prostředků, je důležité pro správné provedení dezinfekce vybírat nejvhodnější a nejúčinnější přípravky (Kolář, 2018)

6.4 Biocidy

6.4.1 Vlastnosti dezinfekčních látek

Biocidy jsou přípravky skládající se z jedné nebo více účinných látek určené k ničení, odpuzování a zneškodňování jakéhokoliv škodlivého organismu a k zabránění jeho působení jiným než jen pouhým fyzickým nebo mechanickým působením (SZÚ, 2015). Do této skupiny látek patří i dezinfekční prostředky, které se používají k chemické dezinfekci, kdy dochází ke specifickému působení chemických látek na mikroorganismy v prostředí. Účinnost dezinfekčních prostředků závisí hlavně na jejich koncentraci a době působení. Vliv může mít i druh a množství mikrobů, ale také teplota a ochranný vliv prostředí. (Votava, 2005) Pro výběr vhodného dezinfekčního prostředku je nutné zohlednit také jeho toxické a ekotoxické vlastnosti. Užívané chemické látky se liší mechanismem účinku na mikroorganismy a také rozsahem jejich působení na původce infekčních onemocnění. Tyto látky často ovlivňují metabolismus mikroorganismů, a to včetně enzymů, proto jsou obecně označovány za protoplazmatické jedy (Melicharčíková, 2015).

6.4.2 Účinnost na jednotlivé mikroorganismy

Odolnost jednotlivých mikrobů se liší podle druhu použité dezinfekční látky. Vegetativní formy běžných bakterií a kvasinek jsou poměrně citlivé. Gramnegativní bakterie jsou odolné vůči cyklickým sloučeninám a také povrchově aktivním látkám. Vhodné jsou naopak alkoholy, těžké kovy, některé organické kyseliny a nejvíce pak alkálie. V případě grampozitivních bakterií patří mezi ty odolnější stafylokoky a enterokoky. Výrazně odolné jsou mykobakterie, na které nepůsobí dezinfekční látky snižující povrchové napětí nebo sloučeniny těžkých kovů. Účinné jsou deriváty fenolu, aldehydy, oxidační činidla a halogeny. Vysoce odolné jsou bakteriální spory, na které lze použít alkylační činidla, silné kyseliny a alkálie, při delší době působení a ve vysoké koncentraci účinkují i oxidační činidla a halogeny. Obalené viry jsou citlivé ke všem dezinfekčním látkám, viry bez obalu jsou naopak více rezistentní. Mezi virucidní látky patří oxidační činidla, halogeny, aldehydy, koncentrované kyseliny a louhy. V případě mikroskopických vláknitých hub jsou účinné oxidační látky, halogeny, aldehydy a také kvarterní amoniové sloučeniny (Votava, 2005).

6.4.3 Způsoby provádění dezinfekce

Nejběžnějšími způsoby je ponoření dezinfikovaného předmětu na stanovenou dobu do dezinfekčního roztoku, otření ploch dezinfekčním roztokem, kdy je potřeba dodržet dobu působení, nebo postřik hrubšími kapénkami dezinfekčního roztoku pomocí rozprašovače, zde je podmínkou, aby dezinfikovaná plocha byla úplně smočená. Používají se také dezinfekční aerosoly ve formě disperzních kapének v plynné fázi. Jejich výhodou je, že mohou zasáhnout jak mikroby ve vzduchu, tak i ty, které ulpěly na povrchu předmětů. Na vodorovné a svislé větší plochy lze použít dezinfekční pěnu, která se aplikuje pomocí pěnotvorného zařízení (Melicharčíková, 2015).

6.4.4 Druhy chemických látek s dezinfekčním účinkem

Dezinfekční přípravky se dělí podle chemické struktury účinné látky. Podle použití se pak rozdělují na přípravky k dezinfekci ploch, povrchů, zdravotnických prostředků, pokožky a rukou, pro použití v potravinářství a pro speciální použití.

Hydroxidy a jiné alkálie

Dezinfekční účinek hydroxidů závisí na koncentraci OH^- iontů, tedy nejúčinnější jsou roztoky s pH vyšším než 12. Přidávají se i k jiným dezinfekcím, protože jejich antimikrobiální účinek není ovlivněn přítomností organických látek. Do této skupiny patří **hydroxid sodný** (1–6% koncentrace při vyšší teplotě), **hydroxid draselný**, **hydroxid vápenatý** (tzv. vápenné mléko, používá se k dezinfekci žump a to v 10–20% koncentraci) a **uhličitan sodný** (2% koncentrace, expozice 10–15 min).

Kyseliny a některé jejich soli

Mikrocidní účinek závisí na koncentraci vodíkových iontů, aniontů, dále se uplatňují celé nedisociované molekuly, oxidační schopnosti, povrchová aktivita a dehydratační vlastnosti. U anorganických kyselin je klíčová hodnota pH, u organických kyselin se jedná o oxidační schopnosti. Sporocidní účinky pak mají některé peroxosloučeniny. **Anorganické kyseliny** mají dráždivé a korozivní účinky, proto je jejich využití k dezinfekci značně omezené. Patří sem např. kyselina chlorovodíková (hrubá dezinfekce, 2,5–15% koncentrace), kyselina dusičná (hrubá dezinfekce, 2% koncentrace), kyselina sírová (hrubá dezinfekce, 5% koncentrace) a kyselina boritá (antiseptikum, 1–4% koncentrace v očních kapkách, 3–20% koncentrace v mastích a zásypech, 3% borová voda). **Organické kyseliny** se častěji používají jako konzervanty a antiseptika. V potravinářském průmyslu se jako konzervanty používají kyselina sorbová, octová, citronová a benzoová. Farmaceutický a kosmetický průmysl

používá parabeny a jejich soli (mají baktericidní a fungicidní účinek) a kyselinu mravenčí (3% koncentrace). Pro léčebné účely se využívají kyselina propionová (antimykotikum), kyselina undecylenová (antimykotikum), kyselina mléčná (vaginální výplachy, v aerosolu i povrchová dezinfekce). Poslední skupinou kyselin jsou **organické peroxokyseliny**, sem patří peroxosloučeniny I. a II. generace, např. Persteril (kyselina peroxooctová).

Oxidační prostředky

Tyto látky odštěpují kyslík ve stavu zrodu, kromě dezinfekčního účinku mají i deodorační účinek. Jejich účinnost je v přítomnosti organických látek snížena. Způsobují inaktivaci bakteriálních enzymů a oxidačně štěpí substance nutné pro život buňky. Synergicky k jejich účinku působí těžké kovy (stříbro, zinek). Do této skupiny řadíme **ozon** (baktericidní, sporicidní, fungicidní, virucidní a protozoocidní účinek, hlavně k dezinfekci vody), **peroxid vodíku** (baktericidní, virucidní, používá se jako antiseptikum v 0,5-3% koncentraci) a **manganistan draselný** (baktericidní, fungicidní a virucidní, vodný 0,3% roztok se používá ke kloktání a ošetření ran).

Halogeny

Působením halogenů dochází v buňce k oxidačním procesům účinkem kyslíku ve stavu zrodu, vznikají tak halogenní sloučeniny, které jsou pro buňku toxické. Optimální pH pro nejlepší dezinfekční účinek se pohybuje v rozmezí 5-8, účinnost se snižuje v přítomnosti organických látek. Mezi **chlorové preparáty** se řadí chlor (vysoce jedovatý plyn, dezinfekce pitné vody a vod odpadních, účinek klesá při pH 10 a v přítomnosti organických látek), chlornany (např. chlornan sodný – baktericidní, fungicidní a virucidní), chloraminy (baktericidní, fungicidní, virucidní a také tuberkulocidní, účinnost klesá v alkalickém pH a v přítomnosti bílkovin, hlavně dezinfekce vody), deriváty kyseliny izokyanurové (baktericidní, fungicidní, virucidní, tuberkulocidní, účinnost klesá v přítomnosti organických látek) a chlordioxid (dezinfekce vody, účinný vůči legionelám). Další skupinou jsou **jodové preparáty**, které jsou významnými antiseptiky. Jsou poměrně toxické a mohou také vyvolávat alergické reakce. Jsou baktericidní, fungicidní, virucidní a jejich účinnost klesá v organicky znečištěném prostředí. Patří sem Lugolův roztok, jodová tinktura a jodofory (např. jodovaný povidon, tyto sloučeniny jsou méně toxické a méně alergizující). Do skupiny **bromových preparátů** patří bromová voda (používá se k dezinfekci lázeňských zařízení), bromové tablety (dezinfekce vody v bazénech) a bronopol (konzervant v kosmetických produktech). Poslední skupinou jsou **fluorové**

preparáty, které jsou nejreaktivnější a nejtoxičtější. Anorganické sloučeniny fluoru mají silný dezinfekční účinek a užívají se jako antimykotika a konzervanty. Organické sloučeniny fluoru jsou výsledkem chemické syntézy, v přírodě se nevyskytují. Působí antimykoticky a virucidně.

Sloučeniny kovu

Tyto sloučeniny lépe působí na gramnegativní než grampozitivní mikroby, naopak na spory mikrobů, mykobakterie, některé plísně a enteroviry nemají vliv. Těžké kovy způsobují koagulaci bílkovin a inaktivaci enzymů, příčinou je navázání kovu na sulfhydrylové skupiny. Tento účinek je snižován při nižších teplotách a v prostředí s organickými látkami. Anorganické soli těžkých kovů mohou vyvolat alergické reakce a jsou pro člověka značně toxické. Používají se při dezinfekci vody, přípravě roztoků či masťových základů. Mezi **sloučeniny rtuti**, které mají bakteriostatický účinek, řadíme chlorid rtuťnatý a organické sloučeniny rtuti, které jsou méně toxické. Chlorid, jodid, oxid a amidochlorid rtuťnatý se dříve používaly v očním a kožním lékařství, dnes již jen výjimečně. **Sloučeniny stříbra** mají bakteriostatický až baktericidní a fungicidní účinek, používají se k dezinfekci vody a také jako antiseptikum. Jedná se hlavně o dusičnan stříbrný, mléčnan, citronan a octan stříbra a Sagen® (komplexní chlorid sodnostříbrný). **Sloučeniny mědi** působí baktericidně a fungicidně, používají se jako technické konzervanty ve farmaceutickém průmyslu a také k dezinfekci plaveckých bazénů. Poslední skupinou jsou **sloučeniny cínu**, které lze v kombinaci s formaldehydem a kvarterními amoniovými sloučeninami použít k povrchové dezinfekci. Mají baktericidní a fungicidní účinky.

