

# Možnosti bakteriofágů pro testování antivirální účinnosti desinfekcí

Terezie Kubingerová

---

Bakalářská práce  
2022



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

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

Akademický rok: 2021/2022

# ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Terezie Kubingerová**  
Osobní číslo: **T19632**  
Studijní program: **B0711A130009 Materiály a technologie**  
Specializace: **Biomateriály a kosmetika**  
Forma studia: **Prezenční**  
Téma práce: **Možnosti bakteriofágů pro testování antivirální účinnosti desinfekcí.**

## Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši se zaměřením na antimikrobní testování s využitím bakteriofágů, jako náhradou za viry. Zaměřte se především na testování desinfekcí.
2. Na základě rešerše navrhnete modifikaci vhodné normy (popř. zavedených postupů) pro testování antimikrobní účinnosti desinfekcí pomocí bakteriofágů.
3. V praktické práci aplikujte získané informace na konkrétní metody.
4. Získaná data přehledně zpracujte a kriticky zhodnoťte použitelnost a vhodnost metodik.

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

**Seznam doporučené literatury:**

- [1] KUTTER, Elizabeth a Alexander SULAKVELIDZE, 2004. Bacteriophages: Biology and Applications. CRC Press. ISBN 9780849313363
- [2] LYTLE, C D, W TRUSCOTT, A P BUDACZ, L VENEGAS, L B RUTSON a W H CYR. Important factors for testing barrier materials with surrogate viruses. Applied and Environmental Microbiology [online]. 1991, 57(9), 2549-2554 [cit. 2021-02-26]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.57.9.2549-2554.1991
- [3] TURGEON, Nathalie, Marie-Josée TOULOUSE, Bruno MARTEL, Sylvain MOINEAU, Caroline DUCHAINE a M. V. YATES. Comparison of Five Bacteriophages as Models for Viral Aerosol Studies. Applied and Environmental Microbiology [online]. 2014, 80(14), 4242-4250 [cit. 2021-02-26]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.00767-14
- [4] RHEINBABEN, F.v., S. SCHÜNEMANN, T. GROSS a M.H. WOLFF. Transmission of viruses via contact in a household setting: experiments using bacteriophage  $\phi$ X174 as a model virus. Journal of Hospital Infection [online]. 2000, 46(1), 61-66 [cit. 2021-02-26]. ISSN 01956701. Dostupné z: doi:10.1053/jhin.2000.0794
- [5] FEDORENKO, Aliza et al., 2020. Survival of the enveloped bacteriophage Phi6 (a surrogate for SARS-CoV-2) in evaporated saliva microdroplets deposited on glass surfaces. Scientific Reports [online]. 10(1) [cit. 2021-02-26]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-020-79625-z
- [6] WOOLWINE, J D a J L GERBERDING, 1995. Effect of testing method on apparent activities of antiviral disinfectants and antiseptics. Antimicrobial Agents and Chemotherapy [online]. 39(4), 921-923 [cit. 2021-02-26]. ISSN 0066-4804. Dostupné z: doi:10.1128/AAC.39.4.921
- [7] Časopisecká a knižní zdroje dostupné prostřednictvím knihovny UTB ve Zlíně.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Hana Pištěková, Ph.D.**  
Centrum polymerních systémů

Datum zadání bakalářské práce: **25. února 2022**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **20. května 2022**

L.S.

---

**prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.**  
děkan

---

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

## PROHLÁŠENÍ AUTORA BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

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

### Prohlašuji,

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

Ve Zlíně, dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....  
podpis studenta

## **ABSTRAKT**

V posledních letech se v oblasti mikrobiologického testování stále častěji upírá pozornost na využití bakteriofágů, coby možné alternativy nákladných a v neposlední řadě také hůře dostupných antivirálních testů využívajících živočišných virů. Teoretická část bakalářské práce se zabývá obecnou charakteristikou bakteriofágů a dále také popisuje výhody i úskalí jejich využití na pozici substituentů běžně se vyskytujících živočišných virů při laboratorních testech. Náplní praktické části bylo modifikovat normu ČSN EN 1040 (Chemické desinfekční přípravky a antiseptika), s cílem zavést ucelený postup umožňující základní testování účinnosti desinfekčních přípravků s využitím bakteriofágů a následně modifikovanou metodu otestovat na několika vybraných desinfekčních přípravcích za využití dvojice bakteriofágů – obaleného  $\phi 6$  a neobaleného  $\phi X174$ .

Klíčová slova: bakteriofág,  $\phi 6$ ,  $\phi X174$ , desinfekce, ČSN EN 1040

## **ABSTRACT**

In recent years, attention has been increasingly aimed at microbiological testing using bacteriophages as possible alternatives to expensive and, last but not least, less widely available antiviral tests using mammalian viruses. The theoretical part of the bachelor thesis is focused on the general characteristics of bacteriophages. Also, it describes the advantages and disadvantages of their use as a substituent for common mammalian viruses in laboratory tests. The content of the practical part was to modify the standard ČSN EN 1040 (Chemical disinfectants and antiseptics) in order to introduce a comprehensive procedure enabling basic testing effectiveness of disinfectants using the bacteriophages and subsequently test the modified method on several selected disinfectants utilizing a pair of bacteriophages – enveloped  $\phi 6$  and non-enveloped  $\phi X174$ .

Keywords: bacteriophage,  $\phi 6$ ,  $\phi X174$ , disinfection, ČSN EN 1040

Na tomto místě bych ráda poděkovala všem, kteří mi při realizaci bakalářské práce pomohli. Velké poděkování patří zejména vedoucí práce paní Ing. Haně Pištěkové, Ph.D. a to nejen za její odborné vedení, všechny cenné rady a připomínky, díky kterým jsem mohla tuto práci zkompletovat, ale také za její ochotu, trpělivost, čas a za důvěru, kterou ve mě vložila. Dále bych chtěla poděkovat celému kolektivu mikrobiologické laboratoře Centra polymerních systémů za umožnění příjemné spolupráce a za veškerou jejich pomoc při realizaci praktické části práce. V neposlední řadě patří velké poděkování mé rodině, která mi během celé doby studia byla oporou a vždy mě v mých studijních plánech podpořila, a především mi také studium umožnila.

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

# OBSAH

|   |           |
|---|-----------|
| <b>ÚVOD</b> .....   | <b>9</b>  |
| <b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....  | <b>10</b> |
| <b>1 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA BAKTERIOFÁGŮ</b> .....  | <b>11</b> |
| 1.1    OBJEVENÍ BAKTERIOFÁGŮ.....   | 11        |
| 1.2    VÝSKYT BAKTERIOFÁGŮ .....  | 12        |
| 1.2.1    Výskyt bakteriofágů v oblasti technologií a průmyslu .....                       | 13        |
| 1.3    OBECNÝ POPIS STAVBY BAKTERIOFÁGŮ .....   | 13        |
| 1.3.1    Nukleová kyselina .....  | 14        |
| 1.3.2    Proteinový obal (kapsid) .....   | 14        |
| 1.4    ŽIVOTNÍ CYKLUS BAKTERIOFÁGŮ.....   | 15        |
| 1.4.1    Lytický cyklus .....   | 16        |
| 1.4.2    Lyzogenní cyklus .....   | 17        |
| 1.4.3    Transdukce .....   | 17        |
| 1.5    VÝZNAM BAKTERIÁLNÍCH STRUKTUR Z HLEDISKA FÁGOVÉ INFEKCE .....                      | 18        |
| 1.5.1    Cytoplazmatická membrána.....  | 18        |
| 1.5.2    Buněčná stěna.....   | 18        |
| 1.6    KLASIFIKACE BAKTERIOFÁGŮ .....   | 19        |
| 1.6.1    Historie klasifikace.....  | 19        |
| 1.6.2    Současná klasifikace .....   | 19        |
| 1.6.3    Polyedrické bakteriofágy .....   | 21        |
| <b>2 MOŽNOSTI VYUŽITÍ BAKTERIOFÁGŮ</b> .....  | <b>23</b> |
| 2.1    BAKTERIOFÁGY JAKO VEKTORY PŘI KLONOVÁNÍ .....                                      | 23        |
| 2.2    BAKTERIOFÁGOVÁ TERAPIE .....   | 23        |
| 2.3    BAKTERIOFÁGY JAKO SUBSTITUENTY ŽIVOČIŠNÝCH VIRŮ PŘI<br>LABORATORNÍCH TESTECH ..... | 24        |
| 2.3.1    Výběr bakteriofágů do role substituentů .....                                    | 25        |
| 2.3.2    Studie provedené ve vodním prostředí.....  | 27        |
| 2.3.3    Studie provedené na površích .....   | 27        |
| 2.3.4    Studie zabývající vlivem desinfekčních prostředků na viry.....                   | 30        |
| <b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....  | <b>35</b> |
| <b>3 CÍL PRÁCE</b> .....  | <b>36</b> |
| <b>4 METODIKA A MATERIÁLY</b> .....   | <b>37</b> |
| 4.1    POUŽITÉ VYBAVENÍ A PŘÍSTROJE.....  | 37        |
| 4.2    POUŽITÁ MÉDIA A AGARY .....  | 37        |
| 4.3    POUŽÍVANÉ MIKROORGANISMY .....   | 38        |
| 4.4    SPECIFIKACE TESTOVANÝCH DESINFEKČNÍCH PROSTŘEDKŮ.....                              | 39        |
| 4.4.1    SAVO Čistič na podlahy .....   | 39        |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 4.4.2    | Incidin OxyDes .....  | 39        |
| 4.4.3    | SPURTEX® Unisanol.....  | 40        |
| 4.4.4    | Desur a Dezox .....   | 40        |
| 4.4.5    | Sanytol.....  | 41        |
| 4.4.6    | SAVO Original.....  | 41        |
| 4.5      | METODIKA – MODIFIKACE NORMY ČSN EN 1040.....  | 42        |
| 4.5.1    | Norma ČSN EN 1040 Chemické desinfekční přípravky a antiseptika .....                    | 42        |
| 4.5.2    | Příprava bakteriální hostitelské kultury .....  | 42        |
| 4.5.3    | Stanovení titru bakteriofágů v testovacích suspenzích (lyzátech) .....                  | 43        |
| 4.5.4    | Příprava desinfekčních přípravků k testování .....                                      | 44        |
| 4.5.5    | Testování účinnosti desinfekčních přípravků stanovením fágové koncentrace .....         | 44        |
| 4.5.6    | Validace metody.....  | 46        |
| <b>5</b> | <b>VÝSLEDKY A DISKUZE.....</b>  | <b>49</b> |
| 5.1      | TEST CITLIVOSTI BAKTERIOFÁGŮ NA ČINIDLA POUŽÍVANÁ DLE DOPORUČENÍ NORMY ČSN EN 1040..... | 49        |
| 5.1.1    | Výsledky testu citlivosti pro bakteriofága $\phi 6$ .....                               | 50        |
| 5.1.2    | Výsledky testu citlivosti pro bakteriofága $\phi X174$ .....                            | 51        |
| 5.2      | VALIDACE METODY DLE MODIFIKOVANÉ NORMY ČSN EN 1040 .....                                | 52        |
| 5.2.1    | Validace A.....   | 52        |
| 5.2.2    | Validace B.....   | 52        |
| 5.2.3    | Validace C .....  | 52        |
| 5.2.4    | Výsledky validace pro bakteriofága $\phi 6$ .....                                       | 52        |
| 5.2.5    | Výsledky validace pro bakteriofága $\phi X174$ .....                                    | 55        |
| 5.2.6    | Shrnutí validačních testů .....   | 57        |
| 5.3      | TESTY ÚČINNOSTI DESINFEKČNÍCH PROSTŘEDKŮ DLE MODIFIKOVANÉ NORMY ČSN EN 1040 .....       | 58        |
| 5.3.1    | Výsledky testu účinnosti pro bakteriofága $\phi 6$ .....                                | 58        |
| 5.3.2    | Výsledky testu účinnosti pro bakteriofága $\phi X174$ .....                             | 61        |
| <b>6</b> | <b>ZÁVĚR.....</b>   | <b>67</b> |
|          | <b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>   | <b>69</b> |
|          | <b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>  | <b>74</b> |
|          | <b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>   | <b>76</b> |
|          | <b>SEZNAM TABULEK.....</b>  | <b>77</b> |



## ÚVOD

Tato bakalářská práce pojednává o bakteriofázích v roli substituentů živočišných virů. Bakteriofágy zahrnují velké množství zástupců a vykazují také morfológickou podobnost s viry, to vše napomáhá výběru vhodných kandidátů pro tuto oblast jejich využití. Jedním ze zásadních významů substituce virů bakteriofágy je snížení bezpečnostních rizik při prováděných laboratorních testech. Práce s viry vyžaduje zvýšené nároky na bezpečnost a s tím jsou spojeny i vyšší náklady na odpovídající vybavení pracovišť i samotných pracovníků. Substituce je výhodná i z hlediska zkrácení doby testování, provádění klasických antivirálních zkoušek je totiž časově a často i technicky více náročné. Z výše jmenovaných důvodů je zřejmé, že požadovaný virus/patogen není vždy možné snadno prozkoumat. Stručný výčet některých omezení spojených s „klasickými“ antivirálními testy poukazuje na užitečnost substituce fágy z hlediska snadnějšího a dostupnějšího získávání výsledků.

Testy s bakteriofágy mohou být prováděny za účelem orientačního hodnocení chování nahrazovaných virů za různých podmínek a v různých prostředích. Každá aplikace má své specifické parametry, výběr vhodného substituentu se často odvíjí od podmínek, které při testování mají panovat. Pojem virus je v současné době často skloňován ve spojitosti s pandemií onemocnění covid-19, která udeřila v celosvětovém měřítku a zásadně ovlivnila naše životy. Snaha o získávání poznatků týkajících se šíření viru SARS-CoV-2 vedla ke zvýšení poptávky po antivirálním testování a v reakci na popisovanou situaci vzrostlo také množství odborných článků zaměřených na nalezení takových fágových substituentů, jenž budou svými vlastnostmi umožňovat zavedení alternativních metod testování v této oblasti.

Praktická část bakalářské práce je zaměřena na testování účinnosti desinfekčních prostředků za využití dvojice bakteriofágů – obaleného bakteriofága  $\phi 6$  a neobaleného bakteriofága  $\phi X174$ . Pracovní postup pro testování vybraných desinfekčních přípravků byl přejet z normy ČSN EN 1040 (Chemické desinfekční přípravky a antiseptika), která upravuje stanovení základního baktericidního účinku u testovaných desinfekčních přípravků. Postupy z normy byly modifikovány a přizpůsobeny pro práci s bakteriofágy jako testovacími mikroorganismy. Osvojení nových mikrobiologických technik při práci s bakteriofágy pro mě bylo základní motivací k volbě tohoto tématu, dalším důvodem byla také aktuálnost této problematiky vzhledem k pandemii onemocnění covid-19.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA BAKTERIOFÁGŮ

Viry, včetně bakteriofágů, jsou považovány za nitrobuněčné parazity, jejichž životní procesy jsou zprostředkovávány napadenými hostiteli. Mohou se replikovat, vyvíjet a přizpůsobovat podmínkám prostředí, ale přesto nemohou být považovány za živé organismy, jelikož nedisponují schopností generovat či uchovávat energii. Svým působením ovšem významně ovlivňují evoluci živých systémů, prostřednictvím jejich interakce s buňkami ovlivňují genetické procesy a s tím spojený vývoj nových forem života. Představují všudypřítomnou, rozmanitou a ekologicky významnou součást životního prostředí. Jejich množství na Zemi je odhadováno až jako  $10^{31}$ , z čehož většinu tvoří bakteriofágy (zkráceně fágy), tedy viry napadající bakterie. [1; 2]

Bakteriofágy jsou velmi rozsáhlou skupinou nebuněčných organismů – virů, jejichž hostitelskými organismy jsou bakteriální buňky. Bakteriofágy disponují kompletní informací o své reprodukci, realizace a následná tvorba nových virionů je ovšem zcela závislá na energii, organelách a prostředí, které poskytuje hostitel – vhodná bakterie. Bakteriofágy jsou nedílnou součástí téměř každého prostředí, vyskytují se ve vodách, půdě či jako asociovaná součást mikrobiomu živočichů a svým působením napomáhají k udržování rovnováhy mikrobiálních komunit. Většina bakteriofágů je charakteristická tzv. binární symetrií, kdy se jejich kapsid skládá z hlavičky a bičíku, menší část zástupců vykazuje i jiné typy symetrie kapsidy. [3]

### 1.1 Objevení bakteriofágů

První zmínky pravděpodobně související s výskytem bakteriofágů, vycházejí z poznatků anglického bakteriologa a přírodovědce E. H. Hankina. Ten roku 1896 informoval o antibakteriální aktivitě pozorované ve vodách řek Ganga a Jamuna v Indii. Ruský bakteriolog N. F. Gamaleya zaznamenal podobný fenomén při práci s *Bacillus subtilis* o dva roky později. Žádný z těchto badatelů se pozorovanému jevu dále nevěnoval a pravá příčina zůstala neobjasněna. [4]

První odbornou publikaci týkající se bakteriofágů zveřejnil roku 1915 britský časopis *The Lancet*, článek napsaný F. Twortem popisoval bakteriální lýzu pozorovanou u kolonií *Staphylococcus*. Twort ovšem zprostředkoval pouze popis, nikoli vysvětlení. [5]

Za oficiálního objevitele bakteriofágů je považován francouzsko-kanadský mikrobiolog F. d'Hérelle, který roku 1917 bakteriofágy pojmenoval a dospěl k závěru, že patří mezi

tzv. ultraviry. F. d'Hérelle je také průkopníkem v oblasti fágové terapie. Na základě pozorování nárůstu počtu bakteriofágů ve stolici pacientů uzdravujících se z bakteriální úplavice usoudil, že právě fágy přispívají k zotavení a začal se zabývat možností jejich využití při léčbě bakteriálních chorob. S využitím této metody pak d'Hérelle vyléčil několik pacientů s těžkým průběhem dyzentérie (úplavice), jejímž původcem jsou bakterie rodu *Shigella*. [6]

## 1.2 Výskyt bakteriofágů

Bakteriofágy jsou považovány za nejrozšířenější skupinu organismů na planetě. Jejich výskyt je ovlivňován přítomností vhodných bakteriálních hostitelů. V každém z prozkoumaných ekosystémů hrají klíčovou roli v regulaci mikrobiální aktivity. V přírodních mikrobiálních systémech se významně podílejí na jejich dynamičnosti a genetické diverzitě prostřednictvím procesů jako je například horizontální genový transfer, dále mají vliv také na průběh biogeochemických cyklů. V případě nepřítomnosti vnímavého hostitele v okolí je řada bakteriofágů schopna uchovat si svoji infekční schopnost až po celá desetiletí. [3; 7]

Fágy jsou hojně zastoupeny v oblastech s vysokou bakteriální aktivitou, můžeme je nacházet ve splešcích, v půdě, termálních oblastech, vodních plochách či jako asociovanou součást živých organismů – např. součást mikrobiomu střev, dutiny ústní či vagíny. [3]

Prostředím bohatým na bakteriofágy jsou především oceány. Fágy jsou v oceánech přítomny jak v povrchových vodách, tak i ve velkých hloubkách, jejich výskyt byl pozorován dokonce i v jeho zmrzlých částech. V oceánském sedimentu byla zaznamenána ještě vyšší koncentrace bakteriofágů než v běžném vodním sloupci a udává se jako  $10^9$  částic fága v 1 mililitru sedimentu. Vyhodnocení distribuce bakteriofágů v suchozemském ekosystému je problematičtější disciplínou, testy provedené s využitím elektronové mikroskopie udávají jejich koncentraci řádově jako  $10^7$  částic fága v 1 gramu půdy. [3]

Také organismus savců je osídlen velkým množstvím mikroorganismů, jejichž přítomnost a rovnováha hrají důležitou roli v udržování jeho správné funkce. Známým příkladem je střevní mikrobiom, v němž se nacházejí všechny ze tří domén buněčného života – *Bacteria*, *Archea* i *Eukarya*. I zde je přítomnost bakterií spojena s výskytem jejich typických fágových komunit. Vysoká koncentrace fágů v trávicím traktu je charakteristická zejména pro přežvýkavce, ve výkalech ovcí a skotu je jejich koncentrace řádově udávána až jako  $10^9$  částic fága v 1 gramu výkalů. Přítomnost fágů byla prokázána dokonce i u bezobratlých

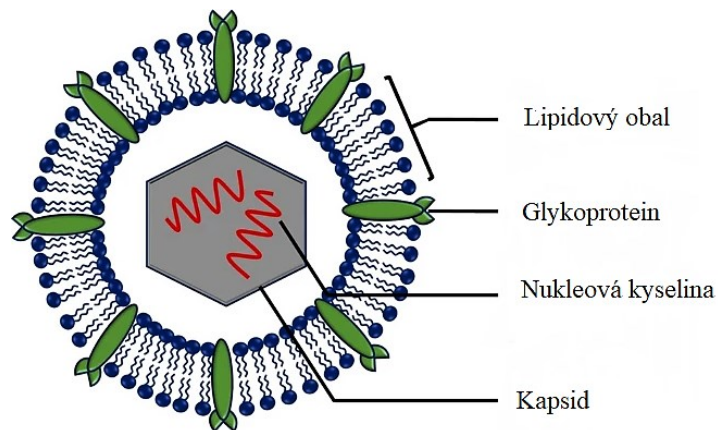
živočichů – žížal, včel, much či slávek. S ohledem na tato fakta je diskutována možnost využití bakteriofágů jako jednoho z možných indikátorů fekálního znečištění, odlišné zastoupení fágů ve zvířecích a lidských výkalech by mohlo vést ke snadnějšímu rozlišení zdroje fekální kontaminace v životním prostředí. [3; 8]

### 1.2.1 Výskyt bakteriofágů v oblasti technologií a průmyslu

Pro řadu biotechnologických procesů založených na bakteriálním působení je výskyt fágů negativní. Bakteriofágová infekce představuje hrozbu především pro průmyslová odvětví založená na bakteriálně zprostředkovaném procesu fermentace – např. v potravinářství (produkce jogurtů, sýrů, fermentovaného mléka, zakysané smetany, kvašené zeleniny atd.), dále je na proces fermentace vázána i velká část produkce kyseliny hyaluronové či mléčné, které patří mezi významné aktivní ingredience využívané v kosmetickém, ale také ve farmaceutickém průmyslu. Z důvodu hrozby kontaminačního rizika, vedoucího k poklesu produkce a následným ztrátám zisku, je pro tento typ průmyslových výrob důležité dbát na sledování distribuce fágů ve vlastních prostorách a současně i blízkém okolí či v dodávaných surovinách. Detekce virulentních fágů je založena na využití běžně dostupných mikrobiologických metod, příkladem mohou být plakové testy nebo sledování bakteriální aktivity. Pokud je fágová kontaminace potvrzena, následuje proces identifikace jejího zdroje. Je rozlišováno mezi tzv. endogenním (přítomnost profága) a exogenním (přítomnost fágů v surovinách či prostředí) zdrojem infekce. Dalším významným aspektem je také volba vhodných startovacích bakterií, respektive jejich kombinací, tak aby se nepřekrývala jejich citlivost k fágům. Pro zvládnání fágové problematiky ve zmiňovaných provozech je nejčastěji využíván systém rotace startovacích bakteriálních kmenů. Další z možných cest je vytvoření rezistentních startovacích kmenů. [3]

## 1.3 Obecný popis stavby bakteriofágů

Bakteriofágy jsou podobně jako všechny ostatní viry nebuněčnými částicemi, tudíž nedisponují ve své stavbě žádnými organelami, to také podmiňuje jejich parazitický způsob života. Bakteriofágy jsou velmi rozsáhlou skupinou, to je také důvodem rozmanitosti v jejich stavbě. Obecně můžeme jednotlivé fágové částice (viriony) popsat jako tzv. nukleoproteinové komplexy. V základu jejich struktura zahrnuje genetickou informaci, uloženou v sekvenci nukleotidů tvořících buďto DNA nebo RNA, obklopenou vnějším proteinovým pouzdem – kapsidem. U obalených fágů přibývá do struktury vnější lipidový plášť fosfolipidové povahy, schématické zobrazení stavby viru je patrné na obrázku 1. [3]



