

## **Sekundárna rezistencia mikroorganizmov na dekontaminačný prostriedok Antibacteric-P**

ANNA RUŽIČKOVÁ - IVANA MAJERÍKOVÁ

**SÚHRN.** Z hľadiska sanitácie je najväčším problémom vznik rezistencie mikroorganizmov na dekontaminačné prostriedky. Najčastejšie vzniká rezistencia mikroorganizmov na prostriedky, ktoré obsahujú ako dekontaminačnú zložku kvartérne amóniové zlúčeniny (KAZ). To sa potvrdilo aj v uvedenej práci, kde z viacerých sledovaných dekontaminačných prostriedkov práve u prostriedku Antibacteric-P, ktorý je na báze KAZ, sa hodnoty mikrobiálnej inhibičnej koncentrácie (MIC) v podmienkach pokusu veľmi výrazne zvyšovali u všetkých skúmaných kmeňov baktérií. Z uvedeného príspevku vyplýva nutnosť striedania dekontaminačných prostriedkov na báze KAZ s inými dekontaminačnými prostriedkami, ktoré majú vysoký mikrobicídny účinok.

**KLÚČOVÉ SLOVÁ:** dekontaminácia; rezistencia; kvartérne amóniové zlúčeniny

Sekundárna rezistencia je jav, pri ktorom sa pôvodne citlivý mikroorganizmus stáva v dôsledku určitých zmien rezistentný na danú látku. Prechod z citlivosti do rezistencie predstavuje kvalitatívnu zmenu, ktorá však má aj kvantitatívne charakteristiky, a tak môžeme hovoriť o nízkom, strednom alebo vysokom stupni rezistencie [1,2].

Ďalším typom rezistencie je rezistencia krížová. Vzniká v dôsledku sekundárnej rezistencie niektorých bakteriálnych kmeňov na chemicky príbuzné zlúčeniny. Môže byť kompletná, t. j. v celom rozsahu antibakteriálneho spektra danej látky alebo nekompletná, keď postihuje iba časť spektra, prípadne len niektoré jedince určitého druhu mikroorganizmov. Vyskytuje sa hlavne u antibiotík (tetracyklíny, cefalosporíny, polymyxíny, penicilíny, peptidové a makrolidové antibiotiká, hlavne trojica erytromycín - karbomycín - oleandomycín), u chemoterapeutík (sulfonamidy, nitrofurány) a aj u dekontaminačných prostriedkov, hlavne na báze kvartérnych amóniových zlúčenín (ďalej KAZ) [1,3].

---

Ing. Anna RUŽIČKOVÁ, Ing. Ivana MAJERÍKOVÁ, Výskumný ústav potravinársky, Priemyselná 4, P. O. box 25, 824 75 Bratislava 26.

Volná [3] sledovala krížovú rezistenciu mikroorganizmov na antibiotiká v dôsledku sekundárnej rezistencie na dekontaminačné látky a krížovú rezistenciu mikroorganizmov na dekontaminačné látky. Zistila, že gramnegatívne baktérie so získanou rezistenciou na Ajatín boli krížovo rezistentné na Septonex a opačne. Pravdepodobnosť vzniku rezistencie na Ajatín bola nižšia ako na Septonex. Kmene *Escherichia coli* so získanou rezistenciou na Ajatín, resp. Septonex, boli krížovo rezistentné na chloramfenikol, tetracyklín a kyselinu nalidixovú.

Melicherčíková [4] sledovala vzťah medzi citlivosťou a rezistenciou 50 kmeňov *Pseudomonas aeruginosa* na niektoré dekontaminačné prostriedky (chlórámín, Dikonit, Jodonal, kyselina peroctová, Orthosan BF 12) a na 16 chemoterapeutík. Niektoré kmene boli rezistentné na chemoterapeutiká i dekontaminačné prostriedky, avšak autorke sa nepodarilo úplne objasniť vzťahy medzi citlivosťou a rezistenciou kmeňov *Pseudomonas aeruginosa* k testovaným látkam.

#### *Genetické mechanizmy vzniku rezistencie*

Baktérie sa môžu stať rezistentné na rôzne antimikrobiálne látky prostredníctvom týchto genetických mechanizmov:

- mutácia,
- rekombinácia,
- získanie alebo expresia epizomálnych (plazmidových) R-faktorov.

#### *Biochemické mechanizmy vzniku rezistencie*

Najviac poznatkov o mechanizme rezistencie mikroorganizmov na antimikrobiálne látky bolo získaných a experimentami overených pri štúdiu rezistencie na antibiotiká, menej na dekontaminačné prostriedky. Všeobecne však existujú tieto biochemické mechanizmy rezistencie na antimikrobiálne látky [1]:

- enzýmové narušenie molekulárnej štruktúry látky a zníženie jej účinnej koncentrácie pod kritickú hranicu,
- zníženie permeability bunkovej steny, prípadne plazmatickej membrány pre danú látku,
- zvýšená tvorba interferujúcich (kompetitívnych) metabolitov,
- vytvorenie alternatívnej metabolickej dráhy, ktorá obchádza metabolickú spojku blokovánú účinkom látky,
- enzýmová modifikácia (baktéria vytvorí enzým, ktorý vykonáva metabolickú funkciu na mieste pôvodného enzýmu, ktorý je blokováný danou látkou),
- zmena štruktúry ribozomálnych proteínov baktérie,
- „väzbová“ inaktivácia antimikrobiálnej látky.

### *Hlavné zásady ochrany pred adaptáciou mikroorganizmov na dekontaminačné prostriedky*

Z hľadiska sanitácie najväčším problémom je adaptácia mikroorganizmov na čistiace a hlavne dekontaminačné prostriedky. Adaptácia mikroorganizmov na dekontaminačné prostriedky vzniká vtedy, ak sa používa nedostatočná koncentrácia dekontaminačných prostriedkov, nedodržiava sa čas, predpísaná teplota a ďalšie faktory potrebné na ich pôsobenie. V takýchto prípadoch časť mikroflóry môže prežiť proces dekontaminácie a postupne sa adaptuje na nové podmienky prostredia, čím sa stáva rezistentnou na bežne a dlhodobo používané dekontaminačné prostriedky aj pri dodržiavaní predpísaných podmienok celého postupu.