Alkoholy a étery

Jejich dezinfekční účinek závisí na molekulové hmotnosti a na délce řetězce, tedy čím delší je řetězec, tím je účinnost vyšší. Ke zvýšení dezinfekčního účinku se kombinují s jinými dezinfekčními prostředky. Lze je použít k dezinfekci pokožky a malých ploch, které nelze zvlhčit vodou. Působí baktericidně, fungicidně a částečně virucidně. Jejich dezinfekční účinek je založen na schopnosti koagulovat a denaturovat bílkoviny. Antimikrobiálně však působí pouze v kombinaci s vodou, jejich koncentrované roztoky jsou neúčinné. Ethanol je nejúčinnější jako 70% vodný roztok. Alkoholy navíc rozpouští tukové látky. Nejčastěji se používá **ethanol, propanol, 2-propanol, 1-propanol, triethylglykol a ethylglykoly**.

Aldehydy

Aldehydy se často kombinují s jinými dezinfekčními prostředky a detergenty. Mechanismem účinku jsou redukční a alkylační vlastnosti radikálů, aldehydy reagují s $-NH_2$ a $-OH$ skupinami bílkovin a nukleových kyselin, čímž dochází k inaktivaci buněčných enzymů. Prvním z této skupiny je **formaldehyd**, který je dráždivý pro kůži, na oči působí leptavě a má toxické účinky. Má baktericidní, fungicidní a virucidní účinek. Ve formě par se používal k prostorové dezinfekci, byl užíván i ve formě roztoku k dezinfekci nástrojů. Pro své toxické účinky bylo od jeho užívání upuštěno a nyní se používá pouze při formaldehydové sterilizaci, kdy je odstraňován mnohonásobnými proplachy vodou a vzduchem. Nahradil ho **paraformaldehyd**. Druhým zástupcem je **glutaraldehyd**, který má baktericidní, fungicidní, virucidní a sporicidní účinky. Používá se k plošné dezinfekci a dezinfekci nástrojů, a to spolu s glykoly, kvarterními amoniiovými sloučeninami, případně detergenty.

Aromatické sloučeniny

Tyto sloučeniny jsou baktericidní, gramnegativní mikroby jsou vůči nim odolnější než grampozitivní. Působí také fungicidně, většinou nemají virucidní účinek. Jejich účinnost stoupá se zvyšující se teplotou a také ve směsi s anorganickými solemi. V kyselém prostředí jsou účinnější než v zásaditém. Naopak v přítomnosti organických látek jejich dezinfekční účinek klesá. Cyklické sloučeniny způsobují inaktivaci enzymů a koagulaci protoplazmy, vznikají pak nerozpustné albumináty po adsorpci na buněčnou stěnu, pak dochází k rozpuštění lipidů a proniknutí do buňky. V současné době se užívá hlavně **chlorhexidin**, který se používá jako antiseptikum a pro dezinfekci povrchů. Působí baktericidně a fungicidně a přítomnost organických látek jeho účinnost výrazně snižují. Chlorhexidin je součástí kombinovaných dezinfekčních přípravků, kde působí jako hlavní účinná složka. Tyto přípravky jsou doporučeny k dezinfekci pokožky, krytí ran a krytí vstupů centrálních katetrů.

Povrchově aktivní látky – tenzidy

Tenzidy se vážou na buněčné bílkoviny, buněčnou stěnu a protoplazmatickou membránu čímž narušují propustnost těchto systémů a inaktivaci enzymů. Díky svým vlastnostem mohou po aplikaci na kůži vytvářet film, pod kterým by mohly některé mikroorganismy přežít, proto je nelze samostatně používat jako bezpečný dezinfekční prostředek na pokožku. K dezinfekci se používají hlavně **kvarterní amoniové sloučeniny (KAS)**, mezi které patří např. benzalkonium chlorid a cetylpyridinium chlorid. Jsou velmi účinné na grampozitivní bakterie a mikroskopické

houby, méně účinné jsou na gramnegativní bakterie. Na spory bakterií působí sporostaticky, nemají virucidní účinek a na mykobakterie také nepůsobí. Používají se jako antiseptika a ve formě tinktury také k dezinfekci pokožky. Obsahují je také kombinované dezinfekční prostředky na pokožku, plochy a povrchy.

Kombinované sloučeniny

Tyto dezinfekční prostředky jsou směsí různých chemických látek, kdy je využito jejich synergického působení a lze je použít v nižší koncentraci při zachování dezinfekčního účinku. Výhodou pak je, že přípravky mají nižší toxicitu a dráždivost a jsou šetrnější k životnímu prostředí i k dezinfikovaným materiálům. Kombinují se např. aldehydy (glutaraldehyd) a glykoly s kvarterními amoniovými sloučeninami a tenzidy, takové přípravky pak mají i čistící a mycí vlastnosti.

Nové látky

Mezi nové přípravky patří **glukoprotamin**, který má baktericidní, fungicidní, tuberkulocidní, mykobaktericidní účinek. Působí také na obalené lipofilní viry, je tedy částečně virucidní. Usmrcuje také vajíčka roztočů a zákožky svrabové. Nedráždí ani nealergizuje. Užívá se k dezinfekci nástrojů i ploch. Další novou chemickou látkou je **oktenidin dihydrochlorid**, ten působí baktericidně, fungicidně a virucidně. Tato sloučenina rozrušuje buněčnou stěnu bakterií a váže se na lipidy. Používá se na kůži i na sliznice, není toxický ani karcinogenní, nedráždí a nevyvolává alergie (Melicharčíková, 2015).

6.4.5 Kontrola účinnosti dezinfekce

Účinnost dezinfekce se kontroluje metodami chemickými, mikrobiologickými a také se provádí kontrola mikrobiální kontaminace dezinfikovaných předmětů.

Chemickými metodami lze zjistit, zda byla dezinfekce provedena a jakým přípravkem, lze tedy stanovit, jestli dezinfekční roztok obsahuje dostatečnou koncentraci účinné látky.

Mikrobiologickými metodami se ověřuje skutečná účinnost dezinfekčního roztoku. Používá se suspenzní metoda, kdy se připraví suspenze 10^7 – 10^8 mikrobů/ml a přidá se určité množství dezinfekčního roztoku a po určené expozici se tento roztok vyočkuje a kultivuje. Zjišťuje se koncentrace roztoku a doba expozice, při kterých již nedošlo k nárůstu mikrobů.

Pro kontrolu mikrobiální kontaminace dezinfikovaných předmětů se provedou stěry dezinfikované plochy o rozměru 10x10 cm, tyto stěry se pak vytřepou do vhodného kultivačního média. Optimální je, pokud toto médium inaktivuje případné

zbytky dezinfekčního prostředku. Touto metodou se zjišťuje, zda došlo k usmrcení mikrobů na povrchu dezinfikovaných předmětů (Votava, 2005).

7. PRAKTICKÁ ČÁST

7.1 Metoda testování

Při testování účinnosti dezinfekčních prostředků jsme postupovali dle české technické normy ČSN EN 1040 – Chemické dezinfekční přípravky a antiseptika – Kvantitativní zkouška s použitím suspenze ke stanovení základního baktericidního účinku chemických dezinfekčních přípravků a antiseptik – Metoda zkoušení a požadavky (fáze 1). Tato norma obsahuje dva postupy testování, a to diluční metodu s použitím neutralizátoru a metodu membránové filtrace. Zvolili jsme diluční metodu, při zavádění této metody jsme provedli drobné úpravy pracovního postupu.

7.1.1 Reagencie

Destilovaná voda

Používali jsme destilovanou vodu z úpravny vody metodou reverzní osmózy od firmy Goro (Brandýs nad Labem, Česká republika). Destilovanou vodu jsme sterilizovali při 121°C po dobu 15 minut.

Neutralizátor

Vzhledem k širokému spektru chemických látek v testovaných dezinfekčních přípravcích jsme museli vyzkoušet více neutralizátorů. Pro každou dezinfekci a každý neutralizátor jsme provedli test v duplikátu. Vyzkoušeli jsme thiosíran sodný, 5% vaječný žloutek ve sterilní destilované vodě a fosfátový pufr (Tab. 2). Dezinfekční účinek všech vybraných přípravků potlačil pouze 5% vaječný žloutek.

Tabulka 2 Testování neutralizátorů

Název dezinfekce	Fosfátový pufr		5% vaječný žloutek		Thiosíran sodný	
	1. plotna	2. plotna	1. plotna	2. plotna	1. plotna	2. plotna
Desam® OX	-	-	+	+	-	-
Helipur® H plus N	-	-	+	+	+	+
Hexaquart® Forte	-	-	+	+	-	-
Chirosan® Plus	-	-	+	+	+	+
Incidin® Active	-	-	+	+	+	+
Incidin® Liquid spray	+	+	+	+	+	+
Melsept® SF	-	-	+	+	-	-
ProCura Klorsept	-	-	+	+	+	+
Skinsept® Mucosa	-	-	+	+	-	-
Stabimed® Fresh	+	+	+	+	-	-
Sterillium®	+	+	+	+	+	+
Chloramin® T	-	-	+	+	+	+
Incidin® Extra	-	-	+	+	-	-

Vysvětlivky: pozitivní výsledek (+) – neutralizátor účinkoval a potlačil působení dezinfekčního prostředek; negativní výsledek (-) – neutralizátor neúčinkuje, dezinfekční prostředek eliminoval všechny bakterie

Diluent

Jako diluent jsme použili fyziologický roztok, který jsme také sterilizovali při 121°C po dobu 15 minut.