Obrázek 1 Schématické znázornění stavby viru – upraveno [9]

### 1.3.1 Nukleová kyselina

Nukleová kyselina je pro viry místem uložení zejména strukturálních genů, jež kódují proteiny kapsidu. Podoba virového chromozomu může být lineární nebo cirkulární. U bakteriofágů a virů obecně se setkáváme s netypickými variantami uspořádání nukleové kyseliny, kterými jsou jednovláknová DNA (ssDNA) a dvouvláknová RNA (dsRNA), dále může být nositelem virové genetické informace také jednovláknová RNA (ssRNA) či dvouvláknová DNA (dsDNA). U ssRNA virů je navíc rozlišováno mezi tzv. negativní (-) a pozitivní (+) formou. Většina dsDNA virů obsahuje jedinou molekulu nukleové kyseliny utvářející genom, zatímco velká část ssRNA a dsRNA virů se vyznačuje jevem tzv. segmentace genomu, kdy je genom daného viru složen z více nehomologických genoforů. [10; 11]

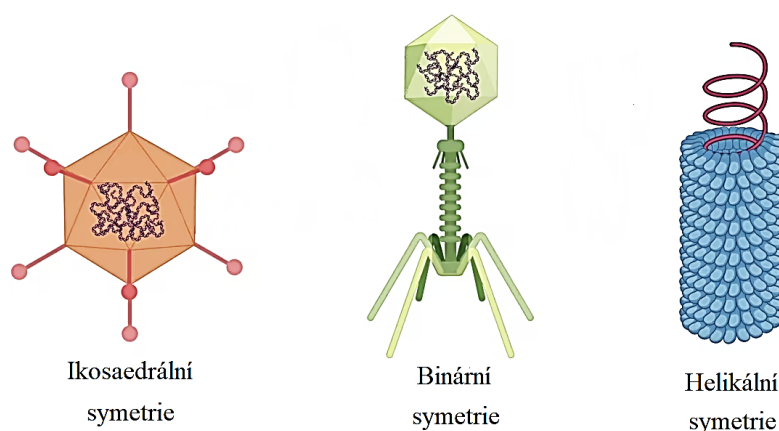
### 1.3.2 Proteinový obal (kapsid)

Genetická informace bakteriofágů (a virů obecně) je chráněna pláštěm proteinového charakteru. Tato struktura je utvářena velkým množstvím logicky uspořádaných proteinových jednotek. Virový kapsid není ve svém složení příliš variabilní, obvykle se jedná o opakující se kompozici jednoho, nanejvýš několika proteinů. Tento typ uspořádání je významný z hlediska efektivního využití genetické informace, kdy tvorbu kapsidu zajišťuje jen malý počet genů. Současně se jedná i o úsporné opatření, jelikož kapsid je schopen pojmout jen omezené množství DNA nebo RNA. Uspořádání virového kapsidu se vyznačuje určitou hierarchií. Základní strukturální jednotky se nazývají protomery, jedná se o polypeptidové řetězce seskupené do nadmolekulárních útvarů, jejich spojením vznikají kapsomery – morfologické jednotky utvářející kapsid. [12]

### *Základní typy uspořádání virové kapsidy*

Geometrické tvary virových kapsid jsou značně rozmanité, mají různé velikosti a také se liší svým biomolekulárním složením. Rozvoj metod strukturální analýzy, jako je rentgenová krystalografie či kryoelektronová mikroskopie, umožnil výrazný pokrok v oblasti studia virových struktur. Znalost struktury patogenních virů hraje zásadní roli při pochopení mechanismů sestavování kapsidy, dále vypovídá o antigenním vybavení či o možnostech interakce s buněčnými receptory, všechny tyto informace jsou významné pro terapeutické účely. [13]

Virové kapsidy můžeme podle jejich uspořádání rozdělit do dvou základních skupin, a to na helikální (šroubovicové, tyčinkovité) a ikosaedrální (dvacetistěnné). Kapsidy kombinující ve své stavbě oba typy uspořádání nazýváme jako komplexní neboli jako kapsidy s binární symetrií. Binární symetrie je typická pro bakteriofágy tvořené hlavičkou a bičíkem, kdy ikosaedrální symetrii vykazuje hlavička a helikální symetrie připadá na bičík, typickým příkladem takového uspořádání je bakteriofág T4. Schématické znázornění základních typů symetrie virové kapsidy je patrné z obrázku 2. [10]



*Obrázek 2 Symetrie virové kapsidy – upraveno [14]*

## **1.4 Životní cyklus bakteriofágů**

V životním cyklu virů je možno rozlišovat mezi 2 fázemi, a to mezi životem mimo hostitelské buňky a životem uvnitř těchto buněk. Jak již bylo zmíněno, bakteriofágy jsou skupinou virů infikují bakteriální buňky, jakožto prosté nukleoproteinové částice nejsou schopny samostatně generovat energii a nedisponují ani proteosyntetickým aparátem. Hostitelská bakteriální buňka je tedy absolutním zprostředkovatelem vzniku nových virionů. Předpokladem pro infekci bakteriální buňky je její vnímavost k příslušnému typu fága.

To je dáno přítomností specifických receptorů umístěných na povrchu bakterií, umožňujících adsorpci fága nosícího odpovídající protein na svém kapsidu nebo lipidovém obalu (obalené viry). [11]

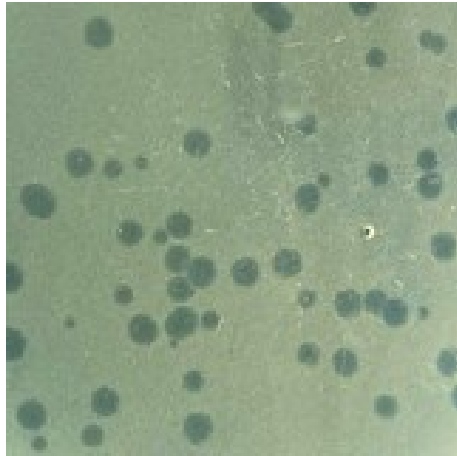
Přesný průběh a mechanismus infekce bakteriální buňky se liší v závislosti na typu a struktuře bakteriofága. Obecně může být jejich životní cyklus a tvorba nových virionů popsána v několika krocích. Adsorpce virionu zahrnuje jeho navázání na povrch hostitelské buňky, fág poté plynule přechází do fáze penetrace, při níž dochází k enzymatickému narušení bakteriální buněčné stěny, což umožňuje následné proniknutí/injektáž genomu fága dovnitř (ostatní části fága zůstávají vně hostitelské buňky). V dalším kroku nastává replikace virového genomu a syntéza bílkovin, přičemž z nově vzniklých komponent jsou utvářeny jednotlivé viriony (maturace – dozrávání), které opouštějí hostitelskou buňku (eluce). Pokud není žádná z těchto fází přerušena, hovoříme o lytickém cyklu, který vede k zániku hostitelské buňky, tento proces mají na svědomí tzv. virulentní fágy. Infekce hostitelské buňky může probíhat i latentní způsobem, nejčastěji za vzniku profága, tento způsob infekce navozují tzv. mírné (temperované) fágy. [10; 15]

#### 1.4.1 Lytický cyklus

Při lytickém cyklu dochází k ovládnutí metabolismu hostitelské bakterie fágem, který následně řídí syntézu nových virových částic. Raným produktem transkripce a translace virového genomu jsou nukleázy, jejichž úkolem je degradace hostitelské nukleové kyseliny, důvodem je získání přednosti pro průběh proteosyntézy a replikace nukleové kyseliny fága. Během lytického cyklu mohou být v jedné hostitelské buňce syntetizovány až stovky nových virionů. Lytický cyklus je završen rozpadem hostitelské bakteriální buňky s následným uvolněním nově vzniklých virionů. [16]

K lýze nejčastěji dochází u mladých bakteriálních buněk, nejvhodnější jsou buňky na počátku exponenciální fáze růstu. V tekutých hostitelských kulturách je bakteriální lýza identifikována vymizením charakteristického zákalu. Při zaočkování fágové suspenze na tuhé médium spolu s hostitelskou kulturou je projevem bakteriální lýzy tvorba plaků, jejichž velikost a vzhled se liší podle druhu fága. Plaky mají podobu projasněných kruhových zón v souvislém bakteriálním nárůstu, podobu plaků obaleného bakteriofága  $\phi 6$  zachycuje obrázek 3. Titr použité suspenze, respektive počet aktivních fágových částic, se stanovuje spočítáním vzniklých plaků, toto číslo je následně přepočítáno na hodnotu PFU/ml (plaque forming units per milliliter). [15]





Obrázek 3 Plaky bakteriofága  $\phi 6$

### 1.4.2 Lyzogenní cyklus

Lyzogenní cyklus se vyznačuje latentním průběhem infekce. Příkladem typického temperovaného fága způsobujícího latentní infekci je bakteriofág  $\lambda$ . Obdobně jako u lytického cyklu, tak i v tomto případě, dochází nejprve k adsorpci viru a k penetraci jeho nukleové kyseliny dovnitř hostitelské buňky. V dalším kroku ovšem nenastává tvorba nových virionů. Vstup do lyzogenního cyklu započíná v okamžiku integrace nukleové kyseliny fága do chromozomu hostitelské bakteriální buňky za vzniku tzv. profága. Nukleová kyselina viru integrovaná s chromozomem hostitele může být dále replikována a ve formě profága předávána nově vzniklým dceřiným buňkám. Virové geny se v tomto stádiu neprojevují, tím pádem nedochází k poškození napadených buněk. Vlivem určitých faktorů (např. fyzikálních či chemických) může nastat přerušení tvorby represorového proteinu zajišťujícího umlčení fágových genů. Následkem je poté vyčlenění nukleové kyseliny fága z chromozomu hostitele a zahájení lytického cyklu vedoucího k zániku hostitelské buňky. [11; 16]

### 1.4.3 Transdukce

Bakteriofágy zprostředkovaná transdukce patří mezi jeden z mechanismů rekombinace zajišťujících genetickou rozmanitost u bakterií. Tento proces má významné postavení z hlediska bakteriální evoluce. Transdukce se řadí k základním mechanismům horizontálního přenosu genetické informace, spočívá v přenosu části genetické informace z donorové do recipientní buňky, aniž by recipientní buňka musela být potomkem buňky donorové. [3; 15]

## 1.5 Význam bakteriálních struktur z hlediska fágové infekce

### 1.5.1 Cytoplazmatická membrána

Z hlediska fágové infekce jsou stěžejní zejména povrchové struktury bakterií, ke kterým patří rigidní buněčná stěna a pod ní uložená cytoplazmatická membrána. Cytoplazmatická membrána bakterií je ve své podstatě velmi podobná membránám eukaryotických buněk, jedná se o fosfolipidovou dvojvrstvu s množstvím zakotvených proteinů rozličných funkcí. Bakteriální buňky postrádají membránové organely, a z tohoto důvodu u nich cytoplazmatická membrána zastává celou řadu významných funkcí – např. výroba energie. Dále je na ni vázána syntéza komponent buněčné stěny a pro některé fágy je bakteriální cytoplazmatická membrána také místem výstavby kapsidů nově vznikajících virionů. [3]

### 1.5.2 Buněčná stěna

Bakteriální buněčná stěna je tvořena vrstvou peptidoglykanu, zajišťuje pevnost, neohebnost a odolnost vůči výkyvům osmolality prostředí. U grampozitivních a gramnegativních bakterií jsou známy značné rozdíly v její stavbě. Pro grampozitivní bakterie je typická silná vrstva peptidoglykanu s vmezeženými molekulami teichoové kyseliny vyčnívajícími nad povrch, právě jejich přítomnost může být vodítkem pro adsorpci fágů příslušných grampozitivních bakterií. Gramnegativní bakterie disponují pouze tenkou peptidoglykanovou vrstvou, nad kterou je umístěna tzv. vnější membrána, tvořená z vnitřní strany fosfolipidy a z vnější strany velkým množstvím unikátních molekul lipopolysacharidů (LPS). Povrch gramnegativních bakterií může být navíc obklopen vrstvou polysacharidů či slizů, které zvyšují jejich invazivitu a virulenci. Fágy infikující gramnegativní bakterie mohou interagovat se složkami LPS či membránovými proteiny. Při infekci gramnegativních bakterií fágy je vstup virové genetické informace komplikován přítomností dvojitého periplazmatického prostoru utvářeného gelovitou hmotou s vysokou koncentrací proteáz a především nukleáz, které mohou způsobit degradaci fágové DNA. [3]

Aby se nově vzniklé viriony mohly uvolnit z vnitra napadených bakterií, musí dojít k lýze, které předchází narušení pevné struktury buněčné stěny. K tomuto účelu fágy uplatňují vysoce účinný enzym lyzin, ten je schopen rozrušovat integritu bakteriálních buněčných stěn působením na specifické vazby v molekule peptidoglykanu. Účinnému proniknutí lyzinu až k buněčné stěně předchází permeabilizace cytoplazmatické membrány prostřednictvím proteinu holinu. V průběhu maturace virionů se lyzin hromadí v cytoplazmě, ve vhodném

okamžiku je aktivován fágový gen kódující holin a nahromaděný lyzin následně proniká na místo určení. Tento mechanismus tedy ovlivňuje délku infekčního cyklu s cílem dosáhnout optimálního času pro eluci nově vzniklých virionů do okolí. Časová regulace je významná především při nedostatku dostupných hostitelů v okolí. Oddálení eluce může virionům poskytnout ochranu v prostředí hostitelské buňky, dokud nedojde k nastolení příznivějších podmínek v okolním prostředí. Systém lyzin – holin ovšem není univerzální. Některé fágy dosahují svého uvolnění i jinými způsoby např. narušením funkce bakteriálních enzymů zodpovědných za syntézu peptidoglykanu, což následně vede k chybnému sestavení buněčné stěny. [3; 17; 18]

## 1.6 Klasifikace bakteriofágů

Vzhledem ke skutečnosti, že bakteriofágy tvoří největší skupinu virů v přírodě, je jejich klasifikace velmi rozsáhlá. Z tohoto důvodu bude v této kapitole kladen důraz především na čeledi bakteriofágů zahrnující zástupce využívané k účelům substituce živočišných virů.

### 1.6.1 Historie klasifikace

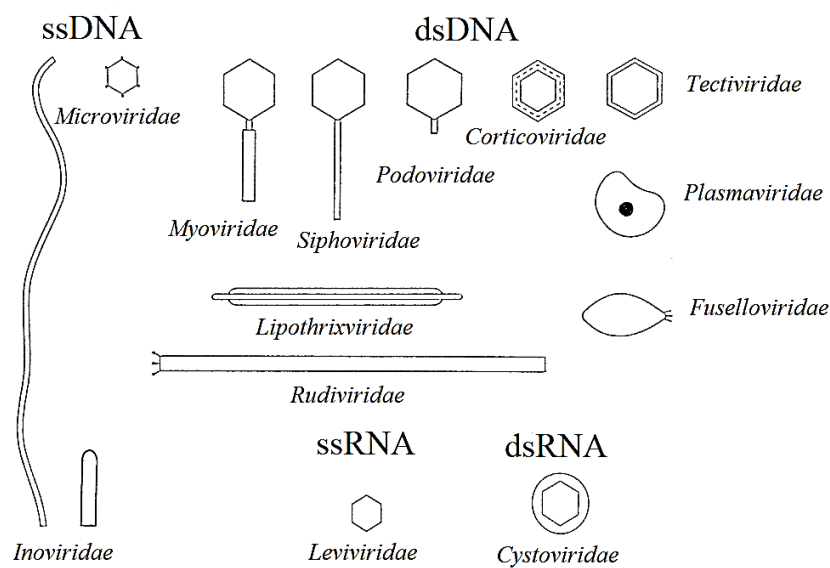
Klasifikace bakteriofágů procházela postupným historickým vývojem, jejímu ustálení předcházely objevy nových poznatků a rozvoj vědeckých metod. Snahu klasifikovat bakteriofágy projevila už sám jejich objevitel F. d'Hérelle, ten předpokládal existenci pouze jediného bakteriofága tzv. „*bacteriophageum intestinale*“, jenž se člení do dalších skupin, jeho koncept ale neměl dlouhého trvání. Svými objevy ke klasifikaci fágů přispěl roku 1937 australský mikrobiolog M. Burnet, ten poukázal na heterogenitu enterobakteriálních fágů a zjistil, že se liší svými velikostmi či odolností. Roku 1948 přišel H. Ruska s návrhem klasifikace virů pomocí elektronové mikroskopie. Pokrok v této oblasti přinesli také roku 1962 A. Lwoff, R. Horne a P. Tournier, kteří navrhli klasifikaci založenou na hodnocení povahy nukleové kyseliny a morfologie. [3; 19]

### 1.6.2 Současná klasifikace

V současné době se klasifikace virů, a tedy i bakteriofágů řídí pravidly ICTV (International Committee for Taxonomy of Viruses). Dle ICTV jsou viry členěny do 3 řádů z nichž jeden utvářejí právě bakteriofágy, ti se dále člení na celkem 13 čeledí a 30 rodů. Hlavním smyslem klasifikace je zejména zjednodušení a lepší orientace v takto rozsáhlé oblasti. Efektivita klasifikace spočívá především v možnosti studia celistvých skupin vytvořených na základě společných znaků, eliminuje se tak nutnost separátního studia jednotlivců. [19; 20]

Současná klasifikace stojí na základech morfologického členění bakteriofágů podle D. E. Bradleyho z roku 1967. Dle tvaru se fágy dělí na bičíkaté, polyedrické, filamentózní a pleomorfní. Téměř 96 % bakteriofágů je bičíkatých, tato velká skupina utváří řád *Caudovirales*, který se dále rozděluje na 3 rozsáhlé a fylogeneticky příbuzné čeledi – *Myoviridae*, *Siphoviridae* a *Podoviridae*. Fágy řádu *Caudovirales* se vyznačují přítomností dlouhých či krátkých bičíků, které mohou být kontraktilní a na své terminální části obvykle disponují typickými adsorpčními strukturami, mezi které patří bazální destička, hroty či vlákna. Struktura jejich virionů vykazuje tzv. binární symetrii, další společnou charakteristikou této velké skupiny je přítomnost lineární dsDNA a absence lipidového obalu, zahrnují zástupce z řad virulentních i mírných fágů. [3; 19; 20]

Zbylá 4 % připadají na fágy polyedrické, filamentózní a pleomorfní. Tyto bezocasé fágy jsou dále klasifikovány do 10 malých čeledí, lišících se v základních vlastnostech, jedná se o nezávislé fylogenetické skupiny. Jednotlivé čeledi vykazují variabilitu ve formách genetické informace a zahrnují jak obalené, tak neobalené zástupce. Morfologická skupina polyedrických fágů zahrnuje největší množství čeledí – *Microviridae*, *Corticoviridae*, *Tectiviridae*, *Leviviridae*, *Cystoviridae*. Filamentózní fágy jsou pak děleny na čeledi *Inoviridae*, *Lipothrixviridae*, *Rudiviridae* a poslední skupina pleomorfních fágů zahrnuje čeledi *Plasmaviridae* a *Fuselloviridae*. Přehled fágových čeledí spolu se schématickým vyobrazením jejich tvarů je znázorněn na obrázku 4. [20]



Obrázek 4 Schématické znázornění čeledí a tvarů bakteriofágů – upraveno [20]

### 1.6.3 Polyedrické bakteriofágy

Tato morfologická skupina zahrnuje některé z fágů vhodných k účelům substitute živočišných virů. Kapsid polyedrických fágů je typický svým kulovitým tvarem, jedná se o typ kapsidu s tzv. kubickou/ikosaedrální symetrií. Čeledi spadající do této morfologické skupiny mohou být rozděleny do dvou kategorií podle obsaženého typu nukleové kyseliny na DNA polyedrické fágy a RNA polyedrické fágy. Skupina DNA polyedrických fágů zahrnuje čeledi *Microviridae* (ssDNA), *Corticoviridae* (dsDNA) a *Tectiviridae* (dsDNA), skupina RNA polyedrických fágů pak zahrnuje čeledi *Leviviridae* (ssRNA) a *Cystoviridae* (dsRNA). [3]

#### *Čeď Microviridae*

Pro zástupce z čeledi *Microviridae* jsou charakteristické malé viriony, absence lipidového obalu a přítomnost cirkulární ssDNA. Další společnou charakteristikou této skupiny je vysoká odolnost vůči vlivu detergentů, éteru, chloroformu či působení mrazu. Paleta hostitelských bakterií pro tuto skupinu bakteriofágů je rozsáhlá, fágy spadající do podčeledi *Gokushovirinae* infikují obligátně intracelulární bakterie z rodů *Bdellovibrio*, *Chlamydia* a *Spiroplasma* (bakterie bez buněčné stěny), zatímco fágy z podčeledi *Mikrovirinae* infikují volně žijící bakterie z čeledi enterobakterií. [21]

Jedním z typických zástupců této čeledi je bakteriofág  $\phi$ X174, jehož hostitelskou bakterií je *E.coli*. Interakce kolifága  $\phi$ X174 s hostitelskou bakterií probíhá ve dvou fázích. Reverzibilní vazba virionu k bakteriím je zprostředkována molekulami cukru ve strukturách bakteriálních lipopolysacharidů (LPS). Bakterie postrádající zbytky glukózy a galaktózy v koncových částech LPS jsou vůči fágové infekci odolné. Po prvotní interakci se bakteriofág začíná „valit“ po buněčném povrchu, aby našel druhý receptor, jenž umožní průchod jeho DNA do nitra bakterie. Při laboratorních testech bývá často využíván jako substituent lidských norovirů, které jsou původci akutních gastroenteritid. [22]

#### *Čeď Leviviridae*

Mezi společné charakteristiky zástupců čeledi *Leviviridae* řadíme přítomnost pozitivní ssRNA v lineární podobě, absenci lipidového obalu a schopnost zachování infekčnosti i po vystavení vlivu éteru, chloroformu či kyselého prostředí (pH 2). Viriony této čeledi jsou morfologicky podobné poliovirům. Významným zástupcem této skupiny je bakteriofág MS2, jedná se o kolifága specificky infikujícího pouze F<sup>+</sup> *E. coli*. Fágy této

čeledi infikují hostitelské bakterie nejčastěji prostřednictvím pilusů (bakteriální struktury sloužící ke konjugaci). RNA bakteriofágů z čeledi *Leviviridae* byla od jejich objevení v roce 1961 využívána také v oblasti molekulární biologie jako snadno dostupný zdroj mRNA, stala se užitečnou zejména v oblasti studia regulace genové exprese na úrovni transkripce. [23]

### **Čeď *Cystoviridae***

Pro čeď *Cystoviridae* je charakteristická přítomnost neobvyklé formy genomu v podobě tri-segmentovaných lineárních úseků dsRNA obklopených dvouvrstvou kapsidou obalenou navíc lipidovým obalem. Dalším unikátním znakem této skupiny je přítomnost RNA dependentního polymerázového komplexu zodpovědného za specifické procesy balení, replikace a transkripce genomu. Fágy této čeledi vykazují zvýšenou citlivost na působení řady fyzikálně-chemických faktorů a jsou tedy náchylnější k inaktivaci. Specifickým bakteriálním hostitelem je gramnegativní fytopatogen *Pseudomonas syringae*. [20; 24]

Bakteriofág  $\phi 6$  byl prvním a po dlouhou dobu také jediným uznávaným zástupcem této čeledi. V současné době zahrnuje čeď *Cystoviridae* celkem 7 fágů, z nichž všechny byly izolovány z luštěnin napadených bakteriemi rodu *Pseudomonas*. [25]

## 2 MOŽNOSTI VYUŽITÍ BAKTERIOFÁGŮ

Ačkoli se na první pohled může zdát, že bakteriofágy, jakožto viry napadající bakterie nejsou pro člověka významné, opak je pravdou. Možnosti využití bakteriofágů s ohledem na prospěch člověka jsou rozsáhlé a zasahují do různých odvětví vědy a výzkumu. Díky schopnosti fágů napadat bakterie, mohou sloužit právě jako užitečné nástroje v boji proti bakteriálním infekcím a nejen to. Bakteriofágy mohou být využity pro detekci a typizaci bakterií, dále mohou být nápomocny při destrukci biofilmů, dalším příkladem je využití bakteriofágů v podobě tzv. fágového displeje, což je metoda umožňující identifikaci neznámých fragmentů DNA prostřednictvím vystavení jejich proteinového přepisu na povrchu fágového kapsidu. Někteří zástupci zejména z řad polyedrických fágů mohou sloužit jako modely pro studium živočišných virů. Tento typ substituce je výhodný zejména pro usnadnění procesu laboratorního testování antivirální účinnosti či zkoumání přežívání/chování virů za různých podmínek apod. [26]

### 2.1 Bakteriofágy jako vektory při klonování

Studium bakteriofágů přineslo cenné poznatky, které přispěly k položení základů a rozvoji oboru molekulární biologie. V této oblasti jsou bakteriofágy využívány při procesech klonování, slouží zde jako jedna z možných variant vektorů zajišťujících přenos rekombinantních molekul DNA do recipientních buněk. Známým příkladem bakteriofága sloužícího k tomuto účelu je fág  $\lambda$  a od něj odvozené deriváty, dále je k tomuto účelu využíván fág M13 a opět fágy od něj odvozené. [3]

### 2.2 Bakteriofágová terapie

Bakteriofágová (zkráceně fágová) terapie je předmětem biomedicínského výzkumu, patří bezesporu mezi jednu z nejznámějších a pravděpodobně i nejstarších metod založených na schopnosti fágů infikovat bakteriální buňky. Princip této metody spočívá v léčbě bakteriálních infekcí prostřednictvím vhodného fága, k němuž je daná patogenní bakterie citlivá. Využívání této léčebné metody bylo v minulosti (především v západních zemích) díky rozvoji antibiotik upozaděno. V současnosti ovšem začíná její potenciál opět narůstat, fágová terapie se totiž stala zajímavou alternativou pro řešení stále závažnějšího problému antibiotické rezistence. Bakteriofágová terapie v porovnání s antibiotickou léčbou nabízí určité výhody, jedním z příkladů může být specifita účinku fágů, kteří na rozdíl od antibiotik nenarušují přirozený mikrobiom pacienta. Před indikací této formy terapie je ovšem

nezbytné komplexně prostudovat interakce mezi zvoleným bakteriofágem a léčeným makroorganismem. Musí být také zvažena rizika rozvoje alergií či potenciální riziko zvýšení virulence bakterií vlivem fága. [3; 27; 28]

### 2.3 Bakteriofágy jako substituenty živočišných virů při laboratorních testech

V posledních letech se objevila řada studií zabývajících se využitím bakteriofágů jako náhrad za eukaryotické viry, zejména za vysoce infekční patogeny. Tato substituce byla realizována v nejrůznějších testech, jejichž cílem bylo prostřednictvím bakteriofágů lépe prostudovat některé aspekty chování a šíření patogenů v různých prostředích za různých podmínek.