Hlavné zásady ochrany pred adaptáciou mikroflóry na dekontaminačné prostriedky sú [5]:

- výber správneho dekontaminačného prostriedku vzhľadom k existujúcej mikrobiálnej kontaminácii,
- dôkladné vyčistenie celého zariadenia hlavne na ťažko prístupných miestach, aby sa neznižoval účinok dekontaminačného prostriedku viazaním účinnej látky na nečistoty, prípadne vytvorením ochranného prostredia pre mikroorganizmy,
- dodržiavanie predpísaných podmienok čistenia a dekontaminácie (koncentrácia, čas, teplota),
- čistenie a dekontaminácia zariadenia vždy hneď po skončení výroby,
- striedanie dekontaminačných prostriedkov,
- pravidelná kontrola účinnosti dekontaminačných prostriedkov a mikrobiálnej kontaminácie.

## **Materiál a metódy**

### *Dekontaminačné prostriedky*

V práci sme použili dekontaminačné prostriedky (ďalej DP), ktorých účinnou zložkou sú KAZ, NaClO, kyselina peroctová, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a koloidné striebro. Sekundárnu rezistenciu sme zistili len u prostriedku Antibacteric-P (tab. 1).

### *Koncentrácie dekontaminačných prostriedkov*

Koncentračný rozsah DP sme volili podľa účinných koncentrácií, ktoré sú odporúčané výrobcom a podľa potreby vzhľadom na získané výsledky.

TABUĽKA 1. Dekontaminačné prostriedky.  
TABLE 1. Decontamination substances.

Obchodný názov <sup>1</sup>	Účinná zložka <sup>2</sup>	Výrobca <sup>3</sup>
Antibacteric-P	KAZ <sup>4</sup> (kamín)	Tatrachema v. d., Trnava
Ajatín	80 % KAZ	Slovakofarma, Hlohovec
Septonex bromid	KAZ	Slovakofarma, Hlohovec
Savo Super	NaClO	Bohemie, Bohumín, ČR
Desana	NaClO	Tatrachema v. d., Trnava
Persteril	32-36 % kyselina peroctová <sup>5</sup>	Chemické závody, Sokolov, ČR
Sanosil Super	25 % koloidné striebro <sup>6</sup> , H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Sanosil Trading Ltd., Švajčiarsko

1 - trade name, 2 - effective component, 3 - producer, 4 - quaternary ammonium salts, 5 - peracetic acid, 6 - colloidal silver.

### Mikroorganizmy

Používali sme 4 kmene gramnegatívnych baktérií, ktoré boli izolované z potravinárskych prevádzok:

- *Pseudomonas aeruginosa*, Okresná hygienická stanica, Trnava,
- *Escherichia coli*, prevádzka Galis Food Products, Bratislava,
- *Proteus mirabilis*, prevádzka Galis Food Products, Bratislava,
- *Citrobacter* sp., Okresná hygienická stanica, Trnava.

Jednotlivé kmene sme dlhodobo uchovávali v lyofilizovanej forme pri -20 °C a krátkodobo na Živnom agare č. 2 pri 4 °C.

Na pasážovanie lyofilizovaných kultúr a experimentálne práce sme použili Živný bujón č. 2 a Živný agar č. 2 z Imuny, Šarišské Michaľany.

### Inokulum

Na stanovenie minimálnej inhibičnej koncentrácie (ďalej MIC) sme používali suspenziu baktérií v Živnom bujóne č. 2 s hustotou asi  $1.10^8$  buniek v ml, ktorú sme pripravili z kultúry vyrastenej za 24 h na Živnom agare č. 2 a následným prenesením jednej bakteriologickej kľučky do 5 ml Živného bujónu č. 2 a inkubáciou 2 h až 3 h pri 37 °C.

Na stanovenie baktericídnych koncentrácií sme ako inokulum používali suspenziu baktérií vo fyziologickom roztoku s denzitou  $1.10^8$  až  $1.10^9$  buniek v 1 ml, ktorú sme pripravili podľa zákalovej stupnice McFarlanda [6].

### Princípy metód hodnotenia baktericídnej účinnosti dekontaminačných prostriedkov

Použili sme štandardné suspenzné metódy stanovenia MIC, MBC a MBC-B podľa Kneiflovej [7] a Boleka [6]:

MIC - minimálna inhibičná koncentrácia - predstavuje najmenšie množstvo látky, ktoré inhibuje rast daného mikroorganizmu; princíp metódy spočíva v tom, že skúšaná látka sa pridá priamo do kultivačného média s naočkoványm mikroorganizmom a hodnotí sa, ktorá koncentrácia inhibuje rast skúmaného mikroorganizmu,

MBC - minimálna baktericídna koncentrácia v minimálnom (vodnom) prostredí je najnižšia koncentrácia, ktorá usmrtí daný mikroorganizmus,

MBC-B - minimálna baktericídna koncentrácia s bielkovinovou záťažou.

Princíp metódy podľa Kneiflovej [7]:

K 10 ml skúšanej látky sa pridá 0,1 ml bakteriálnej suspenzie s denzitou  $1.10^8$  KTJ.ml<sup>-1</sup> až  $1.10^9$  KTJ.ml<sup>-1</sup>. Po určitej expozícii (2; 4; 8; 16; 32; 64 min, 2 h a 4 h) sa časť zmesi vyočkuje bakteriologickou kľučkou do kvapalného kultivačného média s obsahom neutralizátora pre KAZ (Tween 80). Po inkubácii 24 h až 48 h sa hodnotí rast mikroorganizmu a stanoví sa najnižšia účinná koncentrácia a expozícia. V prípade, že skúšaná látka tvorí zákal, rast baktérie sa hodnotí po vyočkovaní z kvapalného kultivačného média na živný agar.

#### *Metóda detekcie sekundárnej rezistencie*

Zmeny v citlivosti mikroorganizmov na DP sme zisťovali nami modifikovanou metódou a metódou podľa Mrozeke [8]. Princípom oboch metód je sledovanie MIC pasážovaného mikroorganizmu v postupne zvyšovaných koncentráciách DP v kvapalnom kultivačnom médiu. Sekundárna rezistencia nevzniká, ak je hodnota MIC konštantná.