7.1.2 Dezinfekční prostředky

Většina testovaných dezinfekčních prostředků byla v koncentrované formě, tři přípravky byly určeny k přímému použití. Základní koncentraci jsme volili dle informací od výrobců o baktericidním účinku (Tab. 3). Testovali jsme přípravky od firmy Anti-Germ CZ s.r.o. (Brno, Česká republika) - ProCura Klorsept, od firmy B. Braun (Melsungen, Německo) - Helipur® H plus N, Hexaquart® Forte, Melsept® SF, Stabimed® Fresh, od firmy BODE Chemie GmbH (Hamburg, Německo) - Sterillium®, od Bochemie (Bohumín, Česká republika) - Desam® OX, Chirozan® Plus, Chloramin® T, od firmy Ecolab (Saint Paul, Minnesota, USA) - Incidin® Active, Incidin® Liquid spray, Skinsept® Mucosa, Incidin® Extra.

Tabulka 3 Seznam testovaných dezinfekčních prostředků

Název dezinfekce	Druh chemické látky s dezinfekčním působením	Použitá základní baktericidní koncentrace	Použití
Desam® OX	peroxid vodíku, KAS	1% roztok	zdravotnické povrchy a prostředky
Helipur® H plus N	aldehydy, alkoholy	6% roztok	zdravotnické nástroje
Hexaquart® Forte	KAS	0,5% roztok	zdravotnické povrchy
Chirozan® Plus	kyseliny peroxooctová	2% roztok	zdravotnické povrchy a prostředky, nástroje
Incidin® Active	kyselina peroxooctová	1% roztok	zdravotnické povrchy a plochy
Incidin® Liquid spray	alkohol	k přímému použití bez ředění	zdravotnické povrchy a prostředky
Melsept® SF	aldehydy, KAS	0,5% roztok	zdravotnické povrchy a prostředky
ProCura Klorsept	natrium troklosen	2% roztok	zdravotnické povrchy a plochy
Skinsept® Mucosa	chlorhexidin, alkohol, peroxid vodíku	k přímému použití bez ředění	sliznice
Stabimed® Fresh	alkalický alkylamin	0,5% roztok	zdravotnické nástroje
Sterillium®	alkohol	k přímému použití bez ředění	dezinfekce rukou
Chloramin® T	tosylchloramid sodný	3% roztok	zdravotnické povrchy a plochy
Incidin® Extra	KAS, glukoprotamin	3% roztok	zdravotnické povrchy a plochy

Vysvětlivky: KAS = kvartetní amoniové sloučeniny

V Tabulce 4 uvádíme podrobnosti o chemickém složení jednotlivých přípravků včetně procentuálního zastoupení všech uvedených složek.

Tabulka 4 Chemické složení testovaných dezinfekčních prostředků

Název dezinfekce	Chemické složení dezinfekčního prostředku
Desam® OX	Peroxid vodíku (11 %), Alkyl (C12-16) dimethylbenzylamonium chlorid (2,8 %), Didecyldimethylamonium-chlorid (2 %), [Guanidin; N,N'-1,3-propandiylbis-, N-kokoalkylderiváty, diacetáty] (< 5 %), Alkoholy C9-11 etoxylované (< 5 %), 2-propanol (1,4 %)
Helipur® H plus N	Glutaraldehyd (< 15 %), Alkyletherkarboxylová kyselina (< 15 %), 2-propanol (< 10 %), Polyglykoether mastného alkoholu (< 10 %), (R)-p-Mentha-1,8-dien (< 0,25 %)
Hexaquart® Forte	(Kvarterní sloučeniny čpavku, benzyl-C12-16-alkyldimetyl, chloridy] (20 %), didecyl-dimetyl-amoniumchlorid (7,9 %), Trinatrium-nitritotriacetát (< 5 %), 2-propanol (< 5 %), Laurylamin - etoxylovaný (< 5 %)
Chirosan® Plus	Peruhličitan sodný (≤ 50 %), Kyselina citronová (< 15 %), [(1-Hydroxyethyliden) bisfosfonová kyselina, sodná sůl] (< 5 %), Uhličitan draselný (< 1 %)
Incidin® Active	Peruhličitan sodný (≤ 50 %), Kyselina citronová (< 20 %), Alkálie (< 10 %), Uhličitan sodný (< 5 %), Alkylethoxypropoxyláty (< 2,5 %), Rozpouštědla/aditiva (< 2,5 %)
Incidin® Liquid spray	2-Propanol (< 50 %), 1-Propanol (< 30 %)
Melsept® SF	[Alkoholy, C9-13-iso, etoxylované] (< 15 %), Didecyl-dimethyl-amoniumchlorid (7,5 %), 2-Propanol (< 5 %), Glutaraldehyd (4,5 %), Glyoxal (3,2 %), (R)-p-Mentha-1,8-dien (< 1 %)
ProCura Klorsept	Natrium-3,5-dichlor-2,4,6-trioxo-1,3,5-triazinan-1-id (dichlorisokyanurát sodný, natrium troklosen) (40 - 60 %), Adipová kyselina (10-30 %)
Skinsept® Mucosa	Ethanol (< 10 %), Peroxid vodíku (1,4 %), [N,N-bis(4-chlorfenyl)-3,12-diimin-2,4,11,13-tetraazatetradekandiimidamid (triviální název chlorhexidin), diglukonát] (< 0,5 %)
Stabimed® Fresh	Polyglykoether mastného alkoholu (15-30 %), Laurylpropylendiamin (20 %), 1-Propanol (5-15 %), (Reakční směs (2S)-alaninu, N, N-bis (karboxymetyl)-, trisodné soli a (2R)-alaninu, N, N-bis (karboxymetyl)-, trisodné soli ve vodě] (< 5 %)
Sterillium®	2-Propanol (30-50 %), 1-Propanol (30-50 %), Tetradekanol (< 1 %), Ethyl(hexadecyl)dimethylamonium-ethyl-sulfát (< 0,25 %)
Chloramin® T	(N-Chlor-4-methylbenzen-1-sulfonamid, sodná sůl (81 %))
Incidin® Extra	Alkyldimethylbenzylamoniumchlorid (10-20 %), Etoxylované alkoholy mastných kyselin (5-7 %), N,N'-didecyl-N'-methyl(polyoxyethyl)amoniumpropionát (1-5 %), Propan-2-ol (1-5 %)

Vysvětlivky: U každé složky je v závorce uvedeno procentuální zastoupení dané složky v přípravku

Protože během testování dochází k naředění dezinfekčního roztoku, bylo potřeba základní koncentraci navýšit 1,25krát, abychom eliminovali vliv naředění na účinnost. Od každého přípravku jsme si pak připravili tři koncentrace: 1 – účinná, 1:1 – intermediární a 1:10 – neúčinná. Všechny pracovní koncentrace jsme připravili

naředěním sterilní destilovanou vodou vždy těsně před samotným testováním. Tyto roztoky je třeba spotřebovat do 2 hodin od naředění.

7.1.3 Testované mikroorganismy

Všechny testované mikroorganismy byly určeny v mikrobiologické laboratoři Fakultní nemocnici Hradec Králové a Fakultní nemocnici Olomouc jako druh *Enterococcus faecium* a byla stanovena jejich citlivost na antibiotika. Testovali jsme 5 kmenů vankomycin rezistentních (3 kmeny VanA a 2 kmeny VanB) a 5 kmenů vankomycin citlivých enterokoků. Tyto kmeny pocházely od pacientů Fakultní nemocnice Hradec Králové a Fakultní nemocnici Olomouc.

Z kryozkumavek jsme testované kmeny vyočkovali na komerčně vyráběné krevní agary Columbia agar s ovčí krví (Oxoid, United Kingdom). Na plotnu jsme umístili také antibiotický disk s vankomycinem, abychom ověřili citlivost nebo rezistenci. Inkubace probíhala 24 hodin při 37°C. První subkulturu jsme přeočkovali včetně vankomycinového disku a znovu inkubovali 24 hodin při 37°C. Pro přípravu suspenze jsme pak použili až druhou subkulturu.

7.1.4 Pracovní postup

Všechny níže uvedené pracovní postupy jsme prováděli při teplotě 20°C. Abychom zajistili dostatečné promíchání všech složek, použili jsme vortex pro jednu zkumavku. Doba expozice byla dle normy 5 minut.

Příprava suspenze „N“

Suspenzi jsme připravovali ve zkumavce do 10 ml fyziologického roztoku. Kličkou jsme postupně nabírali kolonie, které jsme na stěně zkumavky pečlivě rozetřeli a pak kličkou spojili s fyziologickým roztokem. Po promíchání jsme pomocí densitometru změřili stupeň zákalu dle McFarlanda. Dle normy by počet bakterií měl být $1,5 \times 10^8 - 5 \times 10^8$ CFU/ml, což v našem případě odpovídalo 2,00–2,50 stupně McFarlanda. Po dosažení potřebného zákalu jsme suspenzi desítkovým ředěním postupně naředili na počítatelné koncentrace 10^2 CFU/ml a 10^1 CFU/ml. Obě suspenze jsme pak v duplikátu vyočkovali na krevní agary, na každou plotnu po 1 ml a nechali inkubovat při 37°C po dobu 20–24 hodin.

Příprava validační suspenze „Nv“

Validační suspenzi jsme připravovali stejným postupem jako testovací suspenzi. Byla zapotřebí jen jedna koncentrace suspenze, a to 10^1 CFU/ml, kterou

jsme rovněž vyočkovali po 1 ml v duplikátu na krevní agary a nechali inkubovat při 37°C po dobu 20–24 hodin.

Test „Na“ – stanovení baktericidní koncentrace

Toto stanovení jsme prováděli dvojmo, tedy se suspenzí 10² a se suspenzí 10¹. Tento postup se pak opakuje pro všechny tři koncentrace testovaného dezinfekčního přípravku.