Bakteriofágy jsou k tomuto účelu vhodné zejména díky významné strukturální podobnosti s mnohými eukaryotickými viry, dále jsou z genetického i morfologického hlediska vysoce diverzifikované, což poskytuje rozsáhlé možnosti pro výběr právě takových fágů, jenž budou co nejuvěrněji suplovat nahrazované živočišné viry. Řada autorů zabývajících se problematikou šíření virů v prostředí vzduchu shledala jako vhodné substituenty živočišných virů bezbičíkaté, polyedrické bakteriofágy, jedná se např. o fágy MS2 (čeleď *Leviviridae*),  $\phi 6$  (čeleď *Cystoviridae*),  $\phi X174$  (čeleď *Microviridae*), PM2 (čeleď *Corticoviridae*) a PR772 (čeleď *Tectiviridae*). [29; 30]

Mezi výhody plynoucí z této substituce se řadí zejména snížení bezpečnostních rizik při práci a dále také značná časová i finanční úspora díky absenci zdoluhavých metod založených na snížení cytopatického účinku či testů na bázi replikonu. Práce s eukaryotickými viry je závislá na kultivaci vhodných buněčných linií, ta se pohybuje v řádech dnů, následuje jejich zaočkování virem a ošetření testovaným subjektem, kontrolu odpovědi (snížení cytopatického účinku či inhibici replikace viru) je pak možné odečíst opět až za několik dnů. Naproti tomu kultivace bakterií (hostitel bakteriofágů) je časově méně náročná, hostitelské bakteriální kultury jsou za standardních laboratorních podmínek dobře kultivovatelné, odpověď fágů na podmínky testování je možné odečítat po 24 hodinách od zahájení jejich kultivace. Práce s velkou částí živočišných virů (např. viry SARS-CoV-2, H5N1, MERS-CoV, virus vztekliny, žluté zimnice či koňské encefalomyelitidy...) je podmíněna vybavením laboratoře a pracovníků dle 3. úrovně biologické bezpečnosti (tzv. biosafety level, zkráceně BSL) se zvláště patogenními viry je pak nutné dodržovat nejvyšší stupeň – tedy BSL-4 (např. variola virus, viry Nipah, Hanta, Lassa, Ebola



či Marburg...)). Dostupnost laboratoří uzpůsobených pro práci za podmínek BSL-3 a BSL-4 je omezená, to je z velké části dáno finanční náročností podobných provozů. Z tohoto důvodu bylo vyvinuto značné úsilí k nalezení takových náhrad virů, které dokáží simulovat chování příslušných patogenů a současně je bude možné hodnotit při nižších úrovních biologické bezpečnosti. Úroveň biologické bezpečnosti při práci s bakteriofágy se pohybuje v rozmezí 1-2, a to zejména v závislosti na míře patogenity hostitelské bakterie využívané k propagaci fága. Z toho plyne, že práce s bakteriofágy je pro výzkumné pracovníky méně riziková a současně také nevyžaduje zvýšené nároky na bezpečnost pracovišť či na specifické uzpůsobení pracovních prostor. Dodržování standardních mikrobiologických aseptických technik je pro práci s bakteriofágy dostačující. [31; 32; 33]

Obecně mohou být výhody práce s bakteriofágy shrnuty v několika bodech:

- zkrácení doby analýzy (do 24 hodin),
- nižší požadavky na specializovaná zařízení,
- ekonomická efektivita,
- menší riziko pro zdraví pracovníků,
- lepší kultivovatelnost v porovnání s některými živočišnými viry,
- větší dostupnost této metody pro laboratoře.

Práce s bakteriofágy zajišťuje vyšší míru opakovatelnosti prováděných testů, s tím se pojí také větší množství získaných výsledků. [31]

Možnost provádění antivirálních testů simulovaných bakteriofágy v České republice například nabízí Národní referenční laboratoř pro desinfekci a sterilizaci pod záštitou Státního zdravotního ústavu. Na základě modifikovaných norem nabízejí několik možných akreditovaných metod testování s bakteriofágy. Přesné informace o příslušných modifikacích patří k chráněným dovednostem příslušných laboratoří.

### **2.3.1 Výběr bakteriofágů do role substituentů**

Bakteriofágy v roli substituentů mohou být chápány jako model pro studium osudu patogenu v konkrétním prostředí. Účely experimentů využívajících substituenty mohou být různé, předmětem zájmu může být například studium účinnosti desinfekce a odstranění patogenu z prostředí, dále se může jednat o studium míry jeho přežití či šíření v různých prostředích (voda, aerosol, povrchy apod...). [34]

Při výběru vhodného bakteriofága do pozice substituentu je nutné předem zvážit několik základních kritérií. Nejprve je nutné identifikovat nebezpečí v podobě příslušného nahrazovaného patogenu, následuje výběr systému, ve kterém se dané nebezpečí (patogen) vyskytuje. Dalším krokem v procesu volby je bezesporu také definování účelu prováděné studie a stanovení hypotéz, jež mají být zodpovězeny. V okamžiku, kdy jsou tyto základní požadavky pro provedení studie ujasněny, je možné napomoci výběru vhodného substituentu stanovením priorit, jedná se zejména o atributy praktické (bezpečnost, snadnost použití, možnost porovnávání), biologické (funkční morfologie, genetická a taxonomická podobnost, odolnost) a environmentální (pH, relativní vlhkost, UV záření, teplota). Jejich upřesněním lze dosáhnout efektivnějšího výběru díky zúžení škály potencionálních substituentů, dále může znalost atributů pomoci rozhodnout, jestli je pro potřeby studie dostačující jediný substituent nebo zda je nutné uchýlit se k jejich kombinaci. Každý účel má své dominantní atributy, které je nutno brát do úvahy. Vždy záleží na tom, co je cílem prováděného experimentu a také v jakém prostředí se odehrává. Pokud se jedná například o studii zaměřené na hodnocení schopnosti přežití, měl by zvolený substituent vykazovat podobnou míru perzistence jako nahrazovaný patogen. [34]

Významnou roli v posuzování objektivitu při výběru substituentu hraje bezesporu také možnost srovnání výsledků testů provedených se substituentem a současně i nahrazovaným patogenem za stejných podmínek, řada studií upozorňuje na důležitost vytvoření podrobných srovnávacích databází. [34]

### ***Bakteriofág $\phi$ 6***

Fág  $\phi$ 6 se díky svému lipidovému obalu a fyziologické podobnosti s řadou obalených živočišných virů stal hojně využívaným modelem pro jejich studium. Čeleď *Cystoviridae*, do níž  $\phi$ 6 spadá, zahrnuje i další zástupce, kteří se podobně jako fág  $\phi$ 6 vyznačují přítomností lipidového obalu, segmentovaného RNA genomu a řady dalších společných znaků. Častý výběr právě tohoto fága do role náhradníka obalených virů je dán zejména historicky, byl totiž jako první z této čeledi izolován a současně také nejlépe charakterizován. Aktuálně je hojně využíván jako model řady studií zaměřených na získávání poznatků o viru SARS-CoV-2. Mimo jiné byl použit například i jako model pro studium viru Eboly, chřipky, viru venezuelské koňské encefalitidy či koronavirů. [32; 35]

### ***Bakteriofág MS2***

Bakteriofág MS2 z čeledi *Leviviridae* je F-specifický, neobalený ssRNA fág *Escherichia coli*, který se stal se hojně využívaným substituentem celé řady virů. Svou strukturou a vlastnostmi připomíná značné množství lidských enterovirů, a to jej staví do pozice vhodného modelového systému pro jejich studium. Dále se také ukázal jako vhodný substituent například i pro virus Eboly či viru Marburg. [33]

#### **2.3.2 Studie provedené ve vodním prostředí**

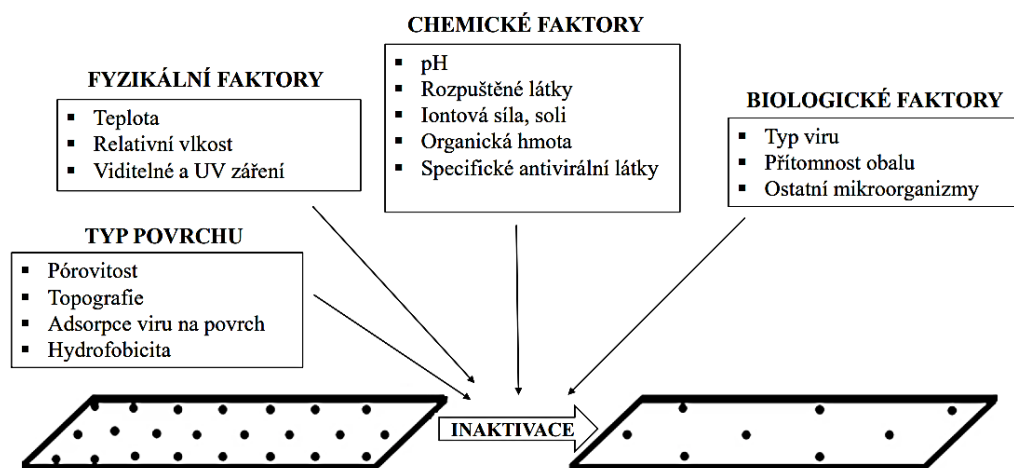
Viry jsou nedílnou součástí mořského i sladkovodního prostředí, z tohoto důvodu se jejich testováním v tomto prostředí zabývá řada autorů. Bakteriofágy se stále častěji využívají jako indikátory pro studium šíření virových patogenů ve vodách, což umožňuje posuzování potenciálních zdravotních rizik a také vytváření efektivních systémů schopných eliminovat přítomnost mikroorganismů ve zdrojích pitné vody. Bakteriofágy na rozdíl od chemických indikátorů umožňují věrohodnější simulaci šíření virů, jelikož se podobně jako ony v roztocích vyskytují ve formě suspendovaných koloidů. Bakteriofág P22 byl například využit pro účely studie zabývající se transportem fágů v komplexním systému povrchových vod (řeka Grand River v Michiganu), výsledky studie potvrdily, že P22 je pro tyto účely vhodným kandidátem. [36]

A. J. Adcock a kol. (2009) se ve své studii zaměřili na využití dvojice bakteriofágů ( $\phi 6$  a  $\phi 8$ ) z čeledi *Cysoviridae* jako potenciálních substituentů pro studium virů ptačí chřipky, konkrétně vysoce patogenní varianty H5N1. Provedené testy se substituenty byly založeny na zkoumání jejich perzistence ve vodním prostředí a také na míře jejich citlivosti k chloru, získané výsledky byly porovnávány s výsledky pro virus H5N1. Motivací studie bylo především lepší pochopení ekologie tohoto nebezpečného viru a s tím spojený zisk poznatků o riziku přenosu mezi volně žijícími ptačími hostiteli, domestikovanými druhy a člověkem. Získané výsledky poukazují na drobné odlišnosti v chování fágů a viru H5N1, i přesto využitá dvojice fágů vykazuje potenciál pro substituci tohoto viru ve studiích perzistence a inaktivace. [31]

#### **2.3.3 Studie provedené na površích**

Přenos virů mezi infikovaným a zdravým jedincem může být uskutečněn několika cestami. Při nepřímém způsobu přenosu hrají klíčovou roli především kontaminované předměty a povrchy. Kontaminace povrchů může být zapříčiněna mnoha způsoby, může k ní dojít

po přímém kontaktu s infekčními tělesnými sekrety a tekutinami, či nepřímo, například skrze virem kontaminovaný aerosol. Přenos virů touto cestou je značně ovlivněn jejich schopností udržet si v konkrétním prostředí svou infekčnost. Na uchování infekčnosti virových částic umístěných na površích má významný vliv kombinace faktorů biologických, fyzikálních a chemických. Výčet aspektů ovlivňujících životaschopnost virů na površích je zobrazen na obrázku 5. Mezi místa, která jsou charakteristická rychlým šířením virových infekcí skrze kontaminované povrchy patří zejména zařízení typu škol, pečovatelských domů, nákupních center, zdravotnických zařízení a dále sem řadíme také prostředky veřejné dopravy. Z důvodu pandemie onemocnění covid-19 se stala tato problematika aktuálním tématem a předmětem zájmu mnoha studií, jelikož přenos virových částic skrze kontaminované povrchy významně přispívá k šíření tohoto onemocnění. [37]



Obrázek 5 Faktory ovlivňující přežívání virů na površích – upraveno [37; 38]

Stavba virů má na jejich přežívání na neživých površích významný vliv, klíčová je především přítomnost lipidového obalu. Lipidový obal poskytuje virům řadu výhod (pružnost, lepší eluce z napadené buňky, maskování antigenů kapsidu...), ovšem mimo prostředí hostitelské buňky jsou obalené viry často více náchylné k působení fyzikálních a chemických faktorů. Neobalené viry vykazují vyšší odolnost a častěji se vyskytují v extrémních prostředích. Přežívání virů na površích je ovlivňováno také mírou relativní vlhkosti (RH), optimální hodnoty RH jsou také spojeny se strukturou virů, pro neobalené viry jsou výhodnější vyšší hodnoty RH (nad 80 %), zatímco obalené viry lépe přežívají při RH 50 % a méně. Struktura povrchu, na kterém jsou viry deponovány, má na schopnost

jejich přežívání také značný vliv. Řada studií potvrdila, že míra přežívání virů na neporézních površích je vyšší, jelikož na rozdíl od porézních povrchů z naadsorbovaných virů neodvádějí vlhkost. K dalším poznatkům patří také pozitivní vliv organické hmoty na přežívání virů, rozpuštěná, koloidní i její pevná forma napomáhá stabilizaci virů v prostředí (např. fekální materiál, krev, hlen atd.). [37; 38]

Z důvodu omezení rizika šíření virových onemocnění skrze povrchy je vyvíjena snaha o výrobu takových materiálů, které budou působit virucidně a jejich využití povede k zamezení přenosu virů například ve zdravotnických zařízeních či jiných rizikových prostorech. Již zmiňovaná pandemie onemocnění covid-19 tuto poptávku značně zvedla. Kovy jako stříbro, měď nebo zinek či biopolymery jako chitosan patří bezesporu mezi nejnámější materiály s prokazatelně antimikrobiálními vlastnostmi, ovšem nabytí těchto vlastností může být dosaženo také modifikací různých dalších materiálů. K základním typům antimikrobních povrchů patří povrchy fotoaktivované, povrchy s vnitřními antimikrobními vlastnostmi a dále povrchy upravené speciálním povlakem či začleněním účinných látek do jejich vnitřní struktury. Oxid titaničitý, který je hojně využíván jako surovina v kosmetickém průmyslu, je současně také nejvíce studovaným materiálem v souvislosti se zmiňovanými fotoaktivovanými povrchy, jelikož vykazuje významné fotokatalytické vlastnosti. Další z možných cest je také vývoj antiadhezivních povrchů, které jsou inspirovány přírodními povrchy jako je lotosový list, žraločí kůže či křídla hmyzu. Vývoj materiálů a povrchů se samočisticí schopností je v současnosti nově vznikající cestou, která nabízí zajímavé vyhlídky v boji se šířením nález skrze kontaminované povrchy. [39]

Období pandemie přineslo zvýšenou snahu o eliminaci šíření virových částic během nákupu potravin v supermarketech, řada čerstvých potravin byla proto balena v plastových obalech. To iniciovalo vývoj obalových materiálů s obsahem antimikrobních látek s cílem zajistit tak vyšší míru ochrany spotřebitele a také výrobku samotného. V ideálním případě by měla vnitřní část obalového materiálu zajistit ochranu daného výrobku (snížit jeho kazivost v důsledku mikrobiální kontaminace) a vnější část s antivirovou úpravou by měla zajistit ochranu zákazníka. M. Mizielińska a kol. (2021) se v souvislosti s danou problematikou ve své studii věnovali vývoji a testování vnějšího povlaku s obsahem nanočástic ZnO, karvakolu a geraniolu. Z výsledků studie plyne, že povlaky obsahující kombinaci oxid zinečnatý – karvakol a oxid zinečnatý – geraniol vykazují aktivitu vůči fāgu  $\phi 6$ , který ve studii sloužil jako náhrada za virus SARS-CoV-2. Obalové materiály opatřené těmito

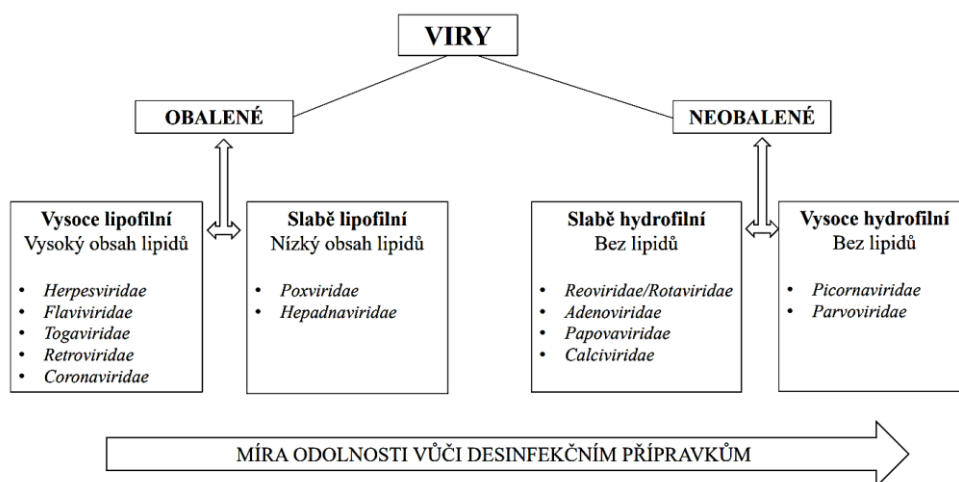
povlaky by tedy mohly sloužit k ochraně spotřebitelů a ke snížení rizika šíření onemocnění. [30]

A. Fedorenko a kol. (2020) publikovali výsledky studie zaměřené na schopnost přežití bakteriofága  $\phi 6$  (náhrada za SARS-CoV-2) v odpařených mikrokapénkách slin (umístěných na skleněných površích), které jsou vnímány jako klíčový zdroj přenosu celé řady respiračních onemocnění. Pro účely studie byly použity i neobalené fagy  $\phi X174$  a MS2 jako vhodné modely dalších respiračních onemocnění. Ze všech testovaných médií byla právě u slin zaznamenána nejvyšší míra životaschopnosti pro všechny testované bakteriofagy v širokém rozmezí relativních vlhkostí, míra životaschopnosti fágů ve vodě a SM pufru byla výrazně nižší. Výsledek studie tedy poukazuje na příznivou asociaci mezi viry a složkami slin. [40]

### 2.3.4 Studie zabývající vlivem desinfekčních prostředků na viry

Současná pandemie onemocnění covid-19 zvedla poptávku po účinných virucidních desinfekčních prostředcích a ruku v ruce s tím také po testování účinnosti takovýchto přípravků. Provádění povrchové desinfekce je totiž jedním ze zavedených doporučení v boji proti šíření nejen tohoto onemocnění.