Postup podľa Mrozeke [8]:

- zistenie hodnoty MIC skúmaného mikroorganizmu na DP metódou podľa Kneiflovej [7],
- 0,1 ml inokula pripraveného spôsobom na stanovenie MIC, sa preniesie do 5 ml nariedeného DP v Živnom bujóne č. 2, kultúra sa nechá rásť v prostredí DP 2 až 3 dni,
- po 3 dňoch sa zistí MIC a z poslednej skúmavky s najvyššou koncentráciou DP, pri ktorej mikroorganizmus ešte rastie, sa inokuluje 0,1 ml ďalšia sada kvapalných kultivačných médií s vyššou koncentráciou DP,
- pasážovanie v stále vyšších koncentráciách DP sa opakuje 4 až 5-krát v 2 až 3-dňových intervaloch.

Nami modifikovaná metóda je podobná, rozdiely sú:

- v príprave inokula (bakteriálna suspenzia je pripravená podľa zákalovej stupnice McFarlanda),

- v inokulácii (0,1 ml supenzie buniek sa inokuluje 9,9 ml bujónu),
- v dĺžke inkubácie medzi jednotlivými pasážami (6 až 7 dní).

#### *Zistenie reverzibility alebo ireverzibility sekundárnej rezistencie*

Reverzibilitu, resp. ireverzibilitu, získanej rezistencie sme zisťovali stanovením MIC po 6 až 8-násobnom pasážovaní kmeňov v Živnom bujóne č. 2 bez pridania DP. Ak hodnota MIC klesá, ide o reverzibilný typ rezistencie, ak je hodnota MIC konštantná, jedná sa o rezistenciu ireverzibilnú.

### **Výsledky a diskusia**

V oblasti štúdia rezistencie mikroorganizmov k dekontaminačným prostriedkom sme urobili výber dekontaminačného prostriedku a mikroorganizmov, výber, odskúšanie a zavedenie vhodných metód hodnotenia účinnosti DP, ako aj adaptácie mikroorganizmov na DP v subletálnych koncentráciách.

Zo sady DP, ktoré sme testovali v predchádzajúcom období, sme vybrali DP s obchodným názvom Antibacteric-P, výrobca Tatrachema Trnava, ktorý bol uvedený na trh v roku 1995. Je určený na čistenie a dezinfekciu povrchov a zariadení v potravinárskom priemysle. Obsahuje biodegradovateľný tenzid a dezinfekčnú zložku na báze KAZ, čím je vysokoúčinný oproti bežným potravinárskym kontaminantom. Jeho nevýhodou, ako aj celej skupiny DP na báze KAZ, je adaptácia mikroorganizmov a vznik sekundárnej rezistencie [3].

Vybrané druhy mikroorganizmov (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* a *Citrobacter* sp.) sú zástupcami G<sup>-</sup> baktérií a patria medzi bežné kontaminanty potravinárskych prevádzok. U prvých troch G<sup>-</sup> baktérií sme zistili plazmidovú DNA, čím vzniká možnosť transferu plazmidom kódovanej rezistencie na DP, čo je tiež častým javom tejto skupiny baktérií.

Za účelom odskúšania a zavedenia vhodných metód, sme prvé experimenty robili len na kmeni *Pseudomonas aeruginosa*, ktorý je na tieto účely najvhodnejší z nasledujúcich dôvodov: jeho rastové nároky sú minimálne, rozmnožuje sa aj pri nízkych teplotách, aj v odpadových vodách, je primárne rezistentný voči vonkajším nepriaznivým vplyvom, rôznym inhibítorm [9], DP [4,10-13] a iným látkam. Už staršie literárne zdroje uvádzajú vznik sekundárnej rezistencie na DP, konkrétne aj na KAZ [4,14,15].

Primárnu citlivosť *Pseudomonas aeruginosa* na Antibacteric-P sme stanovili štandardnou kvalitatívnou suspenznou metódou uvádzanou v monografii Bolek, S. a kol. [6] a podľa Kneiflovej [7].

Baktericídny účinok DP Antibacteric-P sme testovali pri teplotách 10; 24 a 37 °C, v koncentráciách 0,2; 0,1; 0,05; 0,025 a 0,012 % pripravených dvojkovým riedením vo vode. Výsledná koncentrácia buniek *Pseudomonas aeruginosa* pri skúmaných koncentráciách DP bola  $1.10^6$  KTJ.ml<sup>-1</sup> až  $1.10^7$  KTJ.ml<sup>-1</sup>. Po expozícii 2; 4; 8; 16; 32; 64 min, 2 h a 4 h bola kultúra vyočkovaná do Živného bujónu č. 2 s prídavkom neutralizátora (Tween 80) a po inkubácii 24 h až 48 h pri 37 °C boli vyhodnotené MBC a najkratšie účinné expozície. Z výsledkov uvedených v tabuľke 2 vidieť, že Antibacteric-P je najúčinnnejší pri teplote 37 °C, kedy *Pseudomonas aeruginosa* bol úplne inhibovaný koncentráciou 0,012 % po 32 minútach, pri koncentrácii 0,025 % už po 8 minútach. Znižovaním teploty klesá aj účinnosť testovaného DP. Pri teplote 24 °C bol inhibovaný koncentráciou 0,025 % za 32 minút a pri 10 °C koncentráciou 0,05 % za 4 h a 0,1 % za 32 minút.

Minimálna baktericídna koncentrácia v prostredí s bielkovinovou záťažou bola skúmaná v tých istých koncentráciách a rovnakým spôsobom ako MBC. Ako bielkovinovú záťaž sme použili bujón [16]. Z výsledkov uvedených v tabuľke 2 vidieť, že hodnoty MBC-B pri bielkovinovej záťaži sú asi 10-násobne vyššie ako pri pôsobení DP v minimálnom, t. j. vodnom prostredí.

Minimálnu inhibičnú koncentráciu Antibacteric-P pre *Pseudomonas aeruginosa* sme stanovili metódou bakteriologického pôsobenia chemických látok podľa Boleka [6] pri teplotách 10; 24 a 37 °C. Z tabuľky 2 vidieť, že MIC DP bola pre daný mikroorganizmus pri teplote 37 °C 0,1 %, pri tep-

TABUĽKA 2. Hodnota MIC a baktericídneho pôsobenia DP Antibacteric-P vo vodnom prostredí (MBC) a v prostredí s bielkovinovou záťažou (MBC-B) pre *Pseudomonas aeruginosa* pri teplotách 10; 24 a 37 °C.