Do první zkumavky jsme napipetovali 0,5 ml destilované vody a 0,5 ml suspenze, promíchali jsme a 2 minuty nechali stát. Pak jsme přidali 4 ml dezinfekčního prostředku, promíchali jsme a nechali působit po dobu doporučené expozice, tedy 5 minut. Po uplynutí této doby jsme po promíchání z první zkumavky odebrali 0,5 ml směsi a napipetovali jsme ji do druhé zkumavky, kam jsme pak přidali 4 ml neutralizátoru. Opět jsme promíchali a nechali působit 5 minut. Poté jsme vyočkovali po 1 ml směsi na dva krevní agary a nechali inkubovat při 37°C po dobu 20–24 hodin.

Kontrola experimentálních podmínek „A“

Tímto postupem jsme ověřovali, jestli nedochází k ovlivnění stanovení experimentálními podmínkami.

Do zkumavky jsme k 0,5 ml destilované vody přidali 0,5 ml validační suspenze, promíchali jsme, po 2 minutách jsme přidali 4 ml destilované vody, znovu jsme promíchali a nechali působit 5 minut. Pak jsme opět promíchali a po 1 ml směsi vyočkovali na dva krevní agary, které jsme inkubovali při 37°C po dobu 20–24 hodin.

Kontrola toxicity neutralizátoru „B“

Tato kontrola je určena pro ověření, zda neutralizátor nemá toxický vliv na testované bakterie.

Do zkumavky jsme napipetovali 0,5 ml destilované vody, 4 ml neutralizátoru a 0,5 ml validační suspenze, promíchali jsme a po 5 minutách jsme vyočkovali po 1 ml na dva krevní agary, které jsme inkubovali při 37°C po dobu 20–24 hodin.

Validace metody „C“

Tímto postupem jsme ověřili, jestli neutralizátor eliminuje účinek dezinfekční látky, tedy jestli je naše metoda správná.

V první zkumavce jsme smíchali 0,5 ml fyziologického roztoku, 0,5 ml destilované vody a 4 ml dezinfekčního přípravku (nejvyšší koncentrace), promíchali jsme a nechali působit 5 minut. Pak jsme odebrali z první zkumavky 0,5 ml směsi a přenesli do druhé zkumavky, kam jsme přidali 4 ml neutralizátoru, po promíchání jsme nechali působit dalších 5 minut. Poté jsme přidali 0,5 ml validační suspenze, znovu

jsme promíchali a nechali působit 30 minut. Pak jsme vyočkovali po 1 ml v duplikátu na krevní agary a inkubovali 20–24 hodin.

Počítání kolonií

Po 24 hodinách inkubace jsme spočítali kolonie na plotnách a dali jsme je znovu inkubovat na dalších 24 hodin. Pak jsme je znovu spočítali, do výpočtů jsme použili eventuální vyšší počty. Limit pro počet kolonií je 15–300, přípustná je odchylka 10 %, tedy 14–330 kolonií na 1 ml. Pokud jsou počty vyšší, zapisuje se >330, pokud je počet nižší <14.

Zpracování dat a výpočty

Veškeré výpočty u této metody vycházejí z počtu narostlých kolonií v 1 ml vzorku, a to u testované suspenze „N“ a validační suspenze „Nv“.

Výpočet „N“

„N“ udává počet buněk na 1 ml testované suspenze. Použijí se počty kolonií z obou ředění suspenzí, tedy 10^2 a 10^1 CFU/ml.

$$N = \frac{C}{(n_1 + 0,1n_2)10^{-6}}$$

C – součet hodnot, tedy počtů kolonií z vyočkovaných suspenzí

n_1 – počet hodnot, které jsme zahrnuli do C u suspenze 10^1 CFU/ml

n_2 – počet hodnot, které jsme zahrnuli do C u suspenze 10^2 CFU/ml

10^{-6} – faktor zředění, který odpovídá nižšímu zředění

Hodnoty „N“ by se měly pohybovat v rozmezí $1,5 \times 10^8$ až $5,0 \times 10^8$ CFU/ml.

Výpočet „N₀“

Tato hodnota udává počet buněk v 1 ml na začátku testování, tedy v čase 0 a zohledňuje naředění suspenze destilovanou vodou a testovaným dezinfekčním přípravkem.

$$N_0 = \frac{N}{10}$$

Limit pro tuto hodnotu je tedy 10x nižší než pro „N“ – $1,5 \times 10^7$ až $5,0 \times 10^7$ CFU/ml.

Výpočet „Na“

„Na“ vyjadřuje počet přeživších bakterií v 1 ml po uplynutí doby expozice a použití neutralizátoru.

$$Na = \frac{10c}{n}$$

c – součet hodnot, tedy počtů přeživších kolonií

n – počet hodnot, které jsme zahrnuli výpočtu

Výpočet redukce bakterií „R“

Redukce bakterií je vyjádřena pomocí dekadického logaritmu, který udává, o kolik řádů se snížil počet bakterií.

$$\log R = \log N_0 - \log Na$$

Dezinfekční látka je tedy účinná, pokud dojde ke snížení počtu bakterií o více než 5 řádů, tedy hodnota $\log R \geq 5$. Pokud je hodnota $\log R < 5$ je dezinfekce neúčinná.

Výpočet „Nv“

„Nv“ udává počet buněk v 1 ml validační suspenze, jejíž koncentrace je 10^1 CFU/ml.

$$Nv = \frac{10c}{n}$$

Limit pro „Nv“ je v rozmezí $3,0 \times 10^2$ až $1,6 \times 10^3$ CFU/ml.

Výpočet „Nv₀“

Tato hodnota udává počet buněk v 1 ml na začátku testování, tedy v čase 0 a zohledňuje naředění suspenze destilovanou vodou a testovaným dezinfekčním přípravkem.

$$Nv_0 = \frac{c}{n}$$

Hodnoty „Nv₀“ by se měly pohybovat v rozmezí 30–160, což odpovídá $3,0 \times 10^1$ až $1,6 \times 10^2$ CFU/ml.

Výpočet „A“, „B“ a „C“

Hodnoty „A“, „B“ a „C“ vyjadřují počet přeživších bakterií v závislosti na experimentálních podmínkách (A), vlivu možné toxicity neutralizátoru (B) a v samotné validaci metody (C).

$$A, B, C = \frac{c}{n}$$

c – součet hodnot, tedy počtů přeživších kolonií

n – počet hodnot, které jsme zahrnuli do výpočtu

Hodnoty těchto kontrol by měly být $\geq N_{v0} \times 0,5$.

8. VÝSLEDKY

Celkem jsme otestovali citlivost 10 kmenů *Enterococcus faecium* k 13 dezinfekčním prostředkům s různými účinnými látkami. 5 kmenů bylo vankomycin citlivých (VSE), kmeny č. 1–5 a 5 kmenů bylo vankomycin rezistentních (VRE), kmeny č. 1–5. Kmeny VRE1, 2 a 4 měly fenotyp VanA a VRE 3 a 5 pak fenotyp VanB. Po výpočtech redukce počtu životaschopných bakterií jsme si dezinfekce rozdělili do tří skupin: účinné dezinfekce, neúčinné dezinfekce a dezinfekce s rozdílným účinkem u jednotlivých kmenů. Uvádíme rovněž výsledky kontrol experimentálních podmínek („A“), toxicity neutralizátoru („B“) a validace metody („C“).

8.1 Účinné dezinfekce

Účinné dezinfekce měly $\log R \geq 5$, těchto hodnot dosáhly u všech testovaných kmenů 4 dezinfekční přípravky (Tab. 5). Helipur® H plus N je kombinovaným dezinfekčním prostředkem, který se používá k dezinfekci nástrojů. Jeho hlavní účinnou složkou je baktericidní glutaraldehyd, a to ve vyšší koncentraci než například u přípravku Melsept® SF, který se ukázal být neúčinným. Kromě kmene VSE3 jsou všechny hodnoty redukce bakterií vyšší než $\log R = 6$. V případě Chirošanu® Plus a Incidinu® Active je účinnou látkou kyselina peroxooctová, její koncentrace je u obou přípravků shodná, což odpovídá i velmi podobným hodnotám redukce bakterií (výjimkou je nižší hodnota VSE2 u Incidinu® Active). Chirosan® Plus se používá k dezinfekci zdravotnických povrchů a prostředků a také na nástroje. Incidin® Active lze aplikovat na zdravotnické povrchy a plochy. Posledním byl Chloramin® T, který obsahuje 25 % aktivního chlóru a používá se na zdravotnické povrchy a plochy. Tento dezinfekční prostředek je vysoce účinný a dosáhl nejlepších výsledků u všech kmenů.

Tabulka 5 Účinné dezinfekce

Dezinfekční prostředek	Hodnoty log R									
	vankomycin rezistentní					vankomycin citlivé				
	VRE1	VRE2	VRE3	VRE4	VRE5	VSE1	VSE2	VSE3	VSE4	VSE5
	vanA	vanA	vanB	vanA	vanB					
Helipur® H plus N	>7,38	>6,04	>7,48	>7,52	>7,48	>7,65	>6,79	5,36	>6,85	>6,09
Chirosan® Plus	>7,27	>7,51	>7,44	>7,51	>7,44	>7,44	>7,41	>7,58	>7,51	>7,49
Incidin® Active	>7,24	>7,40	>7,39	>7,58	>7,56	5,11	>7,42	>7,65	>7,42	>7,54
Chloramin® T	>7,38	>7,21	>7,51	>7,48	>7,48	>6,74	>7,43	>7,57	>7,46	>7,49

Výsledky kontrolních suspenzí vycházely z počtu přeživších bakterií (c/n), jejichž hodnota měla být vyšší nebo rovna poloviční hodnotě validační suspenze v čase nula ($N_{v0} \times 0,5$). U všech kontrolních suspenzí byla tato podmínka splněna (Tab. 6 a Tab. 7).