Citlivost virů vůči působení chemických desinfekčních prostředků je ovlivňována celou řadou faktorů. Významnou roli zde hraje opět přítomnost lipidového obalu, jelikož obalené viry jsou k inaktivaci desinfekčními prostředky náchylnější. Naproti tomu nejvyšší odolnost vůči vlivu desinfekčních prostředků vykazují neobalené viry se silně hydrofilními vlastnostmi povrchu. Popisovaná skutečnost je zobrazena na obrázku 6. [41]



Obrázek 6 Vliv struktury na odolnost virů vůči desinfekčním přípravkům – upraveno [41]

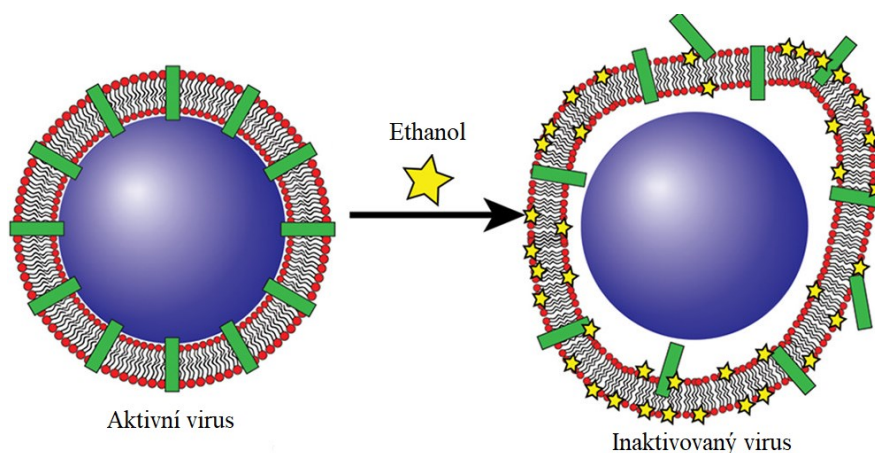
Účinnost desinfekčního procesu je ovlivňována také typem prostředí. Viry v suspenzi jsou chemickými látkami inaktivovány podstatně snadněji než viry vyskytující se ve vysušené formě na površích, kde je ochrana virových částic často podpořena přítomností bílkovin z krve či slin. Suspenzní testy nedokáží tak věrně simulovat praktické využití testovaných desinfekčních prostředků určených k dekontaminaci povrchů, lze je proto tedy využívat spíše pro orientační hodnocení. [41]

Infekčnost virů je podmíněna fúzí s hostitelskou buňkou, tedy vložení virového genomu a jeho následnou replikací. Obalené viry k uskutečnění tohoto procesu musejí disponovat neporušeným obalem, proto desinfekční přípravky určené k jejich inaktivaci cílí právě na tuto strukturu. U neobalených virů je stěžejním místem jejich proteinový obal, desinfekční přípravky určené k jejich inaktivaci tedy dosahují svého účinku zejména prostřednictvím denaturace proteinových komponent kapsidu. Obecně je rozlišováno mezi třemi základními způsoby inaktivace virů desinfekčními prostředky:

- narušení vrstvy lipidového obalu (např. ethanol, detergenty),
- modifikace důležitých proteinových center kapsidu (chlor, glutaraldehyd),
- reakce s genetickým materiálem vedoucí k degradaci nukleových kyselin (chlor).

[42]

Obalené viry jsou původci celé řady závažných onemocnění (ebola, chřipka, covid-19 atd.) a jsou proto výraznou hrozbou pro lidské zdraví, vývoj efektivních způsobů jejich inaktivace je proto v současném globalizovaném světě zásadní. Ethanol je jeden z nejznámějších a také široce užívaných prostředků určených k desinfekci. Jeho působením může docházet k denaturaci bílkovin, dále může reorganizovat uspořádání lipidové dvojvrstvy obalu (působí jako kosurfaktant) a v neposlední řadě může agregovat nukleové kyseliny. Interakce mezi ethanolem a obalenými viry byla předmětem studie, ve které byl jako model pro studium využíván bakteriofág  $\phi 6$ . Studie kladla za cíl lépe porozumět aspektům nanostrukturální modifikace viru během jeho interakce s ethanolem a následně tyto mechanismy blíže charakterizovat. Bylo prokázáno, že ethanol působí na nanostrukturu fága  $\phi 6$  širokou škálou účinků, nejvýraznější účinek byl pozorován na obalové struktuře. Po expozici fága 50% roztoku ethanolu se jeho lipidový obal oddělil od nukleokapsidu (viz obrázek 7). Modifikace struktury  $\phi 6$  poukazuje na efektivitu ethanolu v roli desinfekčního prostředku, způsob destrukce lipidového obalu je ovšem popisován jako nespecifický, to může být vysvětlením pro široký rozsah aktivity ethanolu. [43]

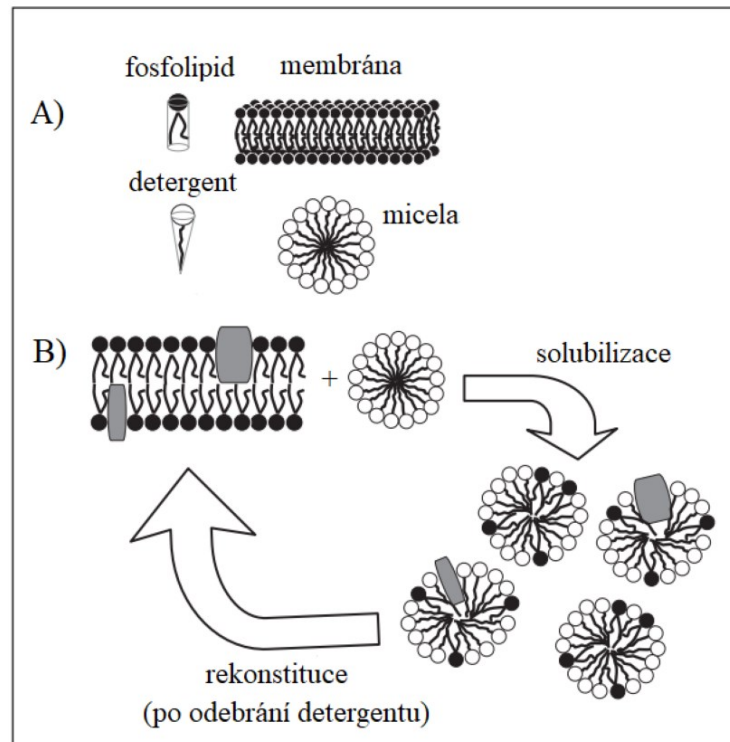


Obrázek 7 Schématické znázornění oddělení lipidového obalu od nukleokapsidu vlivem ethanolu – upraveno [43]

Desinfekční účinek ethanolu je značně závislý na jeho koncentraci. Bylo prokázáno, že více koncentrované roztoky ethanolu nezaručují vyšší desinfekční účinnost, ba naopak. U roztoků ethanolu o koncentraci nad 80 % byl pozorován výrazný denaturační účinek na povrchové struktury mikroorganismů (buněčná stěna/proteinový kapsid). Rychlý průběh denaturace může způsobit tzv. bariérový efekt, který znemožní další prostup ethanolu a ve výsledku je mikroorganismus díky vzniklé bariéře chráněn. Za příznivých podmínek by u takto deaktivovaného mikroorganismu mohlo dojít k jeho opětovné aktivaci. Pro dosažení lepšího desinfekčního účinku se jeví jako vhodné využití roztoků ethanolu o koncentraci v rozmezí 62–80 %. Méně koncentrované roztoky navozují pomalejší denaturaci a umožňují tak prostup ethanolu a vody do mikroorganismu. K dalším nevýhodám koncentrovaného ethanolu patří jeho vysoká těkavost a hořlavost. [44]

K účelům desinfekce a inaktivace virů jsou často využívány také povrchově aktivní látky (PAL), které jsou typické svou amfifilní strukturou. Unikátní struktura těchto molekul částečně naznačuje mechanismus jejich působení, který tedy ve většině případů spočívá v solubilizaci a následném rozrušení lipidového obalu obalených virů, mechanismus je znázorněn na obrázku 8. [45]





Obrázek 8 Mechanismus interakce detergentu a fosfolipidové membrány – upraveno [46]

Předmětem řady studií je hledání a také výběr vhodných náhradníků pro hodnocení účinnosti desinfekčních prostředků proti viru Ebola. Kmen tohoto viru izolovaný při vypuknutí epidemie ve státech západní Afriky v roce 2014, se ukázal jako perzistentnější v porovnání s variantou izolovanou v roce 1976. Z tohoto důvodu vzrostl tlak na vývoj a testování desinfekčních prostředků, které napomohou snížit riziko jeho šíření. Výběr vhodných modelových fágů je komplikován menší možností srovnání, jelikož množství publikovaných údajů o odolnosti viru ebola při inaktivaci desinfekčními prostředky na površích není rozsáhlé. K. Gallandat a kol. (2017) ve své studii vycházejí z dříve získaných poznatků o inaktivaci viru ebola vystavenému účinkům desinfekce s obsahem chloru (NaClO) na povrchu z nerezové oceli. Podmínky původního experimentu byly replikovány pro účely hodnocení čtyř potenciálních zástupců z řad bakteriofágů –  $\phi 6$ , MS2, M13, PR772. Dle výsledků se za daných podmínek experimentu jako nejvhodnější náhrada ukázal bakteriofág  $\phi 6$ , v porovnání s virem Ebola vykazoval mírně vyšší odolnost. Fágy MS2 a M13 za daných podmínek vykazovaly významně vyšší odolnost v porovnání s virem Ebola, zatímco bakteriofág PR772 byl naopak inaktivován výrazně rychleji. Studie také poukázala na důležitost podrobného zkoumání mechanismů inaktivace virů, jelikož pochopení těchto procesů by značně usnadnilo výběr vhodných substituentů. [47]

Navržení možného způsobu inaktivace viru Ebola bylo také předmětem studie, kterou prováděli J. Wood a kol. (2020). Studie byla zaměřena na hodnocení míry perzistence možných substituentů viru Ebola – fágů  $\phi 6$  a MS2 vůči parám peroxidu vodíku. Fágové suspenze byly inokulovány a následně vystavovány parám peroxidu vodíku na několika různých materiálech (organických/anorganických a porézních/neporézních). Testovací fágové suspenze byly ředěny buďto fyziologickým roztokem, fosfátovým pufrům nebo lidskou krví. Jedním z cílů studie bylo vyhodnotit míru účinnosti inaktivace fágů vlivem málo koncentrovaných ( $\leq 25$  ppm) par peroxidu vodíku (LCHP = low concentration hydrogen peroxid vapor), tato metoda s sebou přináší nižší nároky na vybavení a dobrou dostupnost pro oblasti s omezenými finančními zdroji. Dle výsledků byla metoda LCHP shledána jako účinná proti oběma fágům bez přítomnosti lidské krve jako ředícího činidla po dvouhodinovém kontaktním čase, zatímco LCHP v přítomnosti krve bylo proti fágům neúčinné i po 3denním kontaktu. Výsledky studie tedy potvrzují, že přítomnost organické hmoty zvyšuje míru perzistence virových částic. Studie dále řeší i vliv lipidového obalu na míru odolnosti viru. Neobalený bakteriofág MS2 dle výsledků prokazoval oproti neobalenému bakteriofágu  $\phi 6$  vyšší stabilitu na všech testovaných materiálech (bez přítomnosti krve), tento poznatek odpovídá známé skutečnosti, která hovoří o vyšší odolnosti neobalených virů vůči vlivům desinfekčních přípravků. [48]

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

### 3 CÍL PRÁCE

Hlavním cílem této bakalářské práce bylo prověřit možnosti antimikrobního testování desinfekčních prostředků pomocí bakteriofágů sloužících jako náhrada za viry. Pro dosažení hlavního cíle práce bylo stanoveno několik dílčích cílů, mezi které patřilo:

- zpracování rešerše se zaměřením na popis možností antimikrobního testování s využitím bakteriofágů,
- zahrnout do rešerše poznatky o testování desinfekčních prostředků s využitím bakteriofágů,
- na základě informací z rešerše zvolit vhodné bakteriofágy pro hodnocení účinnosti desinfekcí tak, aby nahrazovaly běžně testované viry,
- navrhnout a následně prakticky prověřit modifikaci normy upravující základní postup testování účinnosti desinfekčních přípravků,
- zvolit vhodné desinfekční přípravky pro testování,
- získané výsledky z provedených testů přehledně zpracovat a objektivně zhodnotit jejich význam.

## 4 METODIKA A MATERIÁLY

### 4.1 Použité vybavení a přístroje

- Digitální suchá lázeň Accublock™ Labnet
- Vodní lázeň Nüve NB9
- Třepačka Biosan Vortex V-1 plus
- Denziometr Grant Bio DEN-1B
- Inkubátor Memmert IN
- Inkubátor Nüve EN 055
- Manuální počítáčka kolonií Schütt count<sup>plus</sup>
- Laminární box Alpina
- Automatické pipety Finnpiette F2 a F1 o různých objemech
- Petriho misky
- Bakteriologické zkumavky
- Mikrozukavky

### 4.2 Použitá média a agary

- Pro kultivaci bakteriofágů byly využívány 2 druhy agarů od výrobce HiMedia Laboratories Pvt. Ltd.:
  - Trypton-sójový agar (TSA) a Luria Bertani agar (LBA).
- Pro přípravu hostitelských bakteriálních kultur byly využívány 2 druhy bujonů od výrobce HiMedia Laboratories Pvt. Ltd.:
  - Trypton-sójový bujon (TSB) a Luria Bertani bujon (LBB).
- Pro ředění fágových suspenzí byl připravován SM pufr (pH 7,5) dle receptury:
  - chlorid sodný (výrobce: PENTA, spol. s.r.o) v koncentraci 5,8 g/l,
  - síran hořečnatý v koncentraci 0,96 g/l (výrobce: PENTA, spol. s.r.o.),
  - tris(hydroxymethyl)aminomethan (výrobce: Carl Roth GmbH + Co. KG) v koncentraci 6,1 g/l.

- Neutralizátor testovaných desinfekčních přípravků byl připravován dle receptury doporučené normou ČSN EN 1040 a obsahoval:
  - lecitin v koncentraci 3 g/l (výrobce: Mogador s.r.o.),
  - polysorbát 80 (TWEEN 80) v koncentraci 30 g/l (výrobce: HiMedia Laboratories Pvt. Ltd.),
  - thiosíran sodný v koncentraci 5 g/l (výrobce: PENTA, spol. s.r.o.).
- Ředící roztok využívaný během validace “C“ byl připravován dle doporučení normy ČSN EN 1040 a obsahoval:
  - trypton = Peptone Type I (výrobce: HiMedia Laboratories Pvt. Ltd.) v koncentraci 1 g/l,
  - chlorid sodný (výrobce: PENTA, spol. s.r.o.) v koncentraci 8,5 g/l.

### 4.3 Používané mikroorganismy

Využívané bakteriofágy a jejich příslušné hostitelské kultury pocházejí z Německé sbírky mikroorganismů a buněčných kultur (Leibniz Institute DSMZ):

- obalený, dsRNA *Pseudomonas* bakteriofág  $\phi 6$  DSM-21518 z čeledi *Cystoviridae* a jeho hostitelská bakterie *Pseudomonas syringae* DSM-21482, [49; 50]
- neobalený, ssRNA *Escherichia* bakteriofág  $\phi X174$  DSM-4497 z čeledi *Microviridae* a jeho hostitelská bakterie *Escherichia coli* (Migula 1895) Castellani a Chalmers 1919 DSM-13127. [51; 52]

#### 4.4 Specifikace testovaných desinfekčních prostředků

Testování účinnosti inaktivace bakteriofágů  $\phi 6$  a  $\phi X174$  bylo provedeno pro 7 vybraných přípravků, z nichž většina patří mezi úklidové desinfekční prostředky. Přehled testovaných desinfekčních prostředků je uveden v tabulce 1, jako reference byla při každé ze sérií testů účinnosti využívána demineralizovaná voda.

*Tabulka 1 Přehled testovaných desinfekčních prostředků*

| Číslo     | Název produktu         |
|-----------|------------------------|
| 1.        | SAVO Čistič na podlahy |
| 2.        | Incidin OxyDes         |
| 3.        | SPURTEX® Unisanol      |
| 4.        | Dezox                  |
| 5.        | Desur                  |
| 6.        | Sanytol                |
| 7.        | SAVO Original          |
| Reference | Demineralizovaná voda  |

##### 4.4.1 SAVO Čistič na podlahy

Výrobek v sobě kombinuje vlastnosti čistící i desinfekční, je primárně určen k mytí podlah, ale lze jej využít i na ošetření jiných znečištěných ploch. Výrobce pro účely mytí podlah (bez desinfekčního účinku) doporučuje používat přípravek v koncentraci 12,5 ml/l, pro potřeby důkladné desinfekce (zejména menších ploch) doporučuje aplikovat přípravek neředěný s následnou dobou působení alespoň 15 minut. Výrobce na etiketě udává, že přípravek účinně likviduje bakterie i viry jako SARS-CoV-2 či Modified Vaccinia Virus Ankara. Účinnou látkou jsou alkyl(C12-C16)benzyltrimethylamonium chloridy v koncentraci 0,75 g/100 g, přípravek dále obsahuje méně než 5 % neionických a kationických povrchově aktivních látek. [53]

##### 4.4.2 Incidin OxyDes

Incidin OxyDes od firmy Ecolab je kapalný koncentrovaný prostředek kombinující detergenční i desinfekční účinek, slouží k čištění a desinfekci ploch či povrchů a je vhodný pro využití v režimu desinfekce s pravidelným střídáním aktivní látky. Jeho desinfekční působení je založeno na postupném uvolňování aktivního kyslíku. Účinkuje proti bakteriím,

plísním a také vůči obaleným virům (včetně virů HIV, HBV, HBC). Pro dosažení virucidního účinku (obalené viry) výrobce doporučuje aplikovat přípravek v koncentraci 10 ml/l s dobou působení 15 minut. Aktivními desinfekčními složkami přípravku Incidin Oxydes jsou peroxid vodíku v koncentraci 10 g/100 g a alkyldimethylbenzalkonium-chlorid v koncentraci 7,5 g/100 g. [54]

Přípravek Incidin Oxydes je využíván v mikrobiologické laboratoři Centra Polymerních Systémů Univerzity Tomáše Bati v prvním kroku dekontaminace Petriho misek.

#### 4.4.3 SPURTEX® Unisanol

Unisanol je desinfekční prostředek na bázi ethanolu vyvinutý ve spolupráci Centra Polymerních Systémů Univerzity Tomáše Bati a firmy Spur jako reakce na propuknutí pandemie onemocnění covid-19. Přípravek je primárně určen k účelům sterilizace nanoroušek a respirátorů, ale lze jej také využít k desinfekci rukou či jiných povrchů. Tento desinfekční prostředek byl formulován na základě doporučení WHO, hlavní účinnou složkou je ethanol v koncentraci 83-84 % obj., pomocnými složkami jsou glycerol v koncentraci 1,5 % obj., 30% peroxid vodíku v koncentraci 0,4 % obj. a denatonium benzoát (denaturační činidlo) v koncentraci <0,01 % obj. [55; 56]

#### 4.4.4 Desur a Dezox

Desur a Dezox jsou koncentrované tekuté přípravky od výrobce MPD plus, s.r.o. určené k desinfekci a čištění ploch či předmětů. Přípravky se liší obsahem aktivních látek, Desur je založen na bázi aldehydů a přípravek Dezox na bázi aktivního kyslíku. [57; 58]

Oba přípravky nabízejí široké spektrum účinnosti, mezi výčet udávaný výrobcem na etiketě přípravků patří účinky baktericidní, fungicidní, virucidní, mykobaktericidní, tuberkulocidní. Výrobce doporučuje aplikovat 5–20 ml přípravku na 1 l vody v závislosti na desinfekčním zadání:

- účinnost proti bakteriím a plísním: 5 ml přípravku na 1 l vody (30 min),
- účinnost proti virům: 10 ml přípravku na 1 l vody (60 min),
- tuberkulocidní účinnost: 20 ml přípravku na 1 l vody (60 min).

Mezi účinné desinfekční složky přípravku Desur patří glutaraldehyd v koncentraci 5 g/100 g, glyoxal v koncentraci 8 g/100 g a benzalkoniumchlorid v koncentraci 4 g/100 g.



Dalšími složkami jsou neionické tenzidy (5-15 %), fosforečnany (< 5 %), kyselina citronová (< 2 %) a další doprovodné látky. [59]

Mezi účinné desinfekční složky přípravku Dezox patří peroxid vodíku v koncentraci 8 g/100 g, benzalkonium chlorid v koncentraci 1,5 g/100 g a chlorhexidin-diglukonát v koncentraci 1 g/100 g. Dalšími složkami jsou neionické tenzidy (5-15 %), propan-2-ol, ethoxylovaný alkohol C12-15 a další doprovodné látky. [60]

Desur a Dezox jsou ve střídavých desinfekčních cyklech využívány pro účely desinfekce a čištění podlah v mikrobiologické laboratoři Centra Polymerních Systémů Univerzity Tomáše Bati.

#### 4.4.5 Sanytol

Univerzální desinfekční čistič Sanytol je určen k účelům každodenního odstraňování nečistot a desinfekce povrchů v domácnosti. Výrobce po nastříkání přípravku Sanytol na znečištěný povrch doporučuje nechat jej působit po dobu 5 minut, pro dosažení hloubkového desinfekčního účinku až 15 minut. Výrobce deklaruje trojí účinek:

- baktericidní dle normy EN 13697 (5 min),
- fungicidní dle normy EN 13697 (15 min),
- virucidní (Herpes simplex, Influenza A) dle normy EN 14476 (5 min).

Účinnou látkou je didecyldimethylamonium chlorid v koncentraci 5 g/kg, přípravek dále obsahuje <5 % neionických povrchově aktivních látek, <5 % kationických povrchově aktivních látek a další doprovodné látky. [61; 62]

#### 4.4.6 SAVO Original

Tento přípravek patří mezi nejprodávanější čisticí a desinfekční prostředky v České republice. Je určen k desinfekci bazénů, studní (užitková voda), sanitárních zařízení a dále také k desinfekci podlah a povrchů, působí na široké spektrum choroboplodných zárodků (bakterie, viry, řasy a houby). Výrobce doporučuje ředění pro účely desinfekce povrchů je udáváno jako 222 ml přípravku SAVO na 1 l vody (doba působení 30 minut). Účinnou desinfekční složkou přípravku je chlornan sodný (NaClO) v koncentraci 4,7 g/100 g. [63]

## 4.5 Metodika – modifikace normy ČSN EN 1040

### 4.5.1 Norma ČSN EN 1040 Chemické desinfekční přípravky a antiseptika

Norma ČSN EN 1040 se zabývá hodnocením účinnosti chemických desinfekčních přípravků a antiseptik, upravuje provedení kvantitativní zkoušky s použitím suspenze za účelem stanovení základního baktericidního účinku testovaných přípravků. Pro objektivní zhodnocení účinnosti chemických desinfekčních přípravků a antiseptik by měl proběhnout specifický program jejich testování, složený z několika fází. Norma ČSN EN 1040 zahrnuje testování 1. fáze – suspenzní testy pro zhodnocení základní aktivity produktu. Při vyšších fázích testování jsou v testech zohledňovány praktické aspekty při používání daných přípravků. Desinfekční přípravky lze prostřednictvím této normy testovat pouze v koncentraci 80 % a méně z důvodu nutného přídavku vody a využívaných mikroorganismů, což vždy vede k naředění testovaného vzorku. Aby mohl být testovaný desinfekční prostředek prohlášen dle této normy za účinný musí prokázat redukci životaschopnosti používaných mikroorganismů alespoň o 5 logaritmů. [64]

Veškerá práce byla prováděna za dodržování standardních mikrobiologických aseptických technik, při práci byl využíván laminární box, používané vybavení bylo sterilní stejně jako používaná média či ředící roztoky.

### 4.5.2 Příprava bakteriální hostitelské kultury

Nezbytným krokem pro uskutečnění kultivace bakteriofágů byla příprava hostitelské bakteriální kultury v exponenciální fázi růstu. Pro propagaci bakteriofága  $\phi$ X174 byla využívána kultura bakterie *Escherichia coli*, zatímco pro bakteriofága  $\phi$ 6 byla využívána kultura bakterie *Pseudomonas syringae*.

Hostitelské kultury byly připravovány přenesením inokula příslušné bakterie do vhodného živného média, pro *E. coli* byl využíván LB bujon (LBB) a pro *P. syringae* TS bujon (TSB). Zaočkovaná média byla na vortexu promíchána a přes noc umístěna do inkubátorů nastavených na příslušnou teplotu (*P. syringae* – 25 °C, *E. coli* – 35 °C). Pro úspěšnou propagaci bakteriofágů bylo nutné dosáhnout u připravovaných hostitelských kultur hodnot optické hustoty (OD) ~ 0,5.

#### 4.5.3 Stanovení titru bakteriofágů v testovacích suspenzích (lyzátech)

Samotnému testování účinnosti desinfekčních přípravků vždy předcházelo stanovení, respektive ověření počtu fágových částic v lyzátu schopných tvořit plaky (tzv. titr fágové suspenze). Titr byl stanovován metodou plakových testů na agarové dvojvrstvě. Fágové lyzáty byly dle potřeby připravovány metodou purifikace z agaru.