TABLE 2. The MIC value and bactericidal effect of decontamination agent Antibacteric-P in water (MBC) medium and in the one loaded with protein (MBC-B) for *Pseudomonas aeruginosa* at 10; 24 and 37 °C.

Teplota <sup>1</sup> [°C]	MBC [%]					MBC-B [%]					MIC [%]
	0,2	0,1	0,05	0,025	0,012	0,2	0,1	0,05	0,025	0,012	
10	–	32 min	4 h	+	+	–	8 min	+	+	+	0,05
24	–	–	–	32 min	+	4 h	+	+	+	+	0,2
37	–	–	–	8 min	32 min	4 h	–	+	+		0,1

– - mikroorganizmus nerastie, prostriedok je účinný, + - mikroorganizmus rastie, prostriedok je neúčinný, \* - doba expozície v minútach.

– - microorganism is not growing, the detergent is effective, + - microorganism is growing, the detergent is not effective, \* - exposure time in minutes, 1 - temperature.



lote 24 °C dvojnásobne vyššia, t. j. 0,2 %, čo predstavuje koncentráciu odporúčanú výrobcom pri aplikácii tohto DP. Pri 10 °C hodnota MIC bola najnižšia, čo je v rozpore s tvrdením, že účinnosť DP na báze KAZ sa s klesajúcou teplotou znižuje. Bolek [6] uvádza, že pri teplote pod 15 °C je tento pokles veľmi výrazný. Možno to vysvetliť tým, že pri tejto nízkej teplote a experimentoch in vitro sa rast a rozmnožovanie daného mikroorganizmu spomaľuje.

V ďalších pokusoch sme sledovali vznik sekundárnej rezistencie baktérie *Pseudomonas aeruginosa* pasážovaním v subletálnych koncentráciách DP pri teplotách 10; 24 a 37 °C použitím vlastnej metódy a metódy podľa Mrozeka [8]. Výsledky sme posudzovali na základe zmien v hodnotách MIC. Pasážovaním kmeňa v subletálnych dávkach Antibacteric-P sa nám podarilo zvýšiť jeho rezistenciu už po 4 pasážach a pri všetkých zvolených teplotách. Porovnaním výsledkov získanej rezistencie uvedených v tabuľke 3 vidieť, že výsledky obidvoch skúšaných metód sú porovnateľné a rozdiely sú zanedbateľné. Tieto výsledky sú však len orientačné. Ich správnosť sme potvrdili a overili sériou ďalších pokusov, pri ktorých sme zvolili postup podľa Mrozeka. Po výbere a odskúšaní metód hodnotenia účinnosti DP Antibacteric-P na modelovom kmeni *Pseudomonas aeruginosa* sme sledovali primárnu rezistenciu a vznik sekundárnej rezistencie u ďalších nami zvolených kontaminantov potravinárskych prevádzok - *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* a *Citrobacter* sp. Pre všetky skúšané kmene sme stanovili MIC,

TABUĽKA 3. Adaptácia *Pseudomonas aeruginosa* na DP Antibacteric-P pri teplotách 10; 24 a 37 °C vo vodnom prostredí a pri bielkovinovej záťaži.

TABLE 3. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the decontamination agent Antibacteric-P in water medium and in the one loaded with protein at 10; 24 and 37 °C.

Teplota <sup>1</sup> [°C]	Metóda <sup>2</sup>	MIC vstupná <sup>3</sup> [%]	Počet pasáží <sup>4</sup>	MIC výsledná <sup>5</sup> [%]	Násobok zvýšenia rezistencie <sup>6</sup>
10	A	0,025	4	3,2	128
	B	0,5	4	3,2	64
24	A	0,1	4	3,2	32
	B	0,2	4	3,2	16
37	A	0,05	4	1,6	32
	B	0,025	4	0,8	16

A - nami modifikovaná metóda, B - metóda podľa Mrozeka [8].

A - modified method, B - method by Mrozek [8], 1 - temperature, 2 - method, 3 - initial minimum inhibitory concentration, 4 - number of passages, 5 - final MIC, 6 - multiple of resistance increase.



TABUĽKA 4. Hodnota MIC a baktericídneho pôsobenia DP Antibacteric-P vo vodnom prostredí a v prostredí s bielkovinovou záťažou pre *Escherichia coli* pri teplotách 10; 24 a 37 °C.

TABLE 4. The MIC value and bactericidal effect of decontamination agent Antibacteric-P in water medium (MBC) and in the one loaded with protein (MBC-B) for *Escherichia coli* at 10; 24 and 37 °C.

Teplota <sup>1</sup> [°C]	MBC [%]					MBC-B [%]					MIC [%]
	0,05	0,025	0,012	0,006	0,003	0,1	0,05	0,025	0,012	0,006	
10	–	8 min	32 min	+	+	–	16 min	+	+	+	0,006
24	–	–	–	4 h	+	–	–	4 min	64 min	+	0,012
37	–	–	–	32 min	+	–	–	32 min	+	+	0,012

TABUĽKA 5. Hodnota MIC a baktericídneho pôsobenia DP Antibacteric-P vo vodnom prostredí a v prostredí s bielkovinovou záťažou pre *Proteus mirabilis* pri teplotách 10; 24 a 37 °C.

TABLE 5. The MIC value and bactericidal effect of decontamination agent Antibacteric-P in water medium (MBC) and in the one loaded with protein (MBC-B) for *Proteus mirabilis* at 10; 24 and 37 °C.

Teplota <sup>1</sup> [°C]	MBC [%]					MBC-B [%]					MIC [%]
	0,05	0,025	0,012	0,006	0,003	0,2	0,1	0,05	0,025	0,012	
10	4 h	+	+	+	+	–	–	64 min	+	+	0,012
24	32 min	4 h	+	+	+	32 min	+	+	+	+	0,1
37	–	2 h	+	+	+	+	+	+	+	+	0,025

TABUĽKA 6. Hodnota MIC a baktericídneho pôsobenia DP Antibacteric-P vo vodnom prostredí a v prostredí s bielkovinovou záťažou pre *Citrobacter* sp. pri teplotách 10; 24 a 37 °C.

TABLE 6. The MIC value and bactericidal effect of decontamination agent Antibacteric-P in water medium (MBC) and in the one loaded with protein (MBC-B) for *Citrobacter* sp. at 10; 24 and 37 °C.