Tabulka 6 Výsledky kontrol u vankomycin rezistentních enterokoků - účinné dezinfekce

Dezinfekční prostředek	kontrola	VRE1		VRE2		VRE3		VRE4		VRE5	
		$\frac{c}{n}$	$N_{v0} \times 0,5$	$\frac{c}{n}$	$N_{v0} \times 0,5$	$\frac{c}{n}$	$N_{v0} \times 0,5$	$\frac{c}{n}$	$N_{v0} \times 0,5$	$\frac{c}{n}$	$N_{v0} \times 0,5$
Helipur® H plus N	A	110,5	13,50	24,5	16,00	24,0	16,00	262,5	16,00	16,5	16,25
	B	>330	13,50	89,0	16,00	179,5	16,00	>330	16,00	152,0	16,25
	C	>330	13,50	17,0	16,00	16,0	16,00	17,0	16,00	17,5	16,25
Chirosan® Plus	A	101,0	11,75	21,0	20,00	28,0	15,25	28,0	16,50	29,5	15,75
	B	>330	11,75	99,5	20,00	153,0	15,25	153,0	16,50	164,0	15,75
	C	14,0	11,75	19,0	20,00	18,0	15,25	17,5	16,50	16,5	15,75
Incidin® Active	A	101,0	8,75	17,5	13,25	34,5	16,00	298,5	18,75	21,5	19,00
	B	>330	8,75	27,0	13,25	>330	16,00	>330	18,75	166,5	19,00
	C	15,0	8,75	26,5	13,25	321,0	16,00	>330	18,75	124,5	19,00
Chloramin® T	A	91,5	10,25	12,0	9,25	123,5	15,75	123,5	14,75	20,0	17,00
	B	297,0	10,25	22,5	9,25	>330	15,75	>330	14,75	233,0	17,00
	C	19,0	10,25	11,0	9,25	19,5	15,75	15,5	14,75	18,5	17,00

Tabulka 7 Výsledky kontrol u vankomycin citlivých enterokoků - účinné dezinfekce

Dezinfekční prostředek	kontrola	VSE1		VSE2		VSE3		VSE4		VSE5	
		$\frac{c}{n}$	$N_{v0} \times 0,5$	$\frac{c}{n}$	$N_{v0} \times 0,5$	$\frac{c}{n}$	$N_{v0} \times 0,5$	$\frac{c}{n}$	$N_{v0} \times 0,5$	$\frac{c}{n}$	$N_{v0} \times 0,5$
Helipur® H plus N	A	22,5	21,00	18,0	17,75	157,0	21,50	27,5	16,00	36,5	16,25
	B	56,0	21,00	35,5	17,75	>330	21,50	201,0	16,00	199,5	16,25
	C	23,0	21,00	21,0	17,75	22,0	21,50	16,5	16,00	17,5	16,25
Chirosan® Plus	A	19,0	15,50	16,5	16,00	203,0	21,25	28,0	16,00	21,5	15,25
	B	40,5	15,50	35,0	16,00	>330	21,25	191,5	16,00	196,0	15,25
	C	17,5	15,50	20,0	16,00	22,5	21,25	17,0	16,00	16,5	15,25
Incidin® Active	A	13,0	11,00	16,5	15,00	148,5	24,00	16,0	16,00	26,0	17,25
	B	39,0	11,00	35,0	15,00	>330	24,00	154,5	16,00	171,0	17,25
	C	36,0	11,00	38,5	15,00	>330	24,00	175,5	16,00	180,5	17,25
Chloramin® T	A	16,0	14,00	17,5	15,25	190,0	25,00	18,0	16,00	25,5	17,00
	B	42,0	14,00	46,0	15,25	>330	25,00	100,0	16,00	110,5	17,00
	C	15,5	14,00	16,5	15,25	26,5	25,00	18,5	16,00	18,5	17,00

8.2 Neúčinné dezinfekce

Celkem 3 dezinfekce se ukázaly jako zcela neúčinné (Tab. 8). Melsept® SF je kombinovaný dezinfekční prostředek s hlavní složkou glutaraldehyd, jejíž koncentrace je 3x nižší než u účinného Helipuru® H plus N. Melsept® SF se používá na zdravotnické povrchy a plochy. V případě přípravku Skinsept® Mucosa jsme provedli testování pouze u 6 kmenů, a to z důvodu malého množství této dezinfekce. Tento dezinfekční prostředek obsahuje chlorhexidin, který se používá spíše k dezinfekci povrchů, pokožky a také ke krytí ran či krytí vstupů centrálních katetrů. Sterillium® je velmi rozšířený přípravek na dezinfekci rukou zdravotnických pracovníků s obsahem především 2-propanolu a 1-propanolu.

Tabulka 8 Neúčinné dezinfekce

Dezinfekční prostředek	Hodnoty log R									
	vankomycin rezistentní					vankomycin citlivé				
	VRE1 vanA	VRE2 vanA	VRE3 vanB	VRE4 vanA	VRE5 vanB	VSE1	VSE2	VSE3	VSE4	VSE5
Melsept® SF	<3,82	4,97	4,10	<4,07	4,32	4,76	4,87	<4,05	4,58	4,67
Skinsept® Mucosa	<3,72	4,93	4,12	ND	ND	4,86	4,74	<4,02	ND	ND
Sterillium®	3,94	4,99	<3,99	<4,05	4,30	4,87	4,81	<4,05	4,58	4,62

Vysvětlivky: ND = not determined

Výsledky kontrolních suspenzí neukázaly ani negativní vliv experimentálních podmínek, ani toxicitu neutralizátoru a také hodnoty validace „C“ jsou v požadovaném rozmezí (Tab. 9 a Tab. 10).

Tabulka 9 Výsledky kontrol u vankomycin rezistentních enterokoků - neúčinné dezinfekce

Dezinfekční prostředek	kontrola	VRE1		VRE2		VRE3		VRE4		VRE5	
		$\frac{c}{n}$	$Nv_0 \times 0,5$	$\frac{c}{n}$	$Nv_0 \times 0,5$	$\frac{c}{n}$	$Nv_0 \times 0,5$	$\frac{c}{n}$	$Nv_0 \times 0,5$	$\frac{c}{n}$	$Nv_0 \times 0,5$
Melsept® SF	A	112,5	10,50	17,0	16,25	34,5	16,00	36,0	18,25	18,0	18,00
	B	>330	10,50	22,5	16,25	330,0	16,00	330,0	18,25	175,5	18,00
	C	>330	10,50	23,0	16,25	272,5	16,00	282,5	18,25	133,0	18,00
Skinsept® Mucosa	A	137,5	11,25	18,0	14,25	103,5	17,25	ND	ND	ND	ND
	B	>330	11,25	26,0	14,25	169,0	17,25				
	C	27,0	11,25	15,5	14,25	23,5	17,25				
Sterillium®	A	91,5	10,25	7,5	7,50	123,5	15,75	16,5	17,50	20,5	16,25
	B	297,0	10,25	22,5	7,50	330,0	15,75	330,0	17,50	183,5	16,25
	C	12,5	10,25	13,5	7,50	330,0	15,75	330,0	17,50	109,0	16,25

Vysvětlivky: ND = not determined

Tabulka 10 Výsledky kontrol u vankomycin citlivých enterokoků - neúčinné dezinfekce

Dezinfekční prostředek	kontrola	VSE1		VSE2		VSE3		VSE4		VSE5	
		$\frac{c}{n}$	$Nv_0 \times 0,5$	$\frac{c}{n}$	$Nv_0 \times 0,5$	$\frac{c}{n}$	$Nv_0 \times 0,5$	$\frac{c}{n}$	$Nv_0 \times 0,5$	$\frac{c}{n}$	$Nv_0 \times 0,5$
Melsept® SF	A	17,5	12,25	17,5	15,00	134,5	20,50	19,5	15,00	31,0	16,50
	B	108,0	12,25	46,0	15,00	>330	20,50	96,5	15,00	100,0	16,50
	C	13,0	12,25	35,5	15,00	>330	20,50	78,5	15,00	73,5	16,50
Skinsept® Mucosa	A	20,5	13,75	17,0	15,25	>330	21,25	ND	ND	ND	ND
	B	60,5	13,75	38,5	15,25	>330	21,25				
	C	27,5	13,75	15,5	15,25	86,5	21,25				
Sterillium®	A	16,0	14,00	17,5	15,25	190,0	25,00	15,5	15,25	22,5	17,00
	B	42,0	14,00	46,0	15,25	>330	25,00	123,5	15,25	131,0	17,00
	C	15,5	14,00	38,0	15,25	>330	25,00	94,5	15,25	96,0	17,00

Vysvětlivky: ND = not determined

8.3 Dezinfekce s rozdílným účinkem

Do této skupiny spadá 6 dezinfekčních prostředků, u kterých jsme zaznamenali rozdílné výsledky účinnosti u jednotlivých testovaných kmenů (Tab. 11). Přípravek Desam® OX byl výrazně účinný pouze u jednoho kmene VRE1 a u dvou kmenů VSE1 a VSE2 byly výsledky spíše hraniční. Tento dezinfekční prostředek se používá k dezinfekci zdravotnických povrchů a prostředků. Hexaquart® Forte se používá na dezinfekci povrchů a obsahuje kvarterní amoniové sloučeniny, ke kterým jsou enterokoky rezistentní. U kmenů, které byly citlivé k tomuto dezinfekčnímu prostředku, jsou tedy hodnoty redukce životaschopnosti bakterií spíše nižší. Incidin® Liquid spray je alkoholový přípravek určený k dezinfekci zdravotnických povrchů a prostředků. U kmenů VRE2 a VSE2 je hodnota redukce hraniční, což odpovídá snížené účinnosti, ovšem u kmene VSE1 je redukce bakterií mnohem vyšší, tento výsledek se tedy vymyká. ProCura Klorsept patří do skupin chlorových preparátů, konkrétně obsahuje derivát kyseliny izokyanurové natrium troklosen a používá se k dezinfekci zdravotnických povrchů a ploch. Tento dezinfekční prostředek byl účinný na všechny vankomycin rezistentní kmeny, ale překvapivě u 3 vankomycin citlivých kmenů se ukázal jako neúčinný. Přípravek Stabimed® Fresh je určen k dezinfekci nástrojů, účinnou látkou je alkalický alkylamin, který přísluší do skupiny tenzidů. U 3 kmenů (VRE2, VSE1 a VSE2) překročila redukce bakterií log R = 5, ale jednalo se spíše o nižší hodnoty. Incidin® Extra je kombinovaný dezinfekční přípravek, který obsahuje glukoprotamin a kvarterní amoniové sloučeniny. Využívá se na dezinfekci zdravotnických povrchů a ploch. U 2 vankomycin rezistentních kmenů (VRE1 a VRE3)

se ukázal jako zcela neúčinný, u 1 vankomycin citlivého kmene (VSE3) byla hodnota blízko hranici log R = 5.