Testované fágové lyzáty byly vhodně naředěny, tak aby bylo dosaženo nárůstu optimálního množství plaků (rozmezí 20–100) pro následný výpočet hodnoty PFU/ml. Ředění fágových lyzátů bylo prováděno v mikrozkušnicích s finálním objemem 1000  $\mu$ l (100  $\mu$ l fágového lyzátu + 900  $\mu$ l SM pufru). Vhodně naředěný lyzát byl aplikován k hostitelské bakteriální kultuře, tento krok byl rovněž prováděn v mikrozkušnicích (100  $\mu$ l hostitelské kultury + 100  $\mu$ l lyzátu o příslušném ředění), směs v mikrozkušnici byla lehce promíchána a poté na 15 minut umístěna do inkubátoru nastaveného na vhodnou teplotu ( fáze přichycení bakteriofágů na hostitelské bakteriální buňky):

- bakteriofág  $\phi 6$  spolu s hostitelskou kulturou byl inkubován při teplotě 25 °C,
- bakteriofág  $\phi X174$  spolu s hostitelskou kulturou byl inkubován při teplotě 35 °C.

Po inkubaci následovalo zalití směsi hostitelské kultury a fágového lyzátu do agaru:

- ke kultivaci bakteriofága  $\phi 6$  byl využíván TSA agar:
  - o bottom (spodní) TSA, top (svrchní) TSA
- ke kultivaci bakteriofága  $\phi X174$  byl využíván LBA agar:
  - o bottom (spodní) LBA, top (svrchní) LBA.

Kultivace bakteriofágů byla prováděna na tzv. agarové dvojvrstvě, kdy Petriho misky v době zalívání suspenze již obsahovaly ztuhlou vrstvu spodního agaru (bottom agar). Svrchní agar (top agar), do kterého byla suspenze bakteriofága a hostitelské kultury zalívána, byl předem aplikován do zkumavek (množství top agaru v jedné zkumavce: 3 ml) umístěných v termobloku nebo vodní lázni, ve kterých byl temperován na teplotu 48 °C. Celý objem mikrozkušnice obsahující směs hostitelské kultury a fágové suspenze (200  $\mu$ l) byl přenesen do zkumavky s vytemperovaným top agarem, následovalo promíchání a vzniklá směs byla poté nalita na předpřipravenou ztuhlou vrstvu spodního agaru v Petriho misce. Misky byly po zatuhnutí top agaru umístěny dnem vzhůru do inkubátoru, kde byly po dobu 24 hodin inkubovány při příslušné teplotě (viz výše).

Po uplynutí doby inkubace byly zvoleny misky s vhodným počtem plaků pro výpočet hodnoty titru používaných suspenzí. Titr (hodnota PFU/ml, dále jako hodnota N) byl vypočítán dle vzorce:

$$PFU/ml = \frac{\text{průměrný počet plaků}}{\text{faktor ředění}} \cdot \frac{1000 \mu l}{\text{objem suspenze pipetovaný na místu (100 \mu l)}} \quad (1)$$

#### 4.5.4 Příprava desinfekčních přípravků k testování

Norma ČSN EN 1040 upravuje také požadavek na ředění testovaných desinfekčních prostředků, dle tohoto požadavku mají být jednotlivé přípravky testovány ve 3 různých koncentracích, z nichž jedna musí spadat do aktivního rozsahu působení a druhá mimo něj. Roztoky vzorků musí být připravovány v koncentraci 1,25násobně vyšší, než je zvolená zkušební koncentrace z důvodu následného zředění na 80 % po přidavku vody a testovací suspenze. Testované desinfekční přípravky byly tedy dle potřeby vhodně ředěny sterilní demineralizovanou vodou, ředění bylo prováděno vždy čerstvě před zahájením dané série testů, dle doporučení normy bylo ředěné vzorky možné k testování použít maximálně do dvou hodin od jejich přípravy. [64]

Desinfekční přípravky byly testovány v koncentraci doporučené dle pokynů výrobce, dále v koncentraci odpovídající poloviční dávce a v koncentraci odpovídající desetinásobnému zředění příslušného přípravku, v některých případech byly testovány i neředěné formy přípravků (viz výsledková část).

#### 4.5.5 Testování účinnosti desinfekčních přípravků stanovením fágové koncentrace

Tento krok zahrnoval vlastní testování desinfekčních prostředků podle modifikovaných postupů normy ČSN EN 1040. Testovaný vzorek desinfekčního přípravku byl nejprve vystaven kontaktu s fágovou suspenzí, část této směsi byla odebrána a přenesena k neutralizačnímu roztoku. Pro stanovení míry zachování životaschopnosti fágů vystavených vlivu desinfekčních prostředků byly provedeny plakové testy.

Do zkumavky č. 1 bylo nejprve napipetováno 0,5 ml demineralizované vody spolu s 0,5 ml testovací suspenze fága, směs byla na vortexu lehce promíchána a následně se nechala po dobu 2 min ± 10 s nechala stát. Po této době byly ke směsi napipetovány 4 ml vzorku testovaného desinfekčního prostředku – kontaktní čas nula.

Dle normy byla pro kontaktní čas nula vypočítána hodnota  $N_0$  [PFU/ml], která udává množství fágových částic v 1 ml po desetinasobném zředění původní suspenze ( $N$ ) v důsledku přidavku vody a testovaného vzorku – desetina z hodnoty  $N$ :

$$N_0 = \frac{N}{10} \quad (2)$$

Celý objem zkumavky byl po přidavku testovaného vzorku opět lehce promíchán a směs se po dobu 5 min  $\pm$  10 s nechala stát (doba určená pro působení desinfekčního prostředku – kontaktní čas). Následovala příprava obsahu zkumavky č. 2, ve které byl testovaný vzorek desinfekce neutralizován. Do zkumavky č. 2 bylo napipetováno 0,5 ml demineralizované vody spolu se 4 ml neutralizačního roztoku. Po uplynutí doby vymezené pro působení desinfekčního přípravku byl obsah zkumavky č.1 znovu lehce promíchán a 0,5 ml tohoto roztoku bylo odebráno a přeneseno do zkumavky č.2, kde se po promíchání vzniklá směs ponechala po dobu 5 min  $\pm$  10 s stát (doba vymezená pro neutralizaci účinných látek desinfekčního přípravku). Po uplynutí neutralizačního času byl obsah zkumavky lehce promíchán a ihned zpracován metodou postupného ředění s následným zalitím do agaru. Ředění bylo prováděno v mikrozkušavkách s finálním objemem 1000  $\mu$ l (100  $\mu$ l neutralizovaného roztoku + 900  $\mu$ l SM pufru).

Naředěná fágová suspenze byla aplikována k hostitelské bakteriální kultuře a po promíchání byla na 15 minut umístěna do inkubátoru (viz kapitola 4.5.3). Po inkubaci byla směs zalita do agaru, postup byl obdobný jako při stanovení titru fágové suspenze, opět se jednalo o práci na agarové dvojvrstvě. Po ztuhnutí top agaru byly Petriho misky umístěny dnem vzhůru k inkubaci po dobu 24 hodin.

Díky znalosti počtu vzniklých plaků byly vypočítány hodnoty  $N_a$  [PFU/ml], udávající množství přeživších fágových částic v 1 ml testovací směsi na konci kontaktního času (po uplynutí doby působení testovaného vzorku – před provedením neutralizace):

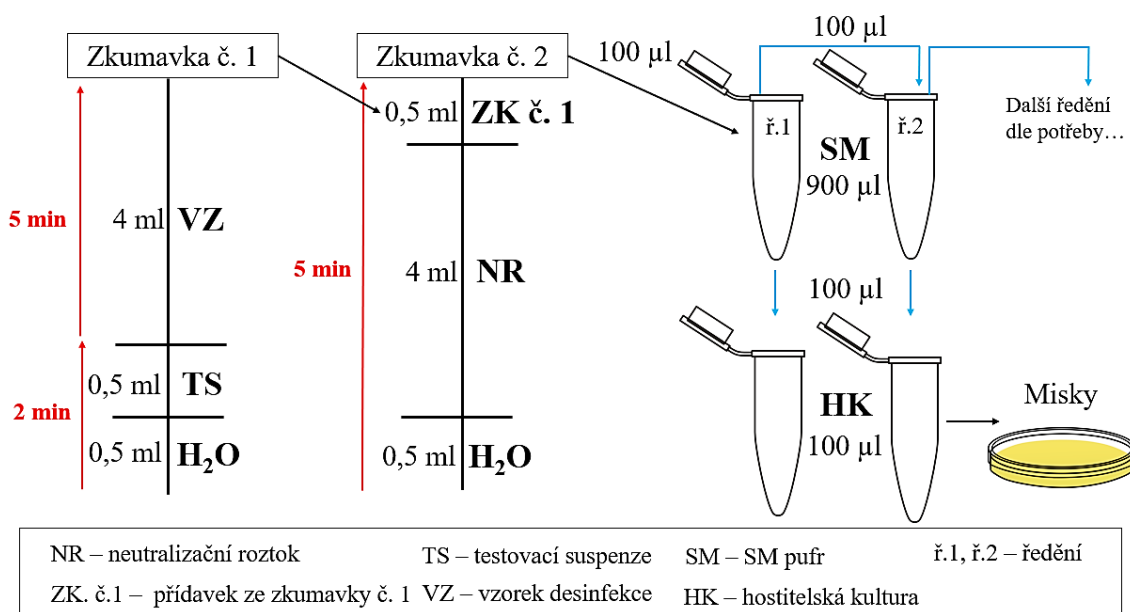
$$N_a = 10 \cdot \frac{c}{n} \quad (3)$$

kde:  $c$  – průměrná hodnota počtu vzniklých plaků,  $n$  – faktor ředění.

Díky znalosti množství fágových částic na počátku kontaktního času (hodnota  $N_0$ ) a na konci kontaktního času (hodnota  $N_a$ ) bylo možné vypočítat jejich případnou redukci ( $\log R$ ) způsobenou vlivem testovaného desinfekčního přípravku:

$$\log R = \log N_0 - \log N_a \quad (4)$$

Na následujícím schématu je znázorněn sled výše popsaných kroků upravujících testování účinnosti desinfekčních přípravků dle modifikované normy ČSN EN 1040:



Obrázek 9 Schématické znázornění pracovního postupu při testování účinnosti desinfekčních přípravků za využití bakteriofágů

#### 4.5.6 Validace metody

Norma ČSN EN 1040 upravuje také validační postupy určené ke kontrole:

- experimentálních podmínek – validace “A”,
- neutralizátoru – validace “B”,
- účinnosti neutralizace – validace “C”.

##### *Validace A*

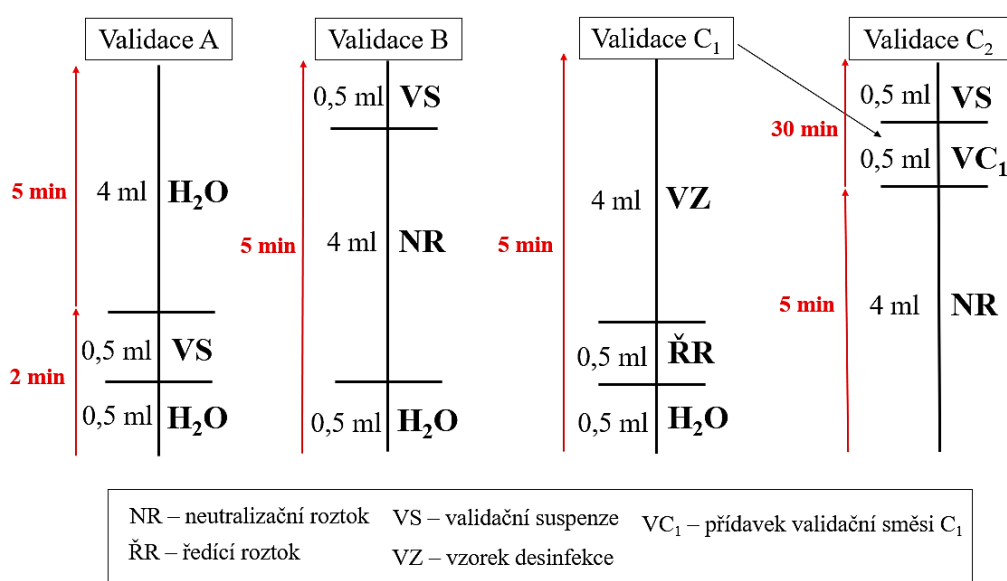
Pro přípravu validační směsi “A” bylo do zkumavky aplikováno 0,5 ml demineralizované vody a 0,5 ml validační suspenze příslušného bakteriofága, směs byla lehce promíchána a poté se nechala po dobu  $2 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$  stát. Po uplynutí této doby byly ke směsi přidány 4 ml demineralizované vody, směs byla promíchána a poté se nechala po dobu  $5 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$  stát. Po uplynutí doby stání bylo 100 µl validační směsi “A” aplikováno do mikrozkušavky k hostitelské bakteriální kultuře (100 µl), výsledná směs byla následně zalita do agarové dvojvrstvy obdobným způsobem jako je popsáno v kapitole 4.5.3.

**Validace B**

Validační směs “B” byla připravena ve zkumavce napipetováním 4 ml ověřovaného neutralizátoru, k němuž bylo přidáno 0,5 ml demineralizované vody a na závěr 0,5 ml testované validační suspenze. Připravená směs byla lehce promíchána a poté se ponechala po dobu 5 min ± 10 s stát. Po uplynutí této doby bylo 100 µl validační směsi “B” přeneseno k hostitelské bakteriální kultuře (100 µl) a celý objem mikrozkušavky byl následně zalit do agarové dvojvrstvy (viz výše).

**Validace C**

Tato validační metoda se skládá ze dvou kroků. Nejprve bylo do zkumavky č. 1 pipetováno 0,5 ml demineralizované vody, 0,5 ml ředícího roztoku a na závěr byly aplikovány 4 ml vzorku testovaného desinfekčního přípravku, směs byla promíchána a poté se po dobu 5 min ± 10 s ponechala stát. Do zkumavky č. 2 byl napipetován neutralizační roztok v objemu 4 ml. K neutralizačnímu roztoku ve zkumavce č. 2 bylo přeneseno 0,5 ml směsi ze zkumavky č.1, obsah zkumavky byl promíchán a po dobu 5 min ± 10 s se ponechal stát. Po uplynutí doby určené k neutralizaci desinfekčního přípravku bylo do zkumavky č. 2 přidáno 0,5 ml validační suspenze, směs byla promíchána a po dobu 30 min ± 10 s se ponechala stát. Po uplynutí kontaktní doby bylo 100 µl validační směsi “C” aplikováno do mikrozkušavky ke 100 µl hostitelské bakteriální kultury, obsah mikrozkušavky byl následně zalit do agarové dvojvrstvy (viz výše).



Obrázek 10 Schématické znázornění pracovního postupu u zmiňované trojice validačních postupů

***Proces vyhodnocení validačních zkoušek***

Postup vyhodnocování validačních zkoušek je také zakotven v normě ČSN EN 1040. Vychází se zde ze znalosti titru používané validační suspenze  $N_V$ . Následně je při vyhodnocování pracováno s hodnotou  $N_{V0}$ , která je desetinou hodnoty  $N_V$ . Hodnoty A, B, C [PFU/ml] získané provedením jednotlivých validačních zkoušek splňují podmínky validace ve chvíli, kdy jsou rovny nebo vyšší než  $\frac{1}{2}$  hodnoty  $N_{V0}$ .



## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Norma ČSN EN 1040 byla v mikrobiologické laboratoři CPS zavedena v roce 2020 a od té doby se s jejím využitím pravidelně testuje baktericidní účinnost desinfekčních přípravků. S příchodem pandemie onemocnění covid-19 vyvstal požadavek na její modifikaci, jenž umožní využívat bakteriofágy jako testovací mikroorganismy.

Pro testování dle postupů modifikované metody ČSN EN 1040 byla zvolena dvojice bakteriofágů – obalený  $\phi 6$  a neobalený  $\phi X174$ . Volba právě těchto fágů byla dána množstvím poznatků získaných z literatury, fágy  $\phi 6$  a  $\phi X174$  se v řadě odborných publikací objevují mezi často využívanými substituenty živočišných virů. [30]

Před každým stanovením byly připraveny čerstvé hostitelské bakteriální kultury tak, aby se při zahájení příslušné série testů používané bakterie nacházely v exponenciální fázi růstu. Fágové lyzáty byly skladovány v lednici (4 °C) a před zahájením každého testu byla koncentrace aktivních bakteriofágů v lyzátech ověřena, tzn. proběhlo stanovení fágového titru. Stanovené hodnoty titrů jsou uváděny u daných výsledků jako „koncentrace suspenze (N)“. Během testů bylo potvrzeno, že koncentrace fágů ( $\phi 6$  a  $\phi X174$ ) se v lyzátech prakticky nemění a je stabilní po řadu měsíců.

### 5.1 Test citlivosti bakteriofágů na činidla používaná dle doporučení normy ČSN EN 1040

Norma ČSN EN 1040 upravuje vhodné podmínky pro testování účinnosti desinfekčních přípravků s využitím bakterií jako testovacích mikroorganismů (*Pseudomonas aeruginosa* a *Staphylococcus aureus*). Cílem úvodních testů bylo proto ověřit, zda činidla popsaná a doporučovaná normou nepůsobí na dvojici zvolených bakteriofágů  $\phi 6$  a  $\phi X174$  toxicky. V tomto případě šlo především o neutralizační činidla. Testován byl:

- 1) „základní“ neutralizátor obsahující lecitin v koncentraci 3 g/l a polysorbát 80 (TWEEN 80) v koncentraci 30 g/l,
- 2) „základní“ neutralizátor s přídavkem thiosíranu sodného ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) v koncentraci 5 g/l (používá se pro neutralizaci účinku peroxidů),
- 3) „základní“ neutralizátor s přídavkem SDS (dodecylsírán sodný) v koncentraci 4 g/l (používá se pro neutralizaci účinků kvarterních amoniových solí).

Do testu bylo také zahrnuto hodnocení reakce bakteriofágů na demineralizovanou vodu, která by vzhledem k jejich citlivosti na míru osmotického tlaku mohla být problematická. Jako reference při této zkoušce byl zvolen SM pufr, který je při práci s bakteriofágy běžně využíván a je ověřeným médiem. Test citlivosti byl vyhodnocován obdobně jako test účinnosti desinfekčních prostředků (viz kapitola 4.5.5), tedy za stanovení hodnoty  $N_a$  s následným dopočítáním míry redukce  $\log R$ .

### 5.1.1 Výsledky testu citlivosti pro bakteriofága $\phi 6$

V tabulce 2 jsou uvedeny průměrné hodnoty  $N_a$  vypočítané ze tří stanovení pro každé z testovaných činidel, přičemž rozdíl mezi jednotlivými stanoveními byl nižší než 0,5 řádu (což je chyba u metod pro stanovení počtu mikroorganismů). Na základě znalosti hodnoty  $N_0$  a  $N_a$  byl dopočítán údaj redukce životaschopnosti fága  $\phi 6$ .

Tabulka 2 Výsledky testů citlivosti bakteriofága  $\phi 6$  na používaná činidla

|   |                                       |                     |
|---|---------------------------------------|---------------------|
| <b>Koncentrace suspenze (N)</b>             | 4,3·10 <sup>8</sup> PFU/ml            |                     |
| <b>Koncentrace suspenze (N<sub>0</sub>)</b> | 4,3·10 <sup>7</sup> PFU/ml            |                     |
| <b>Testované vzorky</b>                     | <b>Hodnota N<sub>a</sub> [PFU/ml]</b> | <b>Hodnota logR</b> |
| 1) Základní neutralizátor                   | 2,3·10 <sup>6</sup>                   | 1,27                |
| 2) Základní neutralizátor + thiosíran       | 2,4·10 <sup>6</sup>                   | 1,25                |
| 3) Základní neutralizátor + SDS             | 0                                     | 7,63                |
| SM pufr                                     | 2,0·10 <sup>6</sup>                   | 1,33                |
| Demineralizovaná voda                       | 2,1·10 <sup>6</sup>                   | 1,31                |

Z naměřených výsledků je patrné, že nebyl zaznamenán prakticky žádný rozdíl v počtech plaků při použití základního neutralizátoru, neutralizátoru obsahujícího thiosíran, SM pufru a u demineralizované vody. Hodnoty naměřené pro zmiňovaná činidla se pohybují v rozmezí 2,0·10<sup>6</sup>–2,4·10<sup>6</sup> PFU/ml. Z čehož plyne, že jednotlivé složky základního neutralizátoru včetně thiosíranu nemají letální účinek na fága  $\phi 6$ , současně byl také vyloučen posuzovaný negativní vliv demineralizované vody.

Naopak při přidavku SDS byla stanovena hodnota 0 PFU/ml. Tudíž doporučená koncentrace SDS v neutralizátoru, která neovlivňuje životaschopnost bakterií, obaleného bakteriofága  $\phi 6$  inaktivuje. Z důvodu prokázání negativního vlivu SDS na životaschopnost fága  $\phi 6$  bylo použití neutralizátoru s obsahem tohoto anionického tenzidu pro obaleného bakteriofága zavrhnuto.

U neutralizátoru s obsahem SDS byl inaktivační účinek na obaleného bakteriofága, vzhledem k dostupným poznatkům o vlivu povrchově aktivních látek (PAL) na uspořádání biologických membrán, očekávan (narušení fosfolipidové dvojvrstvy obalených virů vede k jejich inaktivaci). Působení PAL na lipidové dvojvrstvy bylo předmětem řady studií. Interakce membrán s detergenty vede k tvorbě směsných micel (lipid-detergent), to je následováno rozrušením struktury fosfolipidové dvojvrstvy. [46]

### 5.1.2 Výsledky testu citlivosti pro bakteriofága $\phi X174$

Tabulka 3 opět zobrazuje průměrné hodnoty  $N_a$  vypočítané ze tří stanovení pro každé z testovaných činidel, rozdíl mezi jednotlivými stanoveními se opět nacházel v rámci chyby 0,5 řádu.

*Tabulka 3 Výsledky testů citlivosti bakteriofága  $\phi X174$  na používaná činidla*

|   |                                       |                     |
|---|---------------------------------------|---------------------|
| <b>Koncentrace suspenze (N)</b>             | 3,6·10 <sup>8</sup> PFU/ml            |                     |
| <b>Koncentrace suspenze (N<sub>0</sub>)</b> | 3,6·10 <sup>7</sup> PFU/ml            |                     |
| <b>Testované vzorky</b>                     | <b>Hodnota N<sub>a</sub> [PFU/ml]</b> | <b>Hodnota logR</b> |
| 1) Základní neutralizátor                   | 2,3·10 <sup>6</sup>                   | 1,19                |
| 2) Základní neutralizátor + thiosíran       | 2,8·10 <sup>6</sup>                   | 1,11                |
| 3) Základní neutralizátor + SDS             | 2,5·10 <sup>6</sup>                   | 1,16                |
| SM pufr                                     | 2,1·10 <sup>6</sup>                   | 1,23                |
| Demineralizovaná voda                       | 2,7·10 <sup>6</sup>                   | 1,12                |

Mezi počty plaků fága  $\phi X174$  nejsou po přidavku thiosíranu ani SDS k receptuře základního neutralizátoru téměř žádné rozdíly. Jednotlivé hodnoty se pohybují v rozmezí 2,3·10<sup>6</sup>–2,8·10<sup>6</sup> PFU/ml. V tomto případě je tedy z naměřených výsledků patrné, že testované neutralizátory, doporučené normou ČSN EN 1040 pro bakterie, růst neobaleného bakteriofága  $\phi X174$  neovlivňují. Negativní vliv demineralizované vody byl i pro neobaleného fága vyloučen.