Teplota <sup>1</sup> [°C]	MBC [%]					MBC-B [%]					MIC [%]
	0,05	0,025	0,012	0,006	0,003	0,2	0,1	0,05	0,025	0,012	
10	4 h	+	+	+	+	–	8 min	32 min	+	+	0,012
24	–	–	32 min	2 h	+	16 min	+	+	+	+	0,1
37	–	–	–	4 h	+	+	+	+	+	+	0,025

Vysvetlivky: pozri TABUĽKA 2.

Notes: see the TABLE 2.

MBC, MBC-B a najkratšie účinné expozície štandardnou suspenznou metódou na hodnotenie dezinfekčnej účinnosti chemických látok podľa Kneiflovej [7]. Výsledky pre jednotlivé mikroorganizmy sú zosumarizované a uvedené v tabuľkách 4, 5 a 6.

*Escherichia coli* a koliformné baktérie sú najbežnejšími kontaminantami potravinárskych prevádzok a aj výrobkov. Ich vysoké koncentrácie v detegovaných vzorkách poukazujú na hrubé zanedbanie hygienických a sanitačných opatrení. Z hodnotenia baktericídneho pôsobenia DP na tento kmeň (tab. 4) vyplýva, že cídny účinok Antibacteric-P vo vodnom prostredí a v prostredí s bielkovinovou záťažou bol najvýraznejší pri teplotách 37 °C a 24 °C. *Escherichia coli* bola vo vodnom prostredí usmrtená koncentráciou DP 0,006 % pri 24 °C po 4 h a pri 37 °C tou istou koncentráciou už po 32 minútach. Hodnoty MBC-B, podobne ako u kmeňa *Pseudomonas aeruginosa*, sú vyššie, lebo organický materiál výrazne znižuje účinnosť DP hlavne na báze KAZ [6,17]. MIC Antibacteric-P pre *Escherichia coli* je podstatne nižšia ako pre kmeň *Pseudomonas aeruginosa*, pri 37 °C a 24 °C hodnota MIC je 0,012 % a pri 10 °C len 0,006 %.

*Proteus mirabilis*, podobne ako aj iní zástupcovia tohto rodu, sa vyznačuje väčšou odolnosťou, t. j. primárnou rezistenciou na inhibičné látky a nepriaznivé vplyvy prostredia ako napr. *E. coli*. Z výsledkov uvedených v tabuľke 5 vidieť, že Antibacteric-P vo vodnom prostredí je najúčinnnejší pri 37 °C, kedy *Proteus mirabilis* je inhibovaný koncentráciou 0,025 % po 2 hodinách a tou istou koncentráciou pri 24 °C po 4 hodinách pôsobenia. Je to 4-krát vyššia koncentrácia ako pri kmeni *E. coli*. Hodnoty MBC-B sú minimálne 10-krát vyššie ako vo vodnom prostredí. Hodnoty MIC pre tento kmeň sú 0,025 % pri 37 °C, 0,1 % pri 24 °C a 0,012 % pri 10 °C.

*Citrobacter* sp. je rovnako citlivý na Antibacteric-P ako predchádzajúci mikroorganizmus. Rozdiely sú len v hodnotách MBC vo vodnom prostredí (tabuľka 5). Na úplnú inhibíciu kmeňa *Citrobacter* sp. je potrebná 10-krát nižšia koncentrácia, t. j. 0,006 % pri expozícii 2 h a teplote 24 °C a 4 h pri 37 °C.

#### *Adaptácia mikroorganizmov na Antibacteric-P*

Jednou z dôležitých požiadaviek na DP je, aby boli účinné v nízkych koncentráciách a pri krátkych expozíciách. Znižovanie koncentrácie však nesmie viesť k hranici subletálnych koncentrácií pre mikroorganizmy, lebo tieto môžu zvyšovať svoju odolnosť voči nim [9]. S možnosťou vzniku sekundárnej rezistencie treba počítať hlavne pri používaní KAZ [3]. Preto v ďalšej časti experimentálnych prác sme sa zamerali na sledovanie zmien v citlivosti vybraných mikroorganizmov *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*,

*Proteus mirabilis* a *Citrobacter* sp. na Antibacteric-P pasážovaním pri teplotách 24 °C a 37 °C. MIC sme zisťovali metódou podľa Kneiflovej [7] a adaptáciu baktérií metódou navrhnutou Mrozekom [8]. Teplotu 10 °C sme vynechali z dôvodov pomalého rastu mikroorganizmov a výrazného zníženia účinnosti Antibacteric-P pri teplote pod 15 °C.

Zistili sme, že pasážovaním kmeňov v kvapalnom kultivačnom médiu so zvyšujúcou sa koncentráciou Antibacteric-P sa hodnoty MIC v podmienkach pokusu veľmi výrazne zvyšovali u všetkých skúmaných kmeňov baktérií. Obzvlášť vysoké hodnoty MIC sme dosiahli pasážovaním pri teplote 24 °C (tabuľka 7). Hodnotu MIC v prípade kmeňa *Escherichia coli* sa nám podarilo zvýšiť až 2917-krát, u *Proteus mirabilis* 350-krát, *Pseudomonas aeruginosa* 175-krát a u *Citrobacter* sp. 32-krát. Zaujímavé je aj to, že prvé 3 skúmané kmene sú po získaní rezistencie schopné rásť minimálne v 35 %-nom rozto-

TABUĽKA 7. Adaptácia skúmaných mikroorganizmov na Antibacteric-P pri teplote 24 °C metódou podľa Mrozeka [8].

TABLE 7. Adaptation of microorganisms to the decontamination agent Antibacteric-P at 24 °C tested by method of Mrozek [8].

Mikroorganizmus <sup>1</sup>	R <sub>P</sub> MIC [%]	N	R <sub>S</sub> MIC [%]	Násobok zvýšenia R <sub>P</sub> <sup>2</sup>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,2	6	>35,0	175
<i>Escherichia coli</i>	0,012	6	>35,0	2 917
<i>Proteus mirabilis</i>	0,1	6	>35,0	350
<i>Citrobacter</i> sp.	0,1	6	3,2	32

R<sub>P</sub> - primárna rezistencia, R<sub>S</sub> - sekundárna rezistencia, N - počet pasáží v živnom bujóne č. 2 so zvyšujúcou sa koncentráciou DP.