Tabulka 11 Dezinfekce s rozdílným účinkem

Dezinfekční prostředek	Hodnoty log R									
	vankomycin rezistentní					vankomycin citlivé				
	VRE1 vanA	VRE2 vanA	VRE3 vanB	VRE4 vanA	VRE5 vanB	VSE1	VSE2	VSE3	VSE4	VSE5
Desam® OX	>7,42	4,54	4,08	<4,00	4,28	5,00	5,15	<4,10	4,27	4,23
Hexaquant® Forte	<3,87	4,73	>5,96	<3,99	5,28	>5,84	5,16	<4,06	4,96	5,01
Incidin® Liquid spray	<3,82	5,03	4,06	<4,06	4,34	>7,42	5,02	<4,14	4,42	4,55
ProCura Klorsept	>6,64	>6,09	>7,41	>7,59	>7,54	>5,50	>7,42	<4,05	4,80	4,80
Stabimed® Fresh	3,79	>6,08	4,41	<4,05	4,49	>5,61	>5,74	<4,02	4,47	4,46
Incidin® Extra	<3,75	>7,26	4,01	>5,40	>6,31	>5,41	>6,40	4,85	>5,98	>5,75

Výsledky validace „C“ neukazují na chyby v pracovním postupu, ani hodnoty kontrolních suspenzí „A“ a „B“ neprokázaly žádné vlivy experimentálních podmínek, ani toxicity neutralizátoru (Tab. 12 a Tab. 13). Na rozdílnou účinnost budou mít tedy vliv již zmiňované či jiné námi neidentifikované ovlivnitelné nebo neovlivnitelné faktory.

Tabulka 12 Výsledky kontrol u vankomycin rezistentních enterokoků - rozdílný účinek

Dezinfekční prostředek	kontrola	VRE1		VRE2		VRE3		VRE4		VRE5	
		$\frac{c}{n}$	$N_{v0} \times 0,5$	$\frac{c}{n}$	$N_{v0} \times 0,5$	$\frac{c}{n}$	$N_{v0} \times 0,5$	$\frac{c}{n}$	$N_{v0} \times 0,5$	$\frac{c}{n}$	$N_{v0} \times 0,5$
Desam® OX	A	110,5	15,25	24,5	16,00	24,0	16,00	262,5	16,00	16,5	16,25
	B	>330	15,25	89,0	16,00	179,5	16,00	>330	16,00	152,0	16,25
	C	>330	15,25	61,5	16,00	170,5	16,00	>330	16,00	135,5	16,25
Hexaquant® Forte	A	52,0	13,50	21,0	20,00	280,0	15,25	28,0	16,50	29,5	15,75
	B	317,5	13,50	99,5	20,00	152,0	15,25	153,0	16,50	164,0	15,75
	C	213,0	13,50	81,5	20,00	15,5	15,25	22,5	16,50	17,0	15,75
Incidin® Liquid spray	A	42,0	12,75	17,5	13,25	34,5	16,00	298,5	18,75	21,5	19,00
	B	>330	12,75	27,0	13,25	>330	16,00	>330	18,75	166,5	19,00
	C	233,0	12,75	26,5	13,25	321,0	16,00	>330	18,75	124,5	19,00
ProCura Klorsept	A	118,5	10,50	17,0	16,25	32,0	15,75	32,0	18,25	18,0	18,00
	B	>330	10,50	22,5	16,25	311,5	15,75	311,5	18,25	175,5	18,00
	C	>330	10,50	17,5	16,25	18,5	15,75	19,5	18,25	19,5	18,00
Stabimed® Fresh	A	148,0	11,25	18,0	14,25	103,5	17,25	16,5	17,50	20,5	16,25
	B	>330	11,25	26,0	14,25	169,0	17,25	>330	17,50	183,5	16,25
	C	251,5	11,25	15,0	14,25	25,0	17,25	>330	17,50	60,5	16,25
Incidin® Extra	A	52,0	11,00	12,0	9,25	164,5	17,50	164,5	14,75	20,0	17,00
	B	317,5	11,00	19,0	9,25	>330	17,50	>330	14,75	>330	17,00
	C	>330	11,00	11,0	9,25	137,5	17,50	137,5	14,75	18,5	17,00

Tabulka 13 Výsledky kontrol u vankomycin citlivých enterokoků - rozdílný účinek

Dezinfekční prostředek	kontrola	VSE1		VSE2		VSE3		VSE4		VSE5	
		$\frac{C}{n}$	$N_{V_0} \times 0,5$	$\frac{C}{n}$	$N_{V_0} \times 0,5$	$\frac{C}{n}$	$N_{V_0} \times 0,5$	$\frac{C}{n}$	$N_{V_0} \times 0,5$	$\frac{C}{n}$	$N_{V_0} \times 0,5$
Desam® OX	A	22,0	21,00	18,0	17,75	157,0	21,50	27,5	16,00	36,5	16,25
	B	56,0	21,00	35,5	17,75	>330	21,50	201,0	16,00	199,5	16,25
	C	48,0	21,00	23,0	17,75	>330	21,50	178,0	16,00	171,5	16,25
Hexaquart® Forte	A	19,0	15,50	18,5	16,00	203,0	21,25	28,0	16,00	21,5	15,25
	B	40,5	15,50	28,0	16,00	>330	21,25	191,5	16,00	196,0	15,25
	C	16,5	15,50	22,0	16,00	>330	21,25	31,5	16,00	30,5	15,25
Incidin® Liquid spray	A	11,0	11,00	16,5	15,00	148,5	24,00	16,0	16,00	26,0	17,75
	B	39,0	11,00	35,0	15,00	>330	24,00	154,5	16,00	171,0	17,75
	C	36,0	11,00	38,5	15,00	25,0	24,00	17,5	16,00	180,5	17,75
ProCura Klorsept	A	17,5	12,25	17,5	15,00	134,5	20,50	19,5	15,00	31,0	16,50
	B	108,0	12,25	46,0	15,00	>330	20,50	96,5	15,00	100,0	16,50
	C	14,0	12,25	15,5	15,00	>330	20,50	16,0	15,00	18,0	16,50
Stabimed® Fresh	A	20,5	13,75	17,0	15,25	>330	21,25	15,5	15,25	22,5	17,00
	B	60,5	13,75	38,5	15,25	>330	21,25	123,5	15,25	131,0	17,00
	C	27,5	13,75	19,0	15,25	>330	21,25	117,0	15,25	120,5	17,00
Incidin® Extra	A	23,5	15,50	14,0	16,00	206,0	15,50	18,0	16,00	25,5	17,00
	B	84,0	15,50	42,5	16,00	>330	15,50	100,0	16,00	110,5	17,00
	C	17,0	15,50	16,5	16,00	15,5	15,50	17,5	16,00	19,0	17,00

8.4 Vliv rezistence k vankomycinu na účinnost dezinfekčních prostředků

Na základě výsledků jsme nezaznamenali významný vliv rezistence k vankomycinu na účinnost dezinfekčních prostředků. Mezi našimi testovanými VRE byly 3 kmeny s genem *vanA* a 2 kmeny s genem *vanB*. Ani mezi těmito dvěma fenotypy VRE jsme nezaznamenali relevantní rozdíly. Vzhledem k odlišnému mechanismu účinku antimikrobních a dezinfekčních látek je to výsledek očekávaný.

9. DISKUZE

Vankomycin rezistentní enterokoky se během posledních pár let zařadily mezi nejvýznamnější původce nozokomiálních nákaz. Vedle bezpříznakové kolonizace mohou, zejména u imunosuprimovaných pacientů, způsobovat infekce téměř všech systémů včetně závažných septických stavů. Právě kvůli asymptomatické kolonizaci pacientů, také pro svou přirozenou odolnost vůči působení řady vnějších fyzikálních a chemických činitelů, a nakonec i pro úspěšné mechanismy získané rezistence k antimikrobním látkám, se VRE snadno šíří v nemocničním prostředí. Hlavní cestu přenosu představují ruce zdravotnických pracovníků, popřípadě kontaminované zdravotnické pomůcky či předměty denního užití. Bylo prokázáno, že pobyt ve zdravotnickém zařízení přispívá ke kolonizaci VRE, případně infekci, a to hlavně u pacientů na jednotkách intenzivní péče. Pravděpodobnost kolonizace se rovněž zvyšuje pobytem na pokoji, ve kterém byl umístěn pacient s VRE (Kolář, 2018).

K zamezení šíření VRE v rámci oddělení i celé nemocnice je nezbytné zavádět vhodná protiepidemická opatření. Mezi nejúčinnější prostředky v boji s VRE patří pravidelná preventivní a správně provedená represivní dezinfekce s použitím účinných dezinfekčních prostředků (Kampf, 1999; Sakagami, 2002).