## 5.2 Validace metody dle modifikované normy ČSN EN 1040

Proces validace je určen k ověření správnosti nastavených podmínek během procesu testování účinnosti desinfekčních přípravků. Provedení validace dle normy ČSN EN 1040 zahrnuje celkem 3 postupy, z nichž každý se zaměřuje na ověření jiného faktoru, jenž by mohl vnášet zkreslení do výsledků provedených testů (validace "A", "B", "C"). Vyhodnocení validačních zkoušek je založeno na srovnání získaných výsledků (hodnot A, B, C) s limitní hodnotou ( $\frac{1}{2} N_{V0}$ ). Pokud jsou naměřené hodnoty A, B, C rovny nebo vyšší než limitní hodnota, tak daný testovaný faktor nezpůsobuje narušování metodiky.

### 5.2.1 Validace A

Validace "A" je zaměřena na sledování životaschopnosti používaných mikroorganismů během procesu testování. Cílem této validační zkoušky je ověřit, zdali u používaných mikroorganismů nedochází za podmínek testování k samovolnému snižování jejich životaschopnosti.

### 5.2.2 Validace B

Validace "B" je zaměřena na hodnocení vlivu zvoleného neutralizačního roztoku na testované mikroorganismy. Cílem této zkoušky je ověřit, zdali působením používaného neutralizátoru nedochází ke snižování životaschopnosti používaných mikroorganismů.

### 5.2.3 Validace C

Validace "C" je určena ke kontrole účinnosti neutralizačního procesu. Cílem zkoušky je především prokázat, zda je zvolený neutralizační roztok schopen efektivně zablokovat účinek testovaných desinfekčních prostředků.

### 5.2.4 Výsledky validace pro bakteriofága $\phi 6$

#### Validace "A" a "B":

V tabulkách 4 a 5 jsou uvedeny výsledky validačních zkoušek "A" a "B" v podobě průměrných hodnot PFU/ml. Validační zkoušky byly z důvodu dosažení větší průkaznosti prováděny 3× vedle sebe. Dále jsou v tabulkách uvedeny hodnoty titrů použitých validačních suspenzí ( $N_V$ ) spolu s limitní hodnotou ( $\frac{1}{2} N_{V0}$ ).

Tabulka 4 Výsledky validační zkoušky "A" pro bakteriofága  $\phi 6$ 

| VALIDACE "A"                                |                            |                     |                     |
|---|----------------------------|---------------------|---------------------|
| Koncentrace validační suspenze ( $N_v$ )    | 3,5·10 <sup>3</sup> PFU/ml |                     |                     |
| Koncentrace validační suspenze ( $N_{v0}$ ) | 3,5·10 <sup>2</sup> PFU/ml |                     |                     |
| Limit ( $\frac{1}{2} N_{v0}$ )              | 1,8·10 <sup>2</sup> PFU/ml |                     |                     |
| Hodnota A [PFU/ml]                          | 1,7·10 <sup>2</sup>        | 1,8·10 <sup>2</sup> | 1,8·10 <sup>2</sup> |

U jednoho ze série testů validační zkoušky "A" sice nebyl splněn limit odpovídající hodnotě 1,8·10<sup>2</sup> PFU/ml, ovšem následující 2 testy tuto skutečnost nepotvrdily a získané hodnoty již byly rovny stanovenému limitu, tudíž předepsané podmínky splňují. Navíc výsledky testu citlivosti obaleného bakteriofága na demineralizovanou vodu (viz 5.1.1) naznačují, že k samovolnému poklesu životaschopnosti bakteriofága  $\phi 6$  vlivem experimentálních podmínek nedochází. Jelikož byl během validace "A" fág vystavován pouze vlivu demineralizované vody, podobně jako tomu bylo u zmiňovaného testu citlivosti, lze konstatovat, že fág  $\phi 6$  splňuje podmínky validace "A".

Tabulka 5 Výsledky validační zkoušky "B" pro bakteriofága  $\phi 6$ 

| VALIDACE "B"                                |                            |                     |                     |
|---|----------------------------|---------------------|---------------------|
| Koncentrace validační suspenze ( $N_v$ )    | 4,3·10 <sup>3</sup> PFU/ml |                     |                     |
| Koncentrace validační suspenze ( $N_{v0}$ ) | 4,3·10 <sup>2</sup> PFU/ml |                     |                     |
| Limit ( $\frac{1}{2} N_{v0}$ )              | 2,2·10 <sup>2</sup> PFU/ml |                     |                     |
| Hodnota B [PFU/ml]                          | 2,7·10 <sup>2</sup>        | 2,9·10 <sup>2</sup> | 3,0·10 <sup>2</sup> |

Výsledky validační zkoušky "B" dokazují, že používaný neutralizační roztok (složení viz kapitola 4.2) nezpůsobuje snižování životaschopnosti fágových částic. Všechny z naměřených hodnot B jsou vyšší než odpovídající limit. Vzhledem k provedení počátečních testů citlivosti fágů na činidla doporučená normou ČSN EN 1040 byl tento výsledek pro zvolený neutralizátor očekáván (viz kapitola 5.1.1).

**Validace “C“:**

V tabulce 6 jsou shrnuty výsledky validační zkoušky “C“, opět jako průměrné hodnoty PFU/ml. I v tomto případě byla validační zkouška prováděna 3× vedle sebe. Dle doporučení normy byly jednotlivé vzorky desinfekcí podrobovány validačnímu testu pouze v jedné koncentraci, u každého z přípravků byla tedy použita koncentrace odpovídající doporučenému dávkování příslušných desinfekcí, které bylo testováno také v rámci testů účinnosti (viz kapitola 5.3.1).

*Tabulka 6 Výsledky validační zkoušky “C“ pro bakteriofága  $\phi 6$*

| VALIDACE “C“   |                            |                     |                     |
|--|----------------------------|---------------------|---------------------|
| <b>Koncentrace validační suspenze (N<sub>v</sub>)</b>  | 4,3·10 <sup>3</sup> PFU/ml |                     |                     |
| <b>Koncentrace validační suspenze (N<sub>v0</sub>)</b> | 4,3·10 <sup>2</sup> PFU/ml |                     |                     |
| <b>Limit (½ N<sub>v0</sub>)</b>                        | 2,2·10 <sup>2</sup> PFU/ml |                     |                     |
| <b>Vzorky</b>  | <b>Hodnota C [PFU/ml]</b>  |                     |                     |
| 1. SAVO Čistič na podlahy                              | 2,2·10 <sup>2</sup>        | 2,3·10 <sup>2</sup> | 2,5·10 <sup>2</sup> |
| 2. Incidin OxyDes                                      | 4,0·10 <sup>1</sup>        | 5,0·10 <sup>1</sup> | 5,0·10 <sup>1</sup> |
| 3. SPURTEX® Unisanol                                   | 0                          | 0                   | 0                   |
| 4. Dezox   | 3,0·10 <sup>2</sup>        | 3,0·10 <sup>2</sup> | 3,1·10 <sup>2</sup> |
| 5. Desur   | 0                          | 0                   | 0                   |
| 6. Sanytol   | 2,5·10 <sup>2</sup>        | 2,6·10 <sup>2</sup> | 2,8·10 <sup>2</sup> |
| 7. SAVO Original                                       | 0 († HK)                   | 0 († HK)            | 0 († HK)            |

*† HK – testovaný přípravek usmrtil i hostitelskou kulturu*

Validační zkouška “C“ na rozdíl od předchozích dvou zahrnuje do testovacího procesu i jednotlivé vzorky desinfekčních přípravků. Dle výsledků v tabulce 6 je na první pohled patrné, že neutralizace některých z testovaných desinfekčních prostředků zvoleným neutralizačním roztokem nebyla úspěšná. K desinfekčním přípravkům jejichž účinnost nebyla neutralizačním roztokem zablokována se dle výsledků řadí desinfekce: SPURTEX® Unisanol, Desur a SAVO Original. U přípravku SAVO Original byla navíc v důsledku neúčinné neutralizace pozorována inaktivace hostitelské bakteriální kultury. Neutralizace byla neúspěšná také u desinfekce Incidin OxyDes, u které se naměřené hodnoty C pohybují v rozmezí 4,0·10<sup>1</sup>–5,0·10<sup>1</sup> PFU/ml, zatímco limit (½ N<sub>v0</sub>) v tomto případě odpovídá hodnotě 2,2·10<sup>2</sup> PFU/ml.

### 5.2.5 Výsledky validace pro bakteriofága $\phi X174$

#### Validace “A“ a “B“:

Tabulky 7 a 8 zobrazují výsledky validačních zkoušek “A“ a “B“, opět se jedná o průměrné hodnoty PFU/ml, i v tomto případě byly validace prováděny 3× vedle sebe. V tabulkách je také zahrnut údaj o titru validační suspenze ( $N_V$ ) spolu s limitní hodnotou ( $\frac{1}{2} N_{V0}$ ).

*Tabulka 7 Výsledky validační zkoušky “A“ pro bakteriofága  $\phi X174$*

| VALIDACE “A“  |                            |                     |                     |
|---|----------------------------|---------------------|---------------------|
| <b>Koncentrace validační suspenze (<math>N_V</math>)</b>    | 7,4·10 <sup>3</sup> PFU/ml |                     |                     |
| <b>Koncentrace validační suspenze (<math>N_{V0}</math>)</b> | 7,4·10 <sup>2</sup> PFU/ml |                     |                     |
| <b>Limit (<math>\frac{1}{2} N_{V0}</math>)</b>              | 3,7·10 <sup>2</sup> PFU/ml |                     |                     |
| <b>Hodnota A [PFU/ml]</b>                                   | 5,6·10 <sup>2</sup>        | 6,0·10 <sup>2</sup> | 6,2·10 <sup>2</sup> |

V případě neobaleného bakteriofága vyšla validační zkouška “A“ jednoznačně, podle výsledků je zřejmé, že naměřené hodnoty A v rozmezí 5,6·10<sup>2</sup>–6,2·10<sup>2</sup> PFU/ml jsou vyšší než příslušný limit ( $\frac{1}{2} N_{V0}$ ). Experimentální podmínky tedy u neobaleného bakteriofága nezpůsobují pokles životaschopnosti a fág  $\phi X174$  tak splňuje podmínky validace.

*Tabulka 8 Výsledky validační zkoušky “B“ pro bakteriofága  $\phi X174$*

| VALIDACE “B“  |                            |                     |                     |
|---|----------------------------|---------------------|---------------------|
| <b>Koncentrace validační suspenze (<math>N_V</math>)</b>    | 7,4·10 <sup>3</sup> PFU/ml |                     |                     |
| <b>Koncentrace validační suspenze (<math>N_{V0}</math>)</b> | 7,4·10 <sup>2</sup> PFU/ml |                     |                     |
| <b>Limit (<math>\frac{1}{2} N_{V0}</math>)</b>              | 3,7·10 <sup>2</sup> PFU/ml |                     |                     |
| <b>Hodnota B [PFU/ml]</b>                                   | 5,9·10 <sup>2</sup>        | 6,0·10 <sup>2</sup> | 6,4·10 <sup>2</sup> |

Hodnoty získané z validace “B“ potvrzují, že zvolený neutralizační roztok ani v případě neobaleného bakteriofága neměl negativní vliv na jeho životaschopnost.

#### Validace “C“:

Tabulka 9 v sobě zahrnuje výsledky validační zkoušky “C“, i zde jsou výsledky uvedeny stejnou formou jako je popsáno výše. I v tomto případě byla k testování použita pouze jedna koncentrace desinfekčního přípravku – dávka doporučená výrobcem (viz kapitola 5.3.2).

Tabulka 9 Výsledky validační zkoušky "C" pro bakteriofága  $\phi X174$ 

| VALIDACE "C"   |                            |                     |                     |
|--|----------------------------|---------------------|---------------------|
| <b>Koncentrace validační suspenze (N<sub>v</sub>)</b>  | 7,4·10 <sup>3</sup> PFU/ml |                     |                     |
| <b>Koncentrace validační suspenze (N<sub>v0</sub>)</b> | 7,4·10 <sup>2</sup> PFU/ml |                     |                     |
| <b>Limit (½ N<sub>v0</sub>)</b>                        | 3,7·10 <sup>2</sup> PFU/ml |                     |                     |
| <b>Vzorky</b>  | <b>Hodnota C [PFU/ml]</b>  |                     |                     |
| 1. SAVO Čistič na podlahy                              | 5,3·10 <sup>2</sup>        | 5,8·10 <sup>2</sup> | 6,0·10 <sup>2</sup> |
| 2. Incidin OxyDes                                      | 3,1·10 <sup>2</sup>        | 3,4·10 <sup>2</sup> | 3,8·10 <sup>2</sup> |
| 3. SPURTEX® Unisanol                                   | 5,3·10 <sup>2</sup>        | 5,5·10 <sup>2</sup> | 5,8·10 <sup>2</sup> |
| 4. Dezox   | 4,1·10 <sup>2</sup>        | 4,5·10 <sup>2</sup> | 5,0·10 <sup>2</sup> |
| 5. Desur   | 0                          | 0                   | 1                   |
| 6. Sanytol   | 6,1·10 <sup>2</sup>        | 6,8·10 <sup>2</sup> | 6,9·10 <sup>2</sup> |
| 7. SAVO Original                                       | 0 († HK)                   | 0 († HK)            | 0 († HK)            |

† HK – testovaný přípravek usmrtil i hostitelskou kulturu

Výsledky validační zkoušky "C", jež ověřují schopnost neutralizátoru deaktivovat účinné složky desinfekcí opět ukazují, že zvolený neutralizační roztok byl v některých případech neúčinný. Obdobně jako u obaleného bakteriofága, se i v tomto případě jedná o přípravky Desur, SAVO Original a limit nesplňuje opět ani přípravek Incidin OxyDes.

Neutralizace přípravku SPURTEX® Unisanol se dle získaných výsledků jeví jako úspěšná, ovšem v případě bakteriofága  $\phi 6$  tomu tak nebylo. Výsledky získané z následujících testů desinfekční účinnosti (viz kapitola 5.3.2) poukazují na vysokou odolnost neobaleného bakteriofága  $\phi X174$  vůči vlivu této ethanolové desinfekce. Lze tedy předpokládat, že neutralizace desinfekce Unisanol byla také neúspěšná, ovšem vysoká míra perzistence bakteriofága  $\phi X174$  prokázaná testy účinnosti mohla nefungující neutralizátor maskovat.

Doporučená dávka desinfekce Desur při testech účinnosti prokázala jen částečné snížení životaschopnosti bakteriofága  $\phi X174$ . Při validaci byla rovněž testována doporučená dávka tohoto přípravku, ale v tomto případě díky prokazatelně neúčinnému neutralizátoru způsobila úplnou redukci virových částic v suspenzi. Tento jev mohl být způsoben několika faktory, hlavní roli zde zřejmě sehrál faktor času, kdy při testech účinnosti byla fágová suspenze vystavena přímému účinku desinfekce po dobu 5 minut, zatímco při validační zkoušce se jednalo o dobu výrazně vyšší – 30 minut. Vliv na nižší míru přežívání bakteriofága  $\phi X174$  při validaci mohla mít nižší koncentrace validační suspenze v porovnání s koncentrací suspenze využívané při testech účinnosti.



### 5.2.6 Shrnutí validačních testů

Neutralizace je při testování účinnosti desinfekčních přípravků velmi důležitým krokem, to ve své studii zdůrazňují také G. Kampf a kol. (2005), kteří se zabývali neutralizací desinfekce rukou na bázi ethanolu s obsahem chlorhexidinu. Autoři studie upozorňují na problém nedostatečné neutralizace, která může vést k neobjektivitě získaných výsledků (tzv. falešná pozitivita). Jakákoli zbytková aktivita desinfekčního prostředku by měla být zastavena okamžitě po uplynutí doby vymezené k jeho působení, tento požadavek je významný zejména u přípravků s doporučenou krátkou dobou expozice (v řádech sekund). Dle výsledků jimi provedeného experimentu bylo zjištěno, že kombinace 0,5 % lecitinu a 4 % polysorbátu 20 (TWEEN 20) účinně inaktivovala vliv ethanolu i chlorhexidin glukonátu a současně nebyla toxická pro testovací mikroorganismus (*E. coli*). [65]

Neutralizační roztok o tomto složení (0,5 % lecitinu a 4 % polysorbátu 20) by teoreticky mohl účinkovat také na ethanolovou desinfekci SPURTEX® Unisanol, kterou se v rámci validačních testů nepodařilo zneutralizovat. Jeho účinnost a vliv na životaschopnost fágů se z časových důvodů v rámci bakalářské práce nepovedlo ověřit. Nalezení účinných a také netoxických neutralizačních roztoků si proto vyžaduje další testy.

### 5.3 Testy účinnosti desinfekčních prostředků dle modifikované normy ČSN EN 1040

Na základě požadavků normy byla testována doporučená koncentrace jednotlivých desinfekcí a dle prvotních výsledků byly stanoveny další 2 testovací koncentrace (pravidla pro ředění desinfekcí stanovená normou viz kapitola 4.5.4). Vzhledem k různým výsledkům u testovaných bakteriofágů, kdy na neobaleného bakteriofága ( $\phi$ X174) nepůsobila během úvodních testů téměř žádná desinfekce, zatímco na obaleného bakteriofága ( $\phi$ 6) působily všechny, byly dále u každého z fágů testovány jiné koncentrace desinfekčních přípravků. Dle postupu stanoveného normou byla fágová suspenze s ověřeným titrem po dobu 5 minut vystavena působení příslušného desinfekčního prostředku, poté byla část této směsi odebrána a po dobu dalších 5 minut ponechána ve styku s neutralizačním roztokem za účelem deaktivace účinných látek desinfekce. Poté byl ze zneutralizovaného roztoku odebrán vzorek a kultivačně metodou postupného ředění a zalévání do dvouvrstvého agaru byl ze vzorku stanoven počet životaschopných mikroorganismů – hodnota  $N_a$ . Detailní postup provedení testu je i spolu s přehledem výpočetních vztahů uveden v kapitole 4.5.5. Testy byly prováděny 2× vedle sebe pro ověření reprodukovatelnosti metodiky.

#### 5.3.1 Výsledky testu účinnosti pro bakteriofága $\phi$ 6

##### Test č. 1:

Na základě poznatků uvedených v teoretické části práce byla u obaleného bakteriofága předpokládána nižší odolnost vůči vlivu zvolených desinfekcí, proto byla u některých přípravků zvolena nižší z doporučených koncentrací, konkrétně tomu tak bylo u přípravků Desur a Dezox. Pro dvojici zmiňovaných desinfekcí byla v případě tohoto testu zvolena koncentrace 5 ml/l, kterou výrobce uvádí jako doporučenou k inaktivaci bakterií a plísni (nejnižší z doporučených koncentrací), pro dosažení virudního účinku výrobce u těchto přípravků udává doporučenou koncentraci jako 10 ml/l. U přípravků Unisanol a Sanytol byla jako doporučená koncentrace zvolena neředěná forma přípravku, jelikož tyto 2 produkty jsou dle pokynů na obalu určeny k přímému ošetření ploch bez nutnosti ředění.

Tabulka 10 shrnuje výsledky testu účinnosti vybraných desinfekčních přípravků vůči obalenému fágu  $\phi 6$ . V tabulce jsou u jednotlivých testovaných desinfekcí uváděny vždy výsledky pro 3 různá ředění přípravku: doporučená dávka (DD), polovina z doporučená dávky ( $\frac{1}{2}$  DD), desetinásobné zředění přípravku ( $10\times$  ř.).

Tabulka 10 Souhrn výsledků testování účinnosti desinfekčních přípravků na fága  $\phi 6$

| Koncentrace suspenze (N)               | 4,3·10 <sup>8</sup> PFU/ml |           |                                 |              |
|--|----------------------------|-----------|---------------------------------|--------------|
| Koncentrace suspenze (N <sub>0</sub> ) | 4,3·10 <sup>7</sup> PFU/ml |           |                                 |              |
| Testovaná desinfekce                   | Koncentrace vzorku         |           | Hodnota N <sub>a</sub> [PFU/ml] | Hodnota logR |
| Demineralizovaná voda                  | neředěno                   |           | 4,7·10 <sup>6</sup>             | 0,96         |
| 1. SAVO Čistič na podlahy              | DD                         | 12,5 ml/l | 0                               | 7,63         |
|  | $\frac{1}{2}$ DD           | 6,25 ml/l | 0                               | 7,63         |
|  | 10× ř.                     | 1,25 ml/l | 0                               | 7,63         |
| 2. Incidin OxyDes                      | DD                         | 10 ml/l   | 0                               | 7,63         |
|  | $\frac{1}{2}$ DD           | 5 ml/l    | 0                               | 7,63         |
|  | 10× ř.                     | 1 ml/l    | 0                               | 7,63         |
| 3. SPURTEX® Unisanol                   | DD                         | neředěno  | 0                               | 7,63         |
|  | $\frac{1}{2}$ DD           | 500 ml/l  | 0                               | 7,63         |
|  | 10× ř.                     | 50 ml/l   | 0                               | 7,63         |
| 4. Dezox                               | DD                         | 5 ml/l    | 0                               | 7,63         |
|  | $\frac{1}{2}$ DD           | 2,5 ml/l  | 0                               | 7,63         |
|  | 10× ř.                     | 0,5 ml/l  | 0                               | 7,63         |
| 5. Desur                               | DD                         | 5 ml/l    | 0                               | 7,63         |
|  | $\frac{1}{2}$ DD           | 2,5 ml/l  | 0                               | 7,63         |
|  | 10× ř.                     | 0,5 ml/l  | 0                               | 7,63         |
| 6. Sanytol                             | DD                         | neředěno  | 0                               | 7,63         |
|  | $\frac{1}{2}$ DD           | 500 ml/l  | 0                               | 7,63         |
|  | 10× ř.                     | 50 ml/l   | 0                               | 7,63         |
| 7. SAVO Original                       | DD                         | 222 ml/l  | 0 († HK)                        | /            |
|  | $\frac{1}{2}$ DD           | 111 ml/l  | 0                               | 7,63         |
|  | 10× ř.                     | 22,2 ml/l | 0                               | 7,63         |

DD – doporučená dávka přípravku,  $\frac{1}{2}$  DD – polovina z doporučené dávky,

10× ř. – desetinásobné zředění přípravku

U prvního testu došlo k inaktivaci obaleného bakteriofága  $\phi 6$  u všech testovaných desinfekčních přípravků, dokonce i u  $10\times$  ředěných vzorků bylo zaznamenáno 0 PFU/ml. U přípravku SAVO Original byla v případě doporučené dávky (DD) pozorována inaktivace hostitelské kultury, obdobně jako tomu bylo u validací, počet plaků tak nebylo možné prostřednictvím této metody stanovit.

### Test č. 2:

V tabulce 11 jsou uvedeny výsledky opakovaného testu účinnosti vybraných desinfekčních přípravků vůči fágu  $\phi 6$ . Vzhledem k výsledkům testu č. 1 bylo u opakovacího testu provedeno stanovení jen pro vzorky desinfekcí po desetinásobném zředění.