R<sub>P</sub> - primary resistance, R<sub>S</sub> - secondary resistance, N - number of passages in Nutrient Broth No. 2 with concentration increase of decontamination agent, 1 - microorganism, 2 - multiple of R<sub>P</sub> increase.

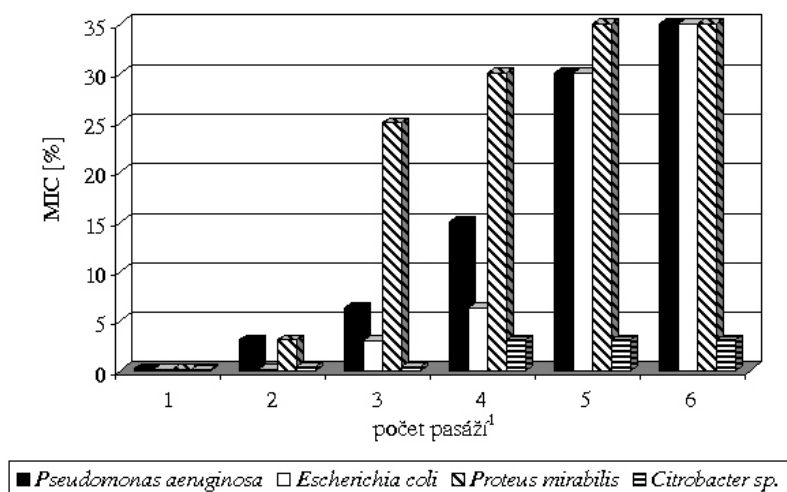
TABUĽKA 8. Adaptácia skúmaných mikroorganizmov na Antibacteric-P pri teplote 37 °C metódou podľa Mrozeka [8].

TABLE 8. Adaptation of microorganisms to the decontamination agent Antibacteric-P at 37 °C tested by method of Mrozek [8].

Mikroorganizmus <sup>1</sup>	R <sub>P</sub> MIC [%]	N	R <sub>S</sub> MIC [%]	Násobok zvýšenia R <sub>P</sub> <sup>2</sup>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,012	6	10,0	833
<i>Escherichia coli</i>	0,012	6	6,4	533
<i>Proteus mirabilis</i>	0,025	6	10,0	400
<i>Citrobacter</i> sp.	0,012	6	6,4	533

Vysvetlivky: pozri Tabuľka 7.

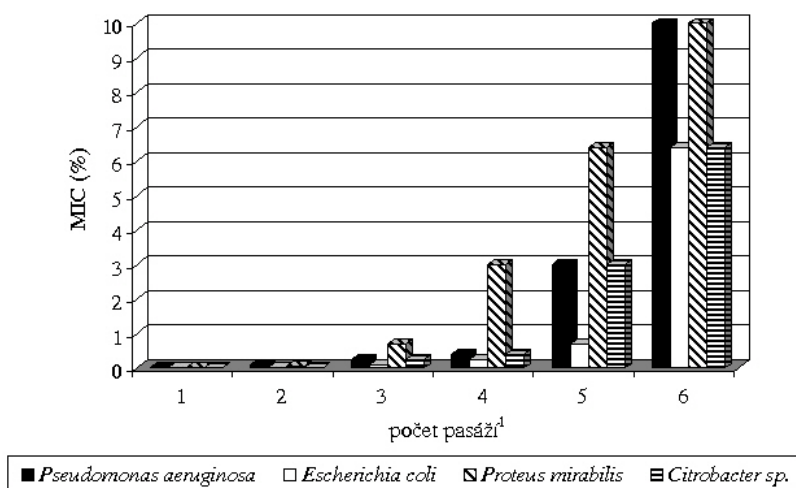
Notes: see the Table 7.



OBR. 1. Adaptácia mikroorganizmov pasážovaných v Živnom bujóne č. 2 so stúpajúcou koncentráciou Antibacteric-P pri teplote 24 °C.

FIG. 1. Influence of Antibacteric-P concentration values on adaptation of microorganisms cultivated in Nutrient Broth No. 2 at 24 °C.

1 - number of passages.



Obr. 2. Adaptácia mikroorganizmov pasážovaných v Živnom bujóne č. 2 so stúpajúcou koncentráciou Antibacteric-P pri teplote 37 °C.

Fig. 2. Influence of Antibacteric-P concentration values on adaptation of microorganisms cultivated in Nutrient Broth No. 2 at 37 °C.

1 - number of passages.

ku Antibacteric-P. Z literatúry sú známe poznatky o takejto adaptácii mikroorganizmov na vysoké koncentrácie inhibičných látok v prostredí.

MIC týchto mikroorganizmov po pasážovaní pri 37 °C boli nižšie. Maximálne MIC dosiahli hodnotu 10 % u kmeňov *Pseudomonas aeruginosa* a *Proteus mirabilis*, ale celkový násobok zvýšenia rezistencie na Antibacteric-P bol vysoký, 400 až 833-krát, ako je uvedené v tabuľke 8. Presný priebeh adaptácie týchto mikroorganizmov na postupne zvyšujúcu sa koncentráciu DP pasážovaním pri teplotách 24 °C a 37 °C je znázornený formou stĺpcových diagramov na obrázkoch 1 a 2.

Ireverzibilitu (pretrvávanie) alebo reverzibilitu sekundárnej rezistencie u získaných rezistentných kmeňov sme zisťovali niekoľkonásobným preočkovávaním týchto kmeňov na Živný agar č. 2 a stanovením hodnôt MIC. Z výsledkov uvedených v tabuľke 9. vidieť, že po ôsmom pasážovaní hodnoty MIC všetkých rezistentných kmeňov niekoľkonásobne klesli, čo znamená, že u týchto kmeňov ide o vratný (reverzibilný) typ sekundárnej rezistencie na skúmaný DP Antibacteric-P.

V posledných experimentoch sme skúšali účinok rôznych DP na pôvodné a na získané vysokorezistentné kmene. Použili sme 6 prípravkov na báze KAZ, chlór, peroxidu vodíka a striebra. Ich obchodné názvy sú uvedené v tab. 1.