V této práci jsme se rozhodli otestovat účinnost dezinfekčních prostředků, jež jsou součástí dezinfekčních programů zdravotnických zařízení, vůči enterokokům k vankomycinu rezistentním i citlivým. Pouze 4 dezinfekční prostředky byly zcela účinné u všech testovaných kmenů enterokoků. Prvním byl Helipur® H plus N, jehož hlavní účinnou složkou je baktericidní glutaraldehyd. Obsah glutaraldehydu je v tomto přípravku ve 3x vyšší koncentraci než v přípravku Melsept® SF, který se ukázal být neúčinným. Účinností glutaraldehydu na *E. faecium* se zabývala studie z roku 1999 zaměřená na odolnost enterokoků vůči teplu a chemickým prostředkům. Bylo provedeno srovnání účinnosti glutaraldehydu u dvou kmenů *E. faecium* a *E. hirae*. K redukci bakterií $\log R > 5$ došlo už při nízké koncentraci glutaraldehydu (0,05 g/100 ml). U obou testovaných kmenů byly výsledky téměř totožné (Renner *et al.*, 1999). Naše výsledky však nejsou zcela jednoznačné. Přípravek Helipur® H plus N způsobil dostatečnou redukci testovaných bakterií, zatímco působení přípravku Melsept® SF k dostatečně účinné redukci enterokoků nevedlo. Předpokládali jsme, že důvodem je nízká koncentrace glutaraldehydu v tomto přípravku, čemuž však neodpovídají výsledky výše uvedené studie.

Dalšími významně účinnými přípravky byly Chiroosan® Plus a Incidin® Active, které obsahují shodnou koncentraci kyseliny peroxooctové, čemuž odpovídají i velmi podobné hodnoty redukce bakterií. Na působení kyseliny peroxooctové na bakterie, viry a spory se zaměřila studie z roku 2014. Do vody kontaminované kmenem *E. faecium*, byla přidána 5% kyselina peroxooctová. Redukce bakterií log R > 5 bylo dosaženo už po 5minutové expozici a tato hodnota redukce zůstala konstantní i po hodinové expozici (Park *et al.*, 2014). I v našem případě jsme použili 5% kyselinu peroxooctovou a po 5minutové expozici jsme rovněž zaznamenali redukci bakterií log R > 5.

Zcela účinným dezinfekčním prostředkem byl také Chloramin T. U všech testovaných kmenů enterokoků dosáhl tento přípravek vyšších hodnot redukce bakterií, a to log R > 6,5. Na úskalí v systematickém používání tohoto přípravku ve zdravotnických zařízeních však poukazuje studie z roku 1993, která se zabývala bakteriální flórou nemocničního prostředí se zaměřením na určení citlivosti na dezinfekční prostředky, antibiotika a chemoterapeutika. U multirezistentních enterokoků, které pocházely od dětí z jednotky intenzivní péče, byla citlivost na Chloramin T zaznamenána až u koncentrace 10x vyšší, než je koncentrace účinně působící na standardní bakteriální kmeny. Na tomto pracovišti byl Chloramin T používán k dezinfekci ploch a povrchů po dobu několika let. Po nahrazení tohoto přípravku prostředky obsahujícími sterinol a chlorhexidin došlo k eliminaci multirezistentních enterokoků během 1 roku (Rozalska *et al.*, 1993).

V roce 2016 byla uveřejněna studie, která se přímo zabývala souvislostmi mezi antibiotickou rezistencí a rezistencí k dezinfekčním prostředkům u enterokoků. Bylo zkoumáno celkem 12 vankomycin citlivých i vankomycin rezistentních kmenů *Enterococcus faecium* a 9 kmenů *Enterococcus faecalis*, které byly izolovány z vepřového masa. Testováno bylo 7 dezinfekčních prostředků z různých skupin dezinfekčních látek – chlorhexidin, benzalkoniumchlorid (KAS), triklosan, chlornan sodný, 2-propanol, formaldehyd a peroxid vodíku. Byly nalezeny pouze slabé korelace mezi výsledky antibiotické rezistence a rezistence k dezinfekčním prostředkům. U jednoho kmene *Enterococcus faecalis* byla prokázána vyšší odolnost vůči triklosanu. Také byla zaznamenána přítomnost genu *qacA/B*, který kóduje efluxní pumpu, a to u jednoho kmene *Enterococcus faecium*, který byl zároveň odolný vůči účinkům dezinfekčního prostředku s obsahem chlorhexidinu. Tento gen se obvykle vyskytuje u

rodu *Staphylococcus*, u enterokoků byl zaznamenán poprvé a existuje tedy předpoklad, že se jeho výskyt může dále zvyšovat (Rizzotti *et al.*, 2016).

Výsledky této studie můžeme porovnat s našimi výsledky pro následující skupiny dezinfekčních látek: chlorhexidin, benzalkoniumchlorid (KAS), triklosan, 2-propanol a peroxid vodíku. Chlorhexidin je obsažen v přípravku Skinsept® Mucosa, který je určen k mírnější dezinfekci povrchů a používá se spíše jako antiseptikum na pokožku a krytí ran či katetrů. Při našem testování se tento dezinfekční prostředek ukázal jako zcela neúčinný vůči všem 10 testovaným kmenům, tedy jak vankomycin citlivým, tak vankomycin rezistentním. U přípravku Skinsept® Mucosa se naše výsledky s výše uvedenou studií shodují jen částečně, žádný z námi testovaných kmenů enterokoků nebyl odolný vůči chlorhexidinu. Benzalkoniumchlorid je kvarterní amoniová sloučenina a je součástí kombinovaného přípravku Incidin® Extra, který je určen k dezinfekci zdravotnických povrchů a ploch. Dva vankomycin rezistentní kmeny a jeden vankomycin citlivý kmen byly odolné vůči tomuto přípravku. Ovšem v Incidinu® Extra je vedle benzalkoniumchloridu obsažena i druhá účinná látka glukoprotamin, jejíž působení pravděpodobně ovlivnilo působení samotného benzalkoniumchloridu a tedy porovnání s výsledky výše uvedené studie není možné. Triklosan je součástí přípravku ProCura Klorsept, který se používá k dezinfekci zdravotnických povrchů a ploch. U 3 vankomycin citlivých kmenů se tento dezinfekční prostředek ukázal jako zcela neúčinný. Výše uvedená studie uvádí odolnost vůči triklosanu pouze u jednoho vankomycin rezistentního kmene *Enterococcus faecalis*, my jsme však testovali pouze kmeny *Enterococcus faecium*, které by tedy dle shodné studie měly být k triklosanu citlivé. V tomto případě se naše výsledky s výše uvedenou studií shodují pouze částečně. Peroxid vodíku je obsažen v kombinovaném přípravku Desam® OX, druhou účinnou látkou jsou zde kvarterní amoniové sloučeniny. U sedmi z deseti testovaných kmenů vankomycin rezistentních a vankomycin citlivých enterokoků nedosáhl Desam® OX v našem testování požadované hodnoty redukce bakterií log R = 5. I u tohoto kombinovaného dezinfekčního prostředku nelze úplně jednoznačně porovnat naše výsledky s výsledky výše uvedené studie. Lze tedy konstatovat, že výsledky testování citlivosti vankomycin rezistentních i citlivých enterokoků ke zmiňovaným biocidům se rozcházejí s výsledky studie provedené Rizzottim *et al.* v roce 2016.

Velký význam v šíření VRE ve zdravotnických zařízeních mají ruce zdravotnických pracovníků. Jednou z okolností, která šíření VRE usnadňuje, je

pravděpodobně užívání alkoholových dezinfekčních prostředků k dezinfekci rukou. Testovali jsme dva alkoholové dezinfekční přípravky: Sterillium® a Incidin® Liquid spray. Sterillium® se používá jako dezinfekční prostředek na ruce, který obsahuje 1-propanol a 2-propanol. Tento přípravek byl neúčinný na všechny námi testované kmeny *Enterococcus faecium*, tedy jak vankomycin citlivé, tak i vankomycin rezistentní. V případě Incidinu® Liquid spray již nebyly výsledky takto jednoznačné. U jednoho vankomycin citlivého a jednoho vankomycin rezistentního kmene byla zaznamenána hraniční hodnota redukce bakterií, a tedy nejistá účinnost. Pouze u jednoho vankomycin citlivého kmene byla zjištěna vysoká účinnost tohoto prostředku. Incidin® Liquid spray se používá k dezinfekci zdravotnických povrchů a prostředků a obsahuje 2-propanol a 1-propanol.

V roce 2018 byly uveřejněny výsledky studie, která se zabývala zvýšenou odolností VRE k alkoholovým dezinfekčním prostředkům na ruce. V letech 1997–2015 bylo vyšetřeno 139 izolátů VRE, které byly zachyceny ve zdravotnických zařízeních v Austrálii. Kmeny *Enterococcus faecium* izolované po roce 2010 byly 10krát odolnější vůči působení alkoholu než starší izoláty. Příčinou této odolnosti byla mutace v genech podílejících se na absorpci a metabolismu sacharidů. Tato zjištění naznačují, že adaptace VRE na některé dezinfekční prostředky komplikuje nynější doporučení protiepidemických opatření. Tato skutečnost bude v blízké budoucnosti vyžadovat stanovení nových postupů či užití dezinfekčních prostředků na ruce s jinou účinnou látkou (Pidot, 2018). I v našem případě byla zjištěna snížená účinnost alkoholových dezinfekčních přípravků, zejména těch určených k dekontaminaci rukou, k testovaným kmenům enterokoků, což koresponduje s výsledky této studie.

V naší práci jsme se zaměřili nejen na vliv vankomycinové rezistence na účinnost dezinfekčních prostředků, ale také na rozdíly v účinnosti mezi VRE s genem *vanA* a genem *vanB*. Cílem bylo zjistit, zda i rozdíly ve fenotypech VRE souvisí s rozdílnou odolností enterokoků vůči dezinfekčním prostředkům. Mezi testovanými VRE byly 3 kmeny s genem *vanA* a 2 kmeny s genem *vanB*. Výsledky našeho testování neprokázaly žádný relevantní vliv vankomycinové rezistence na účinnost jednotlivých dezinfekčních prostředků, ani vliv rozdílných fenotypů VRE na citlivost či odolnost k testovaným dezinfekčním prostředkům.