*Tabulka 11 Souhrn výsledků opakovaného testu účinnosti desinfekčních přípravků na fága  $\phi 6$*

| Koncentrace suspenze (N)               | 4,3·10 <sup>8</sup> PFU/ml |           |                                 |              |
|--|----------------------------|-----------|---------------------------------|--------------|
| Koncentrace suspenze (N <sub>0</sub> ) | 4,3·10 <sup>7</sup> PFU/ml |           |                                 |              |
| Testovaná desinfekce                   | Koncentrace vzorku         |           | Hodnota N <sub>a</sub> [PFU/ml] | Hodnota logR |
| Demineralizovaná voda                  | neředěno                   |           | 5,1·10 <sup>6</sup>             | 0,93         |
| 1. SAVO Čistič na podlahy              | 10× ř.                     | 6,25 ml/l | 0                               | 7,63         |
| 2. Incidin OxyDes                      | 10× ř.                     | 5 ml/l    | 0                               | 7,63         |
| 3. SPURTEX® Unisanol                   | 10× ř.                     | 50 ml/l   | 0                               | 7,63         |
| 4. DezoX                               | 10× ř.                     | 0,5 ml/l  | 0                               | 7,63         |
| 5. Desur                               | 10× ř.                     | 0,5 ml/l  | 0                               | 7,63         |
| 6. Sanytol                             | 10× ř.                     | 50 ml/l   | 0                               | 7,63         |
| 7. SAVO Original                       | 10× ř.                     | 22,2 ml/l | 0                               | 7,63         |

*10× ř. – desetinásobné zředění přípravku*

Výše zmiňovaný předpoklad o nižší odolnosti obaleného bakteriofága byl na základě získaných výsledků potvrzen. Všechny z testovaných desinfekčních přípravků prokázaly vůči fágu  $\phi 6$  vysokou desinfekční účinnost, a to i v případě nejvyššího z provedených ředění (potvrzeno opakovacím testem). Testované přípravky tedy pro obaleného bakteriofága  $\phi 6$  splnily požadavek normy ČSN EN 1040, jenž udává, že desinfekce může být prohlášena za účinnou (vyhovující normě) v případě snížení životaschopnosti použitého mikroorganismu nejméně o 5 logaritů.

Vysoká účinnost na bakteriofága  $\phi 6$  mohla být také ovlivněna neúčinnou neutralizací, díky čemuž byl fág vystaven vlivu některých desinfekcí (viz kapitola 5.2.4) déle než norma

stanovuje. Nicméně nižší míra perzistence fága  $\phi 6$  vůči vlivu desinfekčních přípravků je známým faktem, dosažené výsledky tedy odpovídají poznatkům uvedeným v odborných člancích. [66]

Možným řešením problému nízké odolnosti obaleného bakteriofága  $\phi 6$  by do budoucna (při vylepšování této metodiky) mohlo být jeho doplnění fágem MS2. Ačkoli MS2 patří mezi fágy neobalené, objevuje se často spolu s fágem  $\phi 6$  v řadě studií zaměřených na substituci obalených virů, zvláště závažných patogenů, kde prokazuje vyšší odolnost v porovnání s fágem  $\phi 6$ . [48; 67]

Na základě našich získaných výsledků by bylo vhodné zvážit použití MS2 jako možné náhrady obalených virů, jenž se řadí mezi závažné patogeny (např. virus Ebola), ačkoli je podle řady autorů ideální náhradou právě  $\phi 6$ . [67]

### 5.3.2 Výsledky testu účinnosti pro bakteriofága $\phi X174$

#### Test č. 1:

Vzhledem ke skutečnosti, že bakteriofág  $\phi X174$  nedisponuje lipidovým obalem, a řadí se tedy mezi neobalené bakteriofágy, bylo předpokládáno, že vůči vlivu testovaných desinfekčních přípravků bude vykazovat vyšší perzistenci. Na základě tohoto předpokladu byla pro účely testování s fágem  $\phi X174$  u přípravků Desur a DezoX zvolena nejvyšší z doporučených koncentrací: 20 ml/l, dle výrobce je tato koncentrace určena pro tuberkulocidní působení. Dávka určená výrobcem jako virucidní byla v případě dvojice zmiňovaných přípravků testována v rámci poloviny z doporučené dávky (10 ml/l). Koncentrace odpovídající desetinásobnému zředění přípravků byla z důvodu očekávané vyšší odolnosti fága vynechána.

Tabulka 12 shrnuje výsledky testu účinnosti vybraných desinfekčních přípravků vůči neobalenému fágu  $\phi X174$ , výsledky jsou opět uváděny pro zvolená ředění desinfekčních přípravků, v tomto případě byla u desinfekcí testována doporučená dávka (DP) a polovina z doporučené dávky ( $\frac{1}{2}$  DP).

Tabulka 12 Souhrn výsledků testu účinnosti desinfekčních přípravků na fága  $\phi X174$

| Koncentrace suspenze (N)               | 9,3·10 <sup>8</sup> PFU/ml |                                 |              |
|--|----------------------------|---------------------------------|--------------|
| Koncentrace suspenze (N <sub>0</sub> ) | 9,3·10 <sup>7</sup> PFU/ml |                                 |              |
| Testovaná desinfekce                   | Koncentrace vzorku         | Hodnota N <sub>a</sub> [PFU/ml] | Hodnota logR |
| Demineralizovaná voda                  | neředěno                   | 4,1·10 <sup>6</sup>             | 1,36         |
| 1. SAVO Čistič na podlahy              | neředěno                   | 9,8·10 <sup>5</sup>             | 1,98         |
|  | DD 12,5 ml/l               | 6,2·10 <sup>5</sup>             | 2,18         |
| 2. Incidin OxyDes                      | DD 10 ml/l                 | 7,8·10 <sup>5</sup>             | 2,08         |
|  | $\frac{1}{2}$ DD 5 ml/l    | 5,8·10 <sup>5</sup>             | 2,21         |
| 3. SPURTEX® Unisanol                   | DD neředěno                | 1,8·10 <sup>5</sup>             | 2,71         |
|  | $\frac{1}{2}$ DD 500 ml/l  | 5,0·10 <sup>5</sup>             | 2,27         |
| 4. Dezox                               | DD 20 ml/l                 | 1,1·10 <sup>5</sup>             | 2,93         |
|  | $\frac{1}{2}$ DD 10 ml/l   | 8,5·10 <sup>5</sup>             | 2,04         |
| 5. Desur                               | DD 20 ml/l                 | 1,0·10 <sup>4</sup>             | 3,97         |
|  | $\frac{1}{2}$ DD 10 ml/l   | 1,0·10 <sup>6</sup>             | 1,97         |
| 6. Sanytol                             | DD neředěno                | 4,7·10 <sup>5</sup>             | 2,30         |
|  | $\frac{1}{2}$ DD 500 ml/l  | 8,5·10 <sup>5</sup>             | 2,04         |
| 7. SAVO Original                       | DD 222 ml/l                | 0 († HK)                        | /            |
|  | $\frac{1}{2}$ DD 111 ml/l  | 1,1·10 <sup>4</sup>             | 3,93         |

DD – doporučená dávka přípravku,  $\frac{1}{2}$  DD – polovina z doporučené dávky,

† HK – testovaný přípravek usmrtil i hostitelskou kulturu

U prvního z provedených testů účinnosti desinfekčních prostředků na neobaleného fága  $\phi X174$  došlo ke snížení počtu plaků nanejvýše o 2 řády u přípravků Desur (DD) a SAVO Original ( $\frac{1}{2}$  DD) oproti demineralizované vodě. Při testování doporučené dávky přípravku SAVO Original se neúčinnost neutralizátoru projevila opět v podobě usmrcení bakteriální hostitelské kultury, počet plaků tedy nebylo možné pro tento vzorek stanovit.

**Test č. 2:**

V tabulce 13 jsou uvedeny výsledky získané z opakovaného testu účinnosti desinfekčních přípravků vůči fágu  $\phi X174$ . Dle prvotních výsledků, které poukazují na vysokou odolnost neobaleného fága (viz tabulka 12) byla u přípravků (kromě SAVA Original) otestována navíc varianta jejich neředěných forem.

*Tabulka 13 Souhrn výsledků opakovaného testu účinnosti desinfekčních přípravků na fága  $\phi X174$*

|   |                            |           |                                       |                     |
|---|----------------------------|-----------|---------------------------------------|---------------------|
| <b>Koncentrace suspenze (N)</b>             | 9,3·10 <sup>8</sup> PFU/ml |           |                                       |                     |
| <b>Koncentrace suspenze (N<sub>0</sub>)</b> | 9,3·10 <sup>7</sup> PFU/ml |           |                                       |                     |
| <b>Testovaná desinfekce</b>                 | <b>Koncentrace vzorku</b>  |           | <b>Hodnota N<sub>a</sub> [PFU/ml]</b> | <b>Hodnota logR</b> |
| Reference                                   | neředěno                   |           | 4,9·10 <sup>6</sup>                   | 1,28                |
| 1. SAVO Čistič na podlahy                   | neředěno                   |           | 4,3·10 <sup>5</sup>                   | 2,34                |
|   | DD                         | 12,5 ml/l | 7,4·10 <sup>5</sup>                   | 2,10                |
| 2. Incidin OxyDes                           | neředěno                   |           | 0 († HK)                              | /                   |
|   | DD                         | 10 ml/l   | 5,1·10 <sup>5</sup>                   | 2,26                |
|   | ½ DD                       | 5 ml/l    | 8,0·10 <sup>5</sup>                   | 2,07                |
| 3. SPURTEX® Unisanol                        | DD                         | neředěno  | 5,9·10 <sup>5</sup>                   | 2,20                |
|   | ½ DD                       | 500 ml/l  | 4,8·10 <sup>5</sup>                   | 2,29                |
| 4. Dezox                                    | neředěno                   |           | 0 († HK)                              | /                   |
|   | DD                         | 20 ml/l   | 5,0·10 <sup>5</sup>                   | 2,27                |
|   | ½ DD                       | 10 ml/l   | 7,9·10 <sup>5</sup>                   | 2,07                |
| 5. Desur                                    | neředěno                   |           | 0 († HK)                              | /                   |
|   | DD                         | 20 ml/l   | 5,1·10 <sup>4</sup>                   | 3,26                |
|   | ½ DD                       | 10 ml/l   | 5,0·10 <sup>5</sup>                   | 2,27                |
| 6. Sanytol                                  | DD                         | neředěno  | 6,9·10 <sup>5</sup>                   | 2,13                |
|   | ½ DD                       | 500 ml/l  | 9,9·10 <sup>5</sup>                   | 1,97                |
| 7. SAVO Original                            | DD                         | 222 ml/l  | 0 († HK)                              | /                   |
|   | 10× ř.                     | 22,2 ml/l | 1,0·10 <sup>4</sup>                   | 3,97                |

*DD – doporučená dávka přípravku, ½ DD – polovina z doporučené dávky,*

*† HK – testovaný přípravek usmrtil i hostitelskou kulturu*

Naměřené hodnoty testu 2 potvrdily výsledky předcházejícího měření. Při srovnání hodnot obou testů se počty plaků u jednotlivých vzorků neliší více než 0,5 log řádu, což je v rámci chyby metodiky. Podobně jako u prvního testu, došlo i zde k usmrcení hostitelských bakterií u doporučené dávky přípravku SAVO Original. K tomu mohlo přispět i vysoké pH přípravku. Provedené měření pH u roztoku doporučené dávky odpovídalo hodnotě 11. K usmrcení hostitelských bakterií dále došlo u neředěných desinfekcí Incidin OxyDes, Desur a Dezox. U desinfekcí v této koncentraci není tedy možné stanovit jejich účinek vůči fágu  $\phi$ X174 touto metodou.

Dle naměřených výsledků se u bakteriofága  $\phi$ X174 potvrdil předpoklad o jeho vyšší odolnosti vůči vlivu testovaných desinfekčních přípravků. Na neobaleného bakteriofága  $\phi$ X174 nevykazovala žádná z testovaných desinfekcí účinek (viz hodnoty logR výrazně nižší než 5). [66]

U přípravku SAVO Čistič na podlahy bylo výrobcem dokonce doporučováno využití neředěné formy prostředku k dosažení desinfekčního účinku. Výrobce ovšem působnost přípravku upravoval pro bakterie a obalené viry (SARS-CoV-2 či Modified Vaccinia Virus Ankara) na neobaleného bakteriofága tedy dle očekávání přípravek neúčinkoval.

Pro přípravek Incidin OxyDes výrobce uváděl jako virucidní dávku 10 ml/l (koncentrace byla testována v rámci doporučené dávky), ovšem rozsah působnosti výrobcem uvedený opět zahrnoval zástupce z řad obalených virů (HIV, HBC, HBV), na neobaleného fága nevykazovala tato koncentrace u přípravku Incidin OxyDes výraznější působení.

Účinnost přípravku SPURTEX® Unisanol navrženého za účelem desinfekce nanoroušek byla cílena na obalený virus SARS-CoV-2, proto výraznější působení na neobaleného bakteriofága nebylo očekáváno, což se dle naměřených výsledků také potvrdilo. Hlavní účinnou látkou tohoto přípravku je ethanol, který na neobalené bakteriofágy nepůsobí.

Přípravek Sanytol je podobně jako většina ostatních výrobků svým virucidním působením zacílena na obalené viry (Herpes simplex, Influenza A), účinek na neobaleného fága nebyl tedy ani zde podobně jako u ostatních testovaných výrobků zaznamenán.

U přípravků Desur a Dezox výrobce udával dávku určenou pro virudní působení (blíže nespecifikované) jako 10 ml/l (testováno jako ½ z doporučené dávky), současně byla testována také vyšší dávka (20 ml/l pro tuberkulocidní působení). Ani jedna z testovaných koncentrací u dvojice těchto přípravků nevykazovala vůči fágu  $\phi$ X174 účinek. Neúčinnost zejména u této dvojice přípravků mohla být ovlivněna délkou kontaktního času mezi



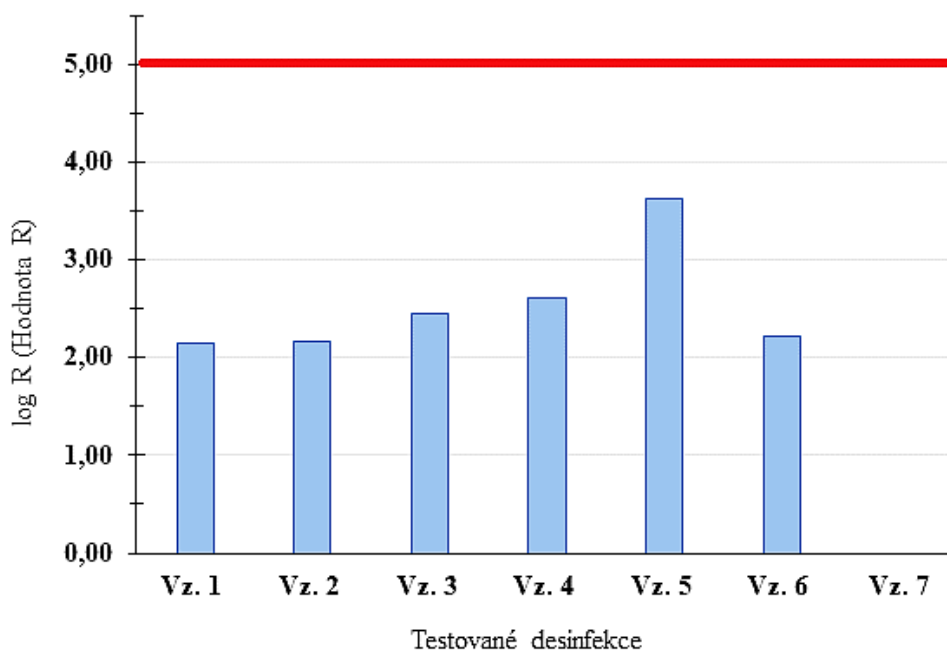
suspenzi a testovaným roztokem, jenž byla pouze 5 minut. Dle výrobce je ovšem pro dosažení virucidního účinku doporučován kontaktní čas 60 minut. Zmiňovaný vliv krátké kontaktní doby mezi suspenzí a vzorkem mohl sehrát roli ovšem i u dalších z testovaných přípravků. V tabulce 14 je uveden přehled dob působení spolu s účinkem a příslušnou koncentrací pro jednotlivé testované přípravky.

*Tabulka 14 Přehled doporučených dob působení pro testované koncentrace přípravků*

| <b>Přípravek</b>       | <b>Koncentrace</b> | <b>Účinek</b>                | <b>Doba působení</b> |
|------------------------|--------------------|------------------------------|----------------------|
| SAVO Čistič na podlahy | neředěno           | bakterie, obalené viry       | 15 min               |
| Incidin OxyDes         | 10 ml/l            | virucidní (obalené viry)     | 15 min               |
| SPURTEX® Unisanol      | /                  | SARS-CoV-2                   | /                    |
| Dezox + Desur          | 5 ml/l             | baktericidní                 | 30 min               |
| Dezox + Desur          | 10 ml/l            | virucidní                    | 60 min               |
| Dezox + Desur          | 20 ml/l            | tuberkulocidní               | 60 min               |
| Sanytol                | /                  | virucidní (obalené viry)     | 5 min                |
| SAVO Original          | 222 ml/l           | viry, bakterie, plísňe, řasy | 30 min               |

Na základě těchto skutečností by bylo vhodné otestovat vliv prodloužení kontaktní doby mezi mikrobiální suspenzí a desinfekcí. Což by vyžadovalo další sérii testů, které nebyly hlavním tématem práce.

Pro větší názornost při porovnávání účinku jednotlivých testovaných desinfekcí na neobaleného bakteriofága  $\phi$ X174 byl vytvořen graf (viz obrázek 11), jenž znázorňuje míru dosažené redukce životaschopnosti (hodnoty logR) u jednotlivých testovaných přípravků. Do grafu byly zakomponovány průměrné hodnoty získané z testu č. 1 a testu č. 2 pro doporučené dávky testovaných přípravků. V grafu je červenou čarou znázorněna hranice, která dle normy ČSN EN 1040 určuje, zdali může být daná desinfekce prohlášena za účinnou. Jak již bylo zmiňováno výše, touto hraniční hodnotou je dosažení snížení životaschopnosti testovacích mikroorganismů o 5 logaritmů.



Obrázek 11 Míra účinnosti (hodnoty redukce R) testovaných přípravků (pro ředění dle doporučené dávky) vůči neobalenému fágu  $\phi X174$

Vz. 1 – SAVO Čistič na podlahy, Vz. 2 – Incidin OxyDes, Vz. 3 – SPURTEX® Unisanol, Vz. 4 – Dezox, Vz. 5 – Desur, Vz. 6 – Sanytol, Vz. 7 – SAVO Original.

Z obrázku 11 je patrné, že testované desinfekční prostředky jsou v redukci životaschopnosti neobaleného bakteriofága víceméně na podobné úrovni, mírně vyšší hodnotu pak vykazuje Vz. 5, tedy desinfekční přípravek Desur.

## 6 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo shrnout základní poznatky o bakteriofázích, vytvořit přehlednou rešerši o možnostech jejich využití v rámci antivirálních zkoušek se zaměřením zejména na testování desinfekčních přípravků a v neposlední řadě bylo cílem také získané informace převést do praxe zavedením uceleného postupu základního testování desinfekčních přípravků za využití bakteriofágů.

K zavedení postupu testování účinnosti desinfekčních přípravků byla zvolena norma ČSN EN 1040 (Chemické desinfekční přípravky a antiseptika), která upravuje postupy suspenzního testu za využití bakterií. V mikrobiologické laboratoři Centra polymerních systémů Univerzity Tomáše Bati, v níž bylo provedení praktické části práce realizováno, jsou postupy z normy ČSN EN 1040 běžně využívány pro účely testování baktericidního účinku desinfekčních přípravků. Prověřené postupy této normy byly tedy přejaty a modifikovány na použití bakteriofágů jako testovacích mikroorganismů. Volba bakteriofágů pro účely testování byla podložena informacemi získanými z rešerší, jako zástupce obalených bakteriofágů byl zvolen fág  $\phi 6$  a za skupinu neobalených fágů  $\phi X174$ .

Praktická část práce byla zahájena provedením testů citlivosti dvojice zvolených bakteriofágů na činidla doporučená normou ČSN EN 1040. Dle výsledků této zkoušky bylo zjištěno, že neutralizační roztok s obsahem SDS (4 g/l) inaktivuje obaleného bakteriofága  $\phi 6$ , zatímco na životaschopnost fága  $\phi X174$  neměl přídavek SDS vliv. Další testovaná činidla (základní neutralizační roztok, neutralizační roztok s thiosíranem a demineralizovaná voda) nevykazovala negativní vliv na životaschopnost ani u jednoho z fágů.

Dalším krokem bylo provedení validace metody, ta zahrnovala celkem 3 postupy pro ověření vlivů, jenž by mohly zkreslovat získané výsledky. U obou bakteriofágů bylo validací ověřeno, že nedochází k poklesu jejich životaschopnosti vlivem experimentálních podmínek (validace A) a také, že zvolený neutralizační roztok nepůsobí na bakteriofágy toxicky (validace B), obdobný výsledek již nastínily provedené testy citlivosti. Validací zkouška "C" poukázala na problém s neutralizací u 4 testovaných přípravků (Incidin OxyDes, SPURTEX® Unisanol, Desur a SAVO Original), další 3 testované desinfekce se podařilo účinně zneutralizovat.

Hlavní náplní praktické části práce bylo samotné testování účinnosti zvolených desinfekčních prostředků vůči fágům  $\phi 6$  a  $\phi X174$ . Pro účely testování bylo zvoleno celkem 7 přípravků: SAVO Čistič na podlahy, Incidin OxyDes, SPURTEX® Unisanol, Dezox, Desur, Sanytol a SAVO Original.

Dle naměřených výsledků bylo zjištěno, že zvolené přípravky ve všech testovaných koncentracích vykazují vysokou účinnost vůči obalenému fágu  $\phi 6$ , u kterého ani v případě nejnižšího ředění přípravků ( $10\times$  zředěno) nedošlo k nárustu žádných plaků a hodnota  $N_a$  tak činila 0 PFU/ml. U obaleného bakteriofága všechny z testovaných desinfekcí splnily požadavek normy o účinnosti – snížení životaschopnosti testovacího mikroorganismu o 5 logaritmů.

U neobaleného bakteriofága byla situace s účinností přípravků opačná. Dle naměřených výsledků žádná z testovaných desinfekcí nedosahovala u fága  $\phi X174$  požadovaného snížení jeho životaschopnosti. Mírně vyšší hodnoty redukce byly zaznamenány u přípravků Desur (doporučená dávka) a SAVO Original (polovina z doporučené dávky), ale ani v tomto případě nebyl požadavek normy splněn. Možný vliv na nízkou účinnost desinfekcí mohl mít krátký kontaktní čas mezi fágovou suspenzí a testovaným vzorkem. Dle normy byl pro kontakt mezi suspenzí a vzorkem vymezen čas 5 minut, zatímco kontaktní časy doporučené výrobcí byly u většiny přípravků výrazně vyšší. Hodnocení účinnosti po navýšení kontaktní doby mezi suspenzí a testovaným vzorkem by mělo být předmětem dalšího zkoumání.

Hlavním přínosem bakalářské práce je, že se podařilo zavést a otestovat ucelený postup pro testování účinnosti desinfekčních prostředků za využití bakteriofágů  $\phi X174$  a  $\phi 6$ . Při zavádění této metodiky bylo zjištěno, že neutralizační roztok s SDS působí virucidně vůči obalnému fágu  $\phi 6$ . Dále bylo zjištěno, že používaný neutralizátor (lecitin 3 g/l, polysorbát 80 30 g/l, thiosíran sodný 5 g/l) neutralizoval účinné látky přípravků SAVO Čistič na podlahy, Dezox a Sanytol. Provedené testy účinnosti prokázaly, že na obaleného bakteriofága účinkují všechny z testovaných desinfekcí, zatímco v případě neobaleného bakteriofága žádná z testovaných desinfekcí nebyla natolik účinná, aby splnila požadavek normy (snížení životaschopnosti alespoň o 5 log).