Použili sme dva prípravky na báze KAZ (Ajatín a Septonex), keďže je známe, že u tejto skupiny môže dôjsť aj ku krížovej rezistencii [3], ďalej prípravky, v ktorých účinnou zložkou je chlór (Savo Super a Desana), peroxid vodíka (Persteril) a dvojzložkový DP na báze peroxidu vodíka a koloidného striebra (Sanosil Super). Sú to DP, u ktorých pravdepodobnosť vzniku sekun-

TABUĽKA 9. Hodnotenie reverzibility alebo ireverzibility kmeňov so získanou rezistenciou na Antibacteric-P pri teplotách 24 °C a 37 °C.  
TABLE 9. Evalution of reversibility or irreversibility of microorganisms with secondary resistance against Antibacteric-P at 24 °C and 37 °C.

Mikroorganizmus so získanou rezistenciou <sup>1</sup>	24 °C		37 °C	
	Rs MIC [%]	R <sub>8</sub> MIC [%]	Rs MIC [%]	R <sub>8</sub> MIC [%]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>35,0	>10	10,0	>6,4
<i>Escherichia coli</i>	>35,0	10	6,4	0,8
<i>Proteus mirabilis</i>	>35,0	>10	10,0	3,2
<i>Citrobacter</i> sp	3,2	1,6	6,4	1,6

Rs - sekundárna rezistencia, R<sub>8</sub> - rezistencia po 8. pasážovaní v Živnom agare č. 2 bez DP.

Rs - secondary resistance, R<sub>8</sub> - resistance after 8th passage in Nutrient Agar No. 2 without decontamination agent, 1 - microorganisms with obtained resistance.

TABUĽKA 10. Účinok rôznych DP na pôvodné kmene a na kmene so získanou rezistenciou na Antibacteric-P pri teplote 24 °C.

TABLE 10. Effect of the individual decontamination agents on the original strains and on the strains with secondary resistance against Antibacteric-P at 24 °C.

DP	MIC [%]											
	Ajatín 89		Septonex		Savo Super		Deasana		Persteril		Sanosil Super	
	K <sub>P</sub>	K <sub>R</sub>	K <sub>P</sub>	K <sub>R</sub>	K <sub>P</sub>	K <sub>R</sub>	K <sub>P</sub>	K <sub>R</sub>	K <sub>P</sub>	K <sub>R</sub>	K <sub>P</sub>	K <sub>R</sub>
<i>P. a.</i>	1,0	1,0	1,0	1,0	2,0	2,0	2,0	2,5	<0,2	0,2	0,5	0,5
<i>E. c.</i>	0,5	0,5	0,5	0,5	1,0	2,0	2,0	2,0	0,2	0,2	0,25	0,25
<i>P. m.</i>	1,0	1,0	1,0	1,0	2,0	2,0	2,0	2,0	<0,2	0,2	0,25	0,25
<i>C. sp.</i>	0,5	1,0	1,0	0,5	2,0	1,0	2,0	2,0	<0,2	0,2	0,25	0,25
*	0,5 - 2,0		0,5 - 2,0		1,25 - 7,0		1,3 - 5,0		0,2 - 0,5		0,1 - 2,0	

*P. a.* - *Pseudomonas aeruginosa*, *E. c.* - *Escherichia coli*, *P. m.* - *Proteus mirabilis*, *C. s.* - *Citrobacter* sp.

K<sub>P</sub> - pôvodný kmeň, K<sub>R</sub> - kmeň so získanou rezistenciou, \* - odporúčané koncentrácie [%].

K<sub>P</sub> - original strain, K<sub>R</sub> - strain with secondary resistance, \* - recommended concentrations [%].

dárnej rezistencie je veľmi malá, a preto sú vhodné na striedanie s DP na báze KAZ.

Z výsledkov uvedených v tabuľke 10 vidieť, že hodnoty skúšaných DP na pôvodné, ako aj na získané rezistentné kmene, sa nachádzajú v rozmedzí koncentrácií odporúčaných výrobcami.

Ďalej sme zistili, že kmene baktérií so získanou rezistenciou na Antibacteric-P nie sú krížovo rezistentné na Ajatín a Septonex.

## Záver

Cieľom práce bolo zistiť baktericídnu účinnosť dekontaminačného prostriedku Antibacteric-P pre vybrané kmene baktérií, bežné kontaminanty potravinárskych prevádzok, u ktorých sa predpokladá vyššia primárna rezistencia ako u štandardných modelových kmeňov, ktoré sa používajú na hodnotenie baktericídnej účinnosti dekontaminačných prostriedkov.

Ďalej sme sledovali možnosť vzniku sekundárnej rezistencie u týchto mikroorganizmov pasážovaním pri subletálnych koncentráciách Antibacteric-P a nakoniec sme hodnotili účinok iných dekontaminačných prostriedkov na pôvodné kmene a na kmene so získanou rezistenciou na Antibacteric-P.

Zistili sme:

- baktericídny účinok Antibacteric-P pre kmene *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter* sp. pri testovaných teplotách 10; 24 a 37 °C nepresahuje limitnú hodnotu koncentrácie, ktorú odporúča výrobca pri aplikácii tohto dekontaminačného prostriedku v potravinárskom priemysle,
- všetky skúmané kmene G<sup>-</sup> baktérií sa stali výrazne rezistentné na Antibacteric-P pri teplotách 24 °C a 37 °C,
- pri teplote 24 °C je adaptácia mikroorganizmov na Antibacteric-P výrazná už po 2-násobnom pasážovaní kmeňov v médiu so stúpajúcou koncentráciou dekontaminačného prostriedku, kedy *Pseudomonas aeruginosa* a *Proteus mirabilis* rastú pri koncentrácii 16-násobne a 32-násobne vyššej ako limitná koncentrácia Antibacteric-P odporúčaná výrobcom. Pasážovaním kmeňov pri 37 °C k výraznej zmene dochádza po 3-násobnom pasážovaní len u kmeňa *Proteus mirabilis*,
- získané vysoko rezistentné kmene *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* a *Proteus mirabilis* sú schopné rásť až v 35 %-nom roztoku Antibacteric-P v kultivačnom médiu už po 6-násobnom pasážovaní pri teplote 24 °C, kmeň *Proteus mirabilis* dokonca už po 5-násobnom pasážovaní,
- sekundárna rezistencia G<sup>-</sup> baktérií na Antibacteric-P je reverzibilná,
- u kmeňov baktérií so získanou rezistenciou na Antibacteric-P sme nezistili krížovú rezistenciu na testované dekontaminačné prostriedky na báze KAZ (Ajatín a Septonex),
- overované dekontaminačné prostriedky na báze aktívneho chlóru, peroxidu vodíka a koloidného striebra (Savo Super, Desana, Persteril a Sanosil Super) na kmeňoch pôvodných a kmeňoch so získanou rezistenciou na Antibacteric-P potvrdili ich dobrý mikrobicídny účinok, a tým aj ich vhodnosť na dlhodobé používanie v dezinfekčnom procese a na striedanie s prostriedkami na báze KAZ.