Antibiotická rezistenci u lidských patogenů je věnována pozornost. Rezistenci bakterií vůči běžně užívaným dezinfekčním prostředkům už taková pozornost věnována není. Mezi mechanismy vzniku antibiotické rezistence patří působení

efluxních pump v buněčné stěně bakterií, které jsou schopny aktivního transportu antibiotika z bakteriální buňky. V současné době jsou již známy efluxní pumpy, které vypuzují z bakterií širší spektrum antibiotik, podílí se tedy na jejich multirezistenci k antibiotikům. Rezistence vůči dezinfekčním prostředkům je méně běžná, což je nejspíše zapříčiněno toxickým působením těchto látek na bakteriální stěnu, čímž je omezena i činnost efluxních pump, které by tyto pro buňku toxické látky odváděly ven z bakterie. Rezistence vůči dezinfekčním prostředkům může vznikat díky mutacím a amplifikaci endogenního chromozomálního genu nebo získáním determinanty rezistence na extrachromozomálních genetických elementech, tedy plasmidech a transpozonech. Rezistence vyplývající z inaktivace dezinfekčních prostředků je známá, ale poměrně vzácná, a také specifická jen pro několik tříd dezinfekčních prostředků. Běžnější je vznik rezistence jako následek změn různých buněčných struktur, které jsou cílovým místem pro působení dezinfekčních prostředků a tím ovlivnění jeho akumulace v bakteriální buňce. Byly popsány změny v permeabilitě buněčného obalu nebo zvýšený eflux (Poole, 2002).

10. ZÁVĚR

Cílem této práce bylo testování citlivosti vankomycin rezistentních a vankomycin citlivých enterokoků na vybrané biocidy, které jsou součástí dezinfekčních programů na odděleních Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Testovali jsme celkem 10 kmenů *Enterococcus faecium*, které byly izolovány z biologického materiálu od pacientů. Z 13 testovaných dezinfekčních prostředků byly 4 zcela účinné, u 6 dezinfekčních přípravků jsme zaznamenali rozdílnou účinnost u jednotlivých kmenů a 3 dezinfekční prostředky se ukázaly jako zcela neúčinné. Do skupiny neúčinných dezinfekčních prostředků patří i nejužívanější alkoholový dezinfekční prostředek na ruce Sterillium®, což může být jedna z příčin šíření VRE prostřednictvím rukou zdravotnických pracovníků. Zvýšený výskyt VRE v nemocničním prostředí, zejména pak na jednotkách intenzivní péče, představuje vážný epidemiologický a klinický problém. Je tedy potřeba přijmout taková protiepidemická opatření, která zamezí šíření VRE mezi pacienty a zdravotnickými pracovníky.

11. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Minimální inhibiční koncentrace u VanA a VanB enterokoků.....	17
Tabulka 2 Testování neutralizátorů.....	25
Tabulka 3 Seznam testovaných dezinfekčních prostředků	26
Tabulka 4 Chemické složení testovaných dezinfekčních prostředků.....	27
Tabulka 5 Účinné dezinfekce.....	33
Tabulka 6 Výsledky kontrol u vankomycin rezistentních enterokoků - účinné dezinfekce	34
Tabulka 7 Výsledky kontrol u vankomycin citlivých enterokoků - účinné dezinfekce	34
Tabulka 8 Neúčinné dezinfekce.....	35
Tabulka 9 Výsledky kontrol u vankomycin rezistentních enterokoků - neúčinné dezinfekce	35
Tabulka 10 Výsledky kontrol u vankomycin citlivých enterokoků - neúčinné dezinfekce	36
Tabulka 11 Dezinfekce s rozdílným účinkem.....	37
Tabulka 12 Výsledky kontrol u vankomycin rezistentních enterokoků - rozdílný účinek	37
Tabulka 13 Výsledky kontrol u vankomycin citlivých enterokoků - rozdílný účinek.....	38

12. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 <i>Enterococcus faecium</i> v elektronovém mikroskopu	11
Obrázek 2 <i>Enterococcus faecium</i> - kultivace na krevním agaru	12

13. POUŽITÁ LITERATURA

- Acar, J., Casewell, M., Freeman, J. et al. 2000.** Avoparcin and virginiamycin as animal growth promoters: a plea for science in decision-making. *Clinical Microbiology and Infection*. 2000, 6, 477-482.
- Bager, F., Madsen, M., Christensen J. et al. 1997.** Avoparcin used as a growth promoter is associated with the occurrence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* on Danish poultry and pig farms. *Preventive Veterinary Medicine*. 1997, 31, 95-112.
- Bonten, M.J.M., Willems, R., Weinstein, R.A. 2001.** Vancomycin-resistant enterococci: why are they here, and where do they come from? *The Lancet Infectious Diseases*. 2001, 1, 314-325.
- Cetinkaya, Y., Falk, P., Mayhall, C.G. 2000.** Vancomycin-Resistant Enterococci. *Clinical Microbiology Reviews*. 2000, 13(4), 686-707.
- Domig, K.J., Mayer, H.K., Kneifel, W. 2003.** Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus* spp. 1. Media for isolation and enumeration. *International Journal of Food Microbiology*. 2003, 88, 147-164
- ECDC, EARS-Net.** Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2017, Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). *European Centre for Disease Prevention and Control*. [Online] Listopad 2018. [Citace: 3. květen 2019.] DOI 10.2900/230516.
- Galloway-Peña, J.R., Nallapareddy, S.R., Arias, C.A. et al. 2009.** Analysis of Clonality and Antibiotic Resistance among Early Clinical Isolates of *Enterococcus faecium* in the United States. *The Journal of Infectious Diseases*. 2009, 200, 1566-73.
- Harbarth, S., Cosgrove, S., Carmeli, Y. 2002.** Effects of Antibiotics on Nosocomial Epidemiology of Vancomycin-Resistant Enterococci. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 2002, 46(6), 1619-1628.
- Hollenbeck, B.L., Rice, L.B. 2012.** Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus. *Virulence*. 2012, 3(5), 421-569.

Kampf, G., Höfer, M., Wendt, C. 1999. Efficacy of hand disinfectants against vancomycin-resistant enterococci *in vitro*. *Journal of Hospital Infection*. 1999, 42, 143-150.

Klare, I., Badstübner, D., Konstabel, C. et al. 1999. Decreased Incidence of VanA-type Vancomycin-Resistant Enterococci Isolated from Poultry Meat and from Fecal Samples of Humans in the Community after Discontinuation of Avoparcin Usage in Animal Husbandry. *Microbial Drug Resistance*. 1999, 5, 45-52.

Kolář, M. 2018. Problematika vankomycin-rezistentních enterokoků. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*. 2018, 24, 2, 50-56.

Levine, D.P. 2006. Vancomycin: A History. *Clinical Infectious Diseases*. 2006, 42, 5-12.

Manero, A., Blanch, A.R. 1999. Identification of *Enterococcus* spp. with a Biochemical Key. *Applied And Environmental Microbiology*. 1999, 65(10), 4425-4430

Melicharčíková, V. 2015. *Sterilizace a dezinfekce*. Praha : Galén, 2015. ISBN 978-80-7492-139-1.

O'Driscoll, T., Crank, C.W. 2015 Vancomycin-resistant enterococcal infections: epidemiology, clinical manifestations, and optimal management. *Infection and Drug Resistance*. 2015, 8, 217-230.

Park, E., Lee, C., Bisesi M. et al. 2014. Efficiency of peracetic acid in inactivating bacteria, viruses, and spores in water determined with ATP bioluminescence, quantitative PCR, and culture-based methods. *Journal of Water and Health*. 2014, 12.1, 13-23.

Pidot, S.J., Gao, W., Buultjens, A.H. et al. 2018. Increasing tolerance of hospital *Enterococcus faecium* to handwash alcohols. *Science Translational Medicine*. 2018, 452, 10.

Poole, K. 2002. Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*. 2002, 92, 55-64.

- Renner, P., Peters, J. 1999.** Resistance of enterococci to heat and chemical agents. *Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin*. 1999, 202, 41-50.
- Reynolds, P.E., Courvalin, P. 2005.** Vancomycin Resistance in Enterococci Due to Synthesis of Precursors Terminating in D-Alanyl-D-Serine. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 2005, 49(1), 21-25.
- Rizzotti, L., Franca, R., Torriani, S. 2016.** Biocide and antibiotic resistance of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from the swine meat chain. *Food Microbiology*. 2016, 60, 160-164.
- Rozalska, M., Szewczyk, E., Piotrowski, A. 1993.** Bacterial flora of hospital environment: Identification of susceptibility to disinfecting agents, antibiotics and chemotherapeutics. *Medycyna Doswiadczalna i Mikrobiologia*. 1993, 45(3), 373-378.
- Sakagami, Y., Kajimura, K. 2002.** Bactericidal activities of disinfectants against vancomycin-resistant enterococci. *Journal of Hospital Infection*. 2002, 50, 140-144.
- SZÚ, EARS-Net. 2018** Antibiotická rezistence u *Enterococcus faecalis*. SZÚ. [Online] 2018. [Citace: 3. květen 2019.] <https://apps.szu.cz/earsnet/patogen.php>.
- SZÚ. 2015** Biocidní přípravky - Vybrané definice. SZÚ. [Online] 2015. [Citace: 6. květen 2019.] <http://www.szu.cz/tema/vybrane-definice>.
- Votava, M. 2003** *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno : Neptun, 2003. ISBN 80-902896-6-5.
- Votava, M. 2005** *Lékařská mikrobiologie obecná*. Brno : Neptun, 2005. ISBN 80-86850-00-5.
- Weigel, L.M., Clewell, D.B., Gill, S.R. et al. 2003.** Genetic Analysis of a High-Level Vancomycin-Resistant Isolate of *Staphylococcus aureus*. *Science*. 2003, 302, 1569-1571.