Získanými výsledkami sme potvrdili dobrý baktericídny účinok dekontaminačného prostriedku Antibacteric-P, ale vzhľadom na rýchly vznik sekundárnej rezistencie reverzibilného typu u všetkých testovaných kmeňov baktérií, je Antibacteric-P vhodný len na krátkodobú aplikáciu v procese dekontaminácie. Minimálne po ukončení tretieho dekontaminačného cyklu je nutné nahradiť Antibacteric-P dekontaminačným prostriedkom s vysokým mikrobicídnym účinkom na báze inej, ako sú KAZ, pretože pravdepodobnosť vzniku krížovej rezistencie na KAZ je dosť vysoká a môže sa prejaviť u iných kmeňov alebo druhov G<sup>-</sup> baktérií prítomných v rôznych prevádzkach potravinárskeho priemyslu.



*Zoznam skratiek:*

- KAZ - kvartérne amóniové zlúčeniny
- DP - dekontaminačné prostriedky
- MIC - minimálna inhibičná koncentrácia
- MBC - minimálna baktericídna koncentrácia v minimálnom (vodnom) prostredí
- MBC-B - minimálna baktericídna koncentrácia s bielkovinovou záťažou

*Abbreviations list:*

- KAZ - quaternary ammonium salts
- DP - decontamination agents
- MIC - minimum inhibitory concentration
- MBC - minimum bactericidal concentration in water medium
- MBC-B - minimum bactericidal concentration in medium loaded with protein

## Literatúra

1. HEJZLAR, M. - HYLMAR, B. - TEPLÝ, M.: Antibiotika. 1. vyd. Praha : SNTL 1980. 272 s.
2. KURZOVÁ, V.: Studium rezistence mikroorganizmů vůči desinfekčním prostředkům. Kvasný průmysl, 34, 1988, s. 37-39.
3. VOLNÁ, F.: Štúdium rezistencie mikroorganizmov na dezinfekčné látky. Acta hygienica, epidemiologica et microbiologica, 12, 1982, príloha 1, s. 58-60.
4. MELICHERČÍKOVÁ, V.: Citlivost *Pseudomonas aeruginosa* k některým desinfekčním prostředkům. Acta hygienica, epidemiologica et microbiologica, 2, 1980, s. 56-60.
5. KRÉBES, T. - SÁSIK, M.: Sanitácia v potravinárstve. Bratislava : ALFA 1978. 188 s.
6. BOLEK, S. a kol.: Desinfekce, sterilizace a režim v prevenci nozokomiálních nákaz. Praha : Avicenum 1984. 388 s.
7. KNEIFLOVÁ, J.: Standardní metody pro hodnocení desinfekční účinnosti chemických látek. Acta hygienica, epidemiologica et microbiologica, 15, 1985, příloha 1, s. 2-20.
8. MROZEK, H.: Untersuchungen zum Problem der Resistenzentwicklungen gegenüber Desinfektionsmitteln. Brauwissenschaft, 20, 1967, s. 225-234.
9. PYLE, B. H. - WATTERS, G. A.: Physiological aspects of disinfection resistance in *Pseudomonas cepacia*. Journal of Applied Bacteriology, 76, 1994, s. 142-148.
10. NICOLETTI, G. - BOGHOSIAN, V. - GUREVITCH, F. - BORLAND, R.: The antimicrobial activity in vitro of chlorhexidine, a mixture of izothiazolinones (kathon CG and cetyltrimethylammonium bromide (CTAB). Journal of Hospital Infection, 23, 1993, s. 87-111.
11. ARROYO, G. - ARROYO, J. A.: Selective action of inhibitors used in different culture media on the competitive microflora of *Salmonella*. Journal of Applied Bacteriology, 78, 1995, s. 281-289.
12. SAKAGAMI, Y. - YOKOYAMA, H. - NISHIMURA, H.: Mechanism of resistance to benzalkonium chloride by *Pseudomonas aeruginosa*. Applied and Environmental Microbiology, 55, 1989, s. 2036-2040.
13. SAKAGAMI, Y. - YOKOYAMA, H. - NISHIMURA, H.: The mechanism of resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to chlorhexidine digluconate. Journal of Antibacterial and Antifungal Agents, 17, 1989, s. 153-160.
14. ADAIR, F. W. - GEFTIC, S. G. - GELZER, J.: Resistance of *Pseudomonas* to quaternary ammonium compounds. Applied Microbiology, 18, 1969, s. 299-302.

15. ADAIR, F. W. - GEFTIC, S. G. - GELZER, J.: Resistance of *Pseudomonas* to quaternary ammonium compounds II. *Applied Microbiology*, 21, 1971, s. 1058-1063.
16. KRAMER, V. C. - NICKERSON, K. W.: Prevalence of extreme detergent. Resistance among the *Enterobacteriaceae*. *Canadian Journal of Microbiology*, 30, 1984, s. 711-713.
17. HOFF, J. C. - AKIN, E. W.: Microbial resistance to disinfectants: mechanisms and significance. *Environmental Health Perspectives*, 69, 1986, s. 7-13.

Do redakcie došlo 30.12.1998.

#### **Secondary resistance of microorganisms against decontamination agent Antibacteric-P**

RUŽIČKOVÁ, A. - MAJERÍKOVÁ, I.: *Bull. potrav. Výsk.*, 38, 1999, p. 67-83.

SUMMARY. Resistance of microorganisms against decontamination agents represents the most significant problem of sanitation. It usually comes into existence in form of resistance against agents which contain quaternary ammonium salts (QAS) as the effective compounds. It was proved in this study. The values of the minimum inhibitory concentrations (MIC) of all tested bacterial strains increased substantially just against the agent Antibacteric-P, that is based on QAS. The results point out a need to interchange the QAS-decontamination agents with other ones owing a distinctive bactericidal effect.

KEYWORDS: decontamination; resistance; quaternary ammonium compounds