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] BREITBART, Mya a Forest ROHWER. Here a virus, there a virus, everywhere the same virus?. *Trends in Microbiology*. 2005, **13**(6), 278-284. ISSN 0966842X. Dostupné z: doi:10.1016/j.tim.2005.04.003
- [2] RIBEIRO, Jhonatan, Giovana PEREIRA, Renata KOBAYASHI a Gerson NAKAZATO. Antiphage activity of natural and synthetic substances: a new age for antivirals?. *Future Microbiology*. 2020, **15**(9), 767-777. ISSN 1746-0913. Dostupné z: doi:10.2217/fmb-2019-0320
- [3] KUTTER, Elizabeth a Alexander SULAKVELIDZE. *Bacteriophages: Biology and Applications*. CRC Press, 2004. ISBN 9780849313363.
- [4] SULAKVELIDZE, Alexander, Zemphira ALAVIDZE a J. MORRIS. Bacteriophage Therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2001, **45**(3), 649-659. ISSN 0066-4804. Dostupné z: doi:10.1128/AAC.45.3.649-659.2001
- [5] CHANISHVILI, Nina. Phage Therapy—History from Twort and d'Herelle Through Soviet Experience to Current Approaches. *Bacteriophages, Part B*. Elsevier, 2012, 3-40. *Advances in Virus Research*. ISBN 9780123944382. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-394438-2.00001-3
- [6] SUMMERS, William C. History of Virology: Bacteriophages. *Encyclopedia of Virology*. Elsevier, 2019, 3-9. ISBN 9780128145166. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-809633-8.20950-3
- [7] BARR, Jeremy, Frances SLATER, Toshikazu FUKUSHIMA a Philip BOND. Evidence for bacteriophage activity causing community and performance changes in a phosphorus-removal activated sludge. *FEMS Microbiology Ecology*. 2010, **74**(3), 631-642. ISSN 01686496. Dostupné z: doi:10.1111/j.1574-6941.2010.00967.x
- [8] SHKOPOROV, Andrey a Colin HILL. Bacteriophages of the Human Gut: The “Known Unknown” of the Microbiome. *Cell Host & Microbe*. 2019, **25**(2), 195-209. ISSN 1931-3128. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.01.017.
- [9] PATTNAIK, Gourab a HIRAK CHAKRABORTY. Entry Inhibitors: Efficient Means to Block Viral Infection. *The Journal of Membrane Biology*. 2020, **253**(5), 425-444. ISSN 0022-2631. Dostupné z: doi:10.1007/s00232-020-00136-z
- [10] WAGNER, Robert a Robert KRUG. Virus. In: *Encyclopedia Britannica* [online]. 2020 [cit. 2021-10-17]. Dostupné z: https://www.britannica.com/science/virus
- [11] ROSYPAL, Stanislav. *Úvod do molekulární biologie*. 1.díl. 2., rozš. vyd. Brno: Stanislav Rosypal, 1997, , 270 s. ISBN (brož.).
- [12] LODISH, Harvey, Arnold BERK a S. ZIPURSKY. *Molecular Cell Biology*. 4. vydání. New York: W. H. Freeman, 2000. ISBN 9780716737063.
- [13] PARVEZ, Mohammad Khalid. Geometric architecture of viruses. *World Journal of Virology*. 2020, **9**(2), 5-18. ISSN 2220-3249. Dostupné z: doi:10.5501/wjv.v9.i2.5
- [14] Virus: Graphical representation of Capsid symmetry. In: *Coda* [online]. [cit. 2022-05-09]. Dostupné z: https://coda.io/@themicrobedirectory/microbiology-guides/virus-15
- [15] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnologie*. 2. vyd., ve VP 1. vyd. Praha: Victoria Publishing, 1995. ISBN 80-856-0571-6.
- [16] MORGAN, Gregory a W. PITTS. Evolution without Species: The Case of Mosaic Bacteriophages. *The British Journal for the Philosophy of Science*. 2008, **59**(4), 745-765. ISSN 0007-0882. Dostupné z: doi:10.1093/bjps/axn038

- [17] FISCHETTI, Vincent A. *Bacteriophage lysins as effective antibacterials*. 2008, **11**(5), 393-400. ISSN 1369-5274. Dostupné z: doi:10.1016/j.mib.2008.09.012
- [18] WANG, Ing-Nang, David SMITH a Ry YOUNG. Holins: The Protein Clocks of Bacteriophage Infections. *Annual Review of Microbiology*. 2000, **54**(1), 799-825. ISSN 0066-4227. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.micro.54.1.799
- [19] ACKERMANN, Hans W. Bacteriophage taxonomy. *Microbiology Australia*. 2011, **32**(2), 90-94. ISSN 1324-4272. Dostupné z: doi:10.1071/MA11090
- [20] ACKERMANN, H.-W. Bacteriophage observations and evolution. *Research in Microbiology*. 2003, **154**(4), 245-251. ISSN 09232508. Dostupné z: doi:10.1016/S0923-2508(03)00067-6
- [21] CHERWA, James a Bentley FANE. Microviridae: Microviruses and Gokushoviruses. *ELS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester*. 2011. Dostupné z: doi:10.1002/9780470015902.a0000781.pub2
- [22] Microviridae. *Virus Taxonomy*. Elsevier, 2012, 385-393. ISBN 9780123846846. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-384684-6.00037-9
- [23] OLSTHOORN, René a Jan DUIN. Bacteriophages with ssRNA. *ELS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester*. 2011. Dostupné z: doi:10.1002/9780470015902.a0000778.pub3
- [24] PORANEN, Minna a Sari MÄNTYNEN. ICTV Virus Taxonomy Profile: Cystoviridae. *Journal of General Virology*. 2017, **98**(10), 2423-2424. ISSN 0022-1317. Dostupné z: doi:10.1099/jgv.0.000928
- [25] MÄNTYNEN, Sari, Lotta-Riina SUNDBERG a Minna PORANEN. Recognition of six additional cystoviruses: Pseudomonas virus phi6 is no longer the sole species of the family Cystoviridae. *Archives of Virology*. 2018, **163**(4), 1117-1124. ISSN 0304-8608. Dostupné z: doi:10.1007/s00705-017-3679-4
- [26] KARTHIK, Kumaragurubaran. Bacteriophages: Effective Alternative to Antibiotics. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*. 2014, **2**(3), 1-7. ISSN 23078316. Dostupné z: doi:10.14737/journal.aavs/2014/2.3s.1.7
- [27] GILL, Jason a Paul HYMAN. Phage Choice, Isolation, and Preparation for Phage Therapy. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2010, **11**(1), 2-14. ISSN 13892010. Dostupné z: doi:10.2174/138920110790725311
- [28] MATSUZAKI, Shigenobu, Jumpei UCHIYAMA, Iyo TAKEMURA-UCHIYAMA a Masanori DAIBATA. Perspective: The age of the phage. *Nature*. 2014, **509**(7498), 9-9. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/509S9a
- [29] TURGEON, Nathalie, Marie-Josée TOULOUSE, Bruno MARTEL, Sylvain MOINEAU, Caroline DUCHAINE a M. YATES. Comparison of Five Bacteriophages as Models for Viral Aerosol Studies. *Applied and Environmental Microbiology*. 2014, **80**(14), 4242-4250. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.00767-14
- [30] MIZIELIŃSKA, Małgorzata, Paweł NAWROTEK, Xymena STACHURSKA, Magdalena ORDON a Artur BARTKOWIAK. Packaging Covered with Antiviral and Antibacterial Coatings Based on ZnO Nanoparticles Supplemented with Geraniol and Carvacrol. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, **22**(4). ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms22041717
- [31] ADCOCK, Noreen, Eugene RICE, Mano SIVAGANESAN, Justin BROWN, David STALLKNECHT a David SWAYNE. The use of bacteriophages of the family Cystoviridae as surrogates for H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses in persistence and inactivation studies. *Journal of Environmental Science and Health*,

- Part A*. 2009, **44**(13), 1362-1366. ISSN 1093-4529. Dostupné z: doi:10.1080/10934520903217054
- [32] AQUINO DE CARVALHO, Nathalia, Elyse STACHLER, Nicole CIMABUE a Kyle BIBBY. *Evaluation of Phi6 Persistence and Suitability as an Enveloped Virus Surrogate*. 2017, **51**(15), 8692-8700. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/acs.est.7b01296
- [33] COCK, Ian a FR KALT. A modified MS2 bacteriophage plaque reduction assay for the rapid screening of antiviral plant extracts. *Pharmacognosy Research*. 2010, **2**(4). ISSN 0974-8490. Dostupné z: doi:10.4103/0974-8490.69108
- [34] SINCLAIR, Ryan, Joan ROSE, Syed HASHSHAM, Charles GERBA a Charles HAAS. Criteria for Selection of Surrogates Used To Study the Fate and Control of Pathogens in the Environment. *Applied and Environmental Microbiology*. 2012, **78**(6), 1969-1977. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.06582-11
- [35] WHITWORTH, Carrie, Yi MU, Hollis HOUSTON, Marla MARTINEZ-SMITH, Judith NOBLE-WANG, Angela COULLIETTE-SALMOND, Laura ROSE a Donald SCHAFFNER. Persistence of Bacteriophage Phi 6 on Porous and Nonporous Surfaces and the Potential for Its Use as an Ebola Virus or Coronavirus Surrogate. *Applied and Environmental Microbiology*. 2020, **86**(17). ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.01482-20
- [36] SHEN, Chaopeng, Mantha PHANIKUMAR, Theng FONG, Irfan ASLAM, Shawn MCELMURRY, Stephanie MOLLOY a Joan ROSE. *Evaluating Bacteriophage P22 as a Tracer in a Complex Surface Water System: The Grand River, Michigan*. 2008, **42**(7), 2426-2431. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/es702317t
- [37] VASICKOVA, P., I. PAVLIK, M. VERANI a A. CARDUCCI. Issues Concerning Survival of Viruses on Surfaces. *Food and Environmental Virology*. 2010, **2**(1), 24-34. ISSN 1867-0334. Dostupné z: doi:10.1007/s12560-010-9025-6
- [38] RAKOWSKA, Paulina, Mariavitalia TIDDIA, Nilofar FARUQUI, Claire BANKIER, Yiwen PEI, Andrew POLLARD, Junting ZHANG a Ian GILMORE. Antiviral surfaces and coatings and their mechanisms of action. *Communications Materials*. 2021, **2**(1). ISSN 2662-4443. Dostupné z: doi:10.1038/s43246-021-00153-y
- [39] QUERIDO, Micaela, Livia AGUIAR, Paula NEVES, Cristiana PEREIRA a João TEIXEIRA. Self-disinfecting surfaces and infection control. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2019, **178**, 8-21. ISSN 09277765. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2019.02.009
- [40] FEDORENKO, Aliza, Maor GRINBERG, Tomer OREVI a Nadav KASHTAN. Survival of the enveloped bacteriophage Phi6 (a surrogate for SARS-CoV-2) in evaporated saliva microdroplets deposited on glass surfaces. *Scientific Reports*. 2020, **10**(1). ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-020-79625-z
- [41] TARKA, Patryk a Aneta NITSCH-OSUCH. Evaluating the Virucidal Activity of Disinfectants According to European Union Standards. *Viruses*. 2021, **13**(4). ISSN 1999-4915. Dostupné z: doi:10.3390/v13040534
- [42] CASTAÑO, Nicolas, Seth CORDTS, Myra KUROSU JALIL, Kevin ZHANG, Saisneha KOPPAKA, Alison BICK, Rajorshi PAUL a Sindy TANG. Fomite Transmission, Physicochemical Origin of Virus–Surface Interactions, and Disinfection Strategies for Enveloped Viruses with Applications to SARS-CoV-2. *ACS Omega*. 2021, **6**(10), 6509-6527. ISSN 2470-1343. Dostupné z: doi:10.1021/acsomega.0c06335

- [43] WATTS, Samuel, Madeleine RAMSTEDT a Stefan SALENTINIG. Ethanol Inactivation of Enveloped Viruses: Structural and Surface Chemistry Insights into Phi6. *The Journal of Physical Chemistry Letters*. 2021, **12**(39), 9557-9563. ISSN 1948-7185. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jpcclett.1c02327
- [44] FILIPE, Hugo, Sónia FIUZA, César HENRIQUES a Filipe ANTUNES. Antiviral and antibacterial activity of hand sanitizer and surface disinfectant formulations. *International Journal of Pharmaceutics*. 2021, **609**. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2021.121139
- [45] LIN, Qianyu, Jason LIM, Kun XUE, Pek YEW, Cally OWH, Pei CHEE a Xian LOH. Sanitizing agents for virus inactivation and disinfection. *View*. 2020, **1**(2). ISSN 2688-268X. Dostupné z: doi:10.1002/viw2.16
- [46] LICHTENBERG, Dov, Hasna AHYAYAUCH, Alicia ALONSO a Félix GOÑI. Detergent solubilization of lipid bilayers: a balance of driving forces. *Trends in Biochemical Sciences*. 2013, **38**(2), 85-93. ISSN 09680004. Dostupné z: doi:10.1016/j.tibs.2012.11.005
- [47] GALLANDAT, Karin, Daniele LANTAGNE a Massimiliano GALDIERO. Selection of a Biosafety Level 1 (BSL-1) surrogate to evaluate surface disinfection efficacy in Ebola outbreaks: Comparison of four bacteriophages. *PLOS ONE*. 2017, **12**(5). ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0177943
- [48] WOOD, Joseph, William RICHTER, Michelle SUNDERMAN, M. CALFEE, Shannon SERRE a Leroy MICKELSEN. *Evaluating the Environmental Persistence and Inactivation of MS2 Bacteriophage and the Presumed Ebola Virus Surrogate Phi6 Using Low Concentration Hydrogen Peroxide Vapor*. 2020, **54**(6), 3581-3590. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/acs.est.9b06034
- [49] Catalogue: Pseudomonas phage phi6. In: *Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH* [online]. [cit. 2022-04-02]. Dostupné z: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-21518>
- [50] Catalogue: Pseudomonas sp. In: *Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH* [online]. [cit. 2022-04-02]. Dostupné z: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-21482>
- [51] Catalogue: Escherichia phage phiX174. In: *Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH* [online]. [cit. 2022-04-02]. Dostupné z: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-4497>
- [52] Catalogue: Escherichia coli. In: *Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH* [online]. [cit. 2022-04-02]. Dostupné z: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-13127>
- [53] SAVO Bez Chloru Levandule 1 l. In: *Alza.cz* [online]. [cit. 2022-05-18]. Dostupné z: <https://www.alza.cz/maxi/savo-bez-chloru-na-podlahy-levandule-1l-d4202053.htm>
- [54] Incidin OxyDes 6 l dezinfekce ploch a povrchů. In: *Lékárna.cz: Jde přece o zdraví* [online]. [cit. 2022-05-18]. Dostupné z: <https://www.lekarna.cz/incidin-oxydes-6l-dezinfekce-ploch-a-povrchu/#podrobne-informace>
- [55] Dezinfekce SPURTEX® Unisanol na roušky a respirátory. In: *NanoSPACE®* [online]. [cit. 2022-05-18]. Dostupné z: <https://www.nanospace.cz/dezinfekce-respiratoru-a-rousek-spurtex/>
- [56] Bezpečnostní list: Unisanol. In: *NanoSPACE®* [online]. [cit. 2022-05-18]. Dostupné z: <https://www.nanospace.cz/dezinfekce-respiratoru-a-rousek-spurtex/>



- [57] MPD DEZOX dezinfekce ploch 5 l, DEZOX5PE. In: *SimplyClean* [online]. [cit. 2022-05-18]. Dostupné z: <https://simplyclean.cz/mpd-dezox-dezinfekce-ploch-5-l-dezox5pe>
- [58] MPD DESUR pro dezinfekci ploch 5 l, DESUR5PE. In: *SimplyClean* [online]. [cit. 2022-05-18]. Dostupné z: <https://simplyclean.cz/mpd-desur-pro-dezinfekci-ploch-5-l-desur5pe>
- [59] Technický list: Desur. In: *SimplyClean* [online]. [cit. 2022-05-18]. Dostupné z: <https://simplyclean.cz/mpd-desur-pro-dezinfekci-ploch-5-l-desur5pe>
- [60] Technický list: Dezox. In: *SimplyClean* [online]. [cit. 2022-05-18]. Dostupné z: <https://simplyclean.cz/mpd-dezox-dezinfekce-ploch-5-l-dezox5pe>
- [61] SANYTOL Univerzální dezinfekční čistič vůně Eukalyptu 500ml rozprašovač. In: *ALFACHEM s.r.o.: Česká výrobní rodinná firma* [online]. [cit. 2022-05-02]. Dostupné z: <https://www.alfachem.cz/sanytol-univerzalni-dezinfekcni-cistic-vune-eukalyptu-500ml-rozprasovac.html>
- [62] Bezpečnostní list: Sanytol Univerzální. In: *ALFACHEM s.r.o.: Česká výrobní rodinná firma* [online]. [cit. 2022-05-18]. Dostupné z: <https://www.alfachem.cz/sanytol-univerzalni-dezinfekcni-cistic-vune-eukalyptu-500ml-rozprasovac.html>
- [63] SAVO Original tekutý dezinfekční prostředek 4 kg. In: *ALFACHEM s.r.o.: Česká výrobní rodinná firma* [online]. [cit. 2022-05-02]. Dostupné z: <https://www.alfachem.cz/savo-original-tekuty-dezinfekcni-prostredek-4-kg.html>
- [64] *Česká technická norma 1040: Chemické dezinfekční přípravky a antiseptika - Kvantitativní zkouška s použitím suspenze ke stanovení základního baktericidního účinku chemických dezinfekčních přípravků a antiseptik - Metoda zkoušení a požadavky (fáze 1)*. Praha: Český normalizační institut, 2006.
- [65] KAMPF, Günter, Marc SHAFFER a Corrine HUNTE. Insufficient neutralization in testing a chlorhexidine-containing ethanol-based hand rub can result in a false positive efficacy assessment. *BMC Infectious Diseases*. 2005, **5**(1). ISSN 1471-2334. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2334-5-48
- [66] WOOLWINE, J a J GERBERDING. Effect of testing method on apparent activities of antiviral disinfectants and antiseptics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1995, **39**(4), 921-923. ISSN 0066-4804. Dostupné z: doi:10.1128/AAC.39.4.921
- [67] SHAHIN, Khashayar, Lili ZHANG, Mohammad MEHRABAN, Jean-Marc COLLARD, Abolghasem HEDAYATKHAH, Mojtaba MANSOORIANFAR, Abbas SOLEIMANI-DELFAN a Ran WANG. Clinical and experimental bacteriophage studies: Recommendations for possible approaches for standing against SARS-CoV-2. *Microbial Pathogenesis*. 2022, **164**. ISSN 08824010. Dostupné z: doi:10.1016/j.micpath.2022.105442

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

|             |   |
|-------------|---|
| ssDNA/RNA   | Jednovláknová deoxyribonukleová kyselina/ ribonukleová kyselina   |
| dsDNA/RNA   | Dvouvláknová deoxyribonukleová kyselina/ ribonukleová kyselina  |
| PFU/ml      | Plaque forming units per mililitre/ plak formující jednotka na mililitr                                     |
| LPS         | Lipopolysacharid  |
| ICTV        | International Committee on Taxonomy of Viruses ICTV/<br>Mezinárodní výbor pro klasifikaci virů              |
| F+ bakterie | Bakterie s přítomností sex-chromatinu (F-faktoru/F-plazmidu)  |
| BSL         | Biosafety level/ Úroveň biologické bezpečnosti  |
| LCHP        | Low concentration hydrogen peroxide vapor/ Nízká koncentrace par<br>peroxidu vodíku                         |
| RH          | Relative humidity/ Relativní vlhkost  |
| LBA         | Luria Bertani agar  |
| TSA         | Trypton-sójový agar   |
| LBB         | Luria Bertani bujon   |
| TSB         | Trypton-sójový bujon  |
| DSMZ        | Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen/<br>Německá sbírka mikroorganismů a buněčných kultur |
| % obj.      | Objemová procenta   |
| HIV         | Lidský virus imunitní nedostatečnosti   |
| HBV         | Virus hepatitidy B  |
| HBC         | Virus hepatitidy C  |
| H5N1        | Vysoce patogenní aviární influenza  |
| WHO         | World Health Organization/ Světová zdravotnická organizace  |
| OD          | Optical density/ Optická hustota  |
| N           | Množství fágových částic na 1 ml používané suspenze (titr)  |

---

|          |  |
|----------|--|
| $N_0$    | Množství fágových částic v 1 ml po desetinásobném zředění původní suspenze (N)       |
| $N_a$    | Množství přeživších fágových částic v 1 ml testovací směsi na konci kontaktního času |
| $\log R$ | Redukce bakteriofágů způsobená vlivem testovaného desinfekčního přípravku            |
| $N_V$    | Množství fágových částic na 1 ml používané validační suspenze (titr)                 |
| $N_{V0}$ | Množství fágových částic na 1 ml po desetinásobném zředění validační suspenze        |
| SDS      | Dodecylsírán sodný   |
| CPS      | Centrum polymerních systémů  |
| PAL      | Povrchově aktivní látka  |

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

|   |           |
|---|-----------|
| <i>Obrázek 1 Schématické znázornění stavby viru – upraveno [9].....</i>   | <i>14</i> |
| <i>Obrázek 2 Symetrie virové kapsidy – upraveno [14].....</i>   | <i>15</i> |
| <i>Obrázek 3 Plaky bakteriofága <math>\phi 6</math> .....</i>   | <i>17</i> |
| <i>Obrázek 4 Schématické znázornění čeledí a tvarů bakteriofágů – upraveno [20].....</i>  | <i>20</i> |
| <i>Obrázek 5 Faktory ovlivňující přežívání virů na površích – upraveno [37; 38] .....</i>   | <i>28</i> |
| <i>Obrázek 6 Vliv struktury na odolnost virů vůči desinfekčním přípravkům – upraveno [41] .....</i>   | <i>30</i> |
| <i>Obrázek 7 Schématické znázornění oddělení lipidového obalu od nukleokapsidu vlivem ethanolu – upraveno [43].....</i>   | <i>32</i> |
| <i>Obrázek 8 Mechanismus interakce detergentu a fosfolipidové membrány – upraveno [46] .....</i>  | <i>33</i> |
| <i>Obrázek 9 Schématické znázornění pracovního postupu při testování účinnosti desinfekčních přípravků za využití bakteriofágů .....</i>                        | <i>46</i> |
| <i>Obrázek 10 Schématické znázornění pracovního postupu u zmiňované trojice validačních postupů.....</i>  | <i>47</i> |
| <i>Obrázek 11 Míra účinnosti (hodnoty redukce R) testovaných přípravků (pro ředění dle doporučené dávky) vůči neobalenému fágu <math>\phi X174</math> .....</i> | <i>66</i> |

**SEZNAM TABULEK**

|   |           |
|---|-----------|
| <i>Tabulka 1 Přehled testovaných desinfekčních prostředků.....</i>  | <i>39</i> |
| <i>Tabulka 2 Výsledky testů citlivosti bakteriofága <math>\phi 6</math> na používaná činidla.....</i>                     | <i>50</i> |
| <i>Tabulka 3 Výsledky testů citlivosti bakteriofága <math>\phi X174</math> na používaná činidla .....</i>                 | <i>51</i> |
| <i>Tabulka 4 Výsledky validační zkoušky “A“ pro bakteriofága <math>\phi 6</math>.....</i>                                 | <i>53</i> |
| <i>Tabulka 5 Výsledky validační zkoušky “B“ pro bakteriofága <math>\phi 6</math>.....</i>                                 | <i>53</i> |
| <i>Tabulka 6 Výsledky validační zkoušky “C“ pro bakteriofága <math>\phi 6</math>.....</i>                                 | <i>54</i> |
| <i>Tabulka 7 Výsledky validační zkoušky “A“ pro bakteriofága <math>\phi X174</math> .....</i>                             | <i>55</i> |
| <i>Tabulka 8 Výsledky validační zkoušky “B“ pro bakteriofága <math>\phi X174</math> .....</i>                             | <i>55</i> |
| <i>Tabulka 9 Výsledky validační zkoušky “C“ pro bakteriofága <math>\phi X174</math> .....</i>                             | <i>56</i> |
| <i>Tabulka 10 Souhrn výsledků testování účinnosti desinfekčních přípravků na fága <math>\phi 6</math> .....</i>           | <i>59</i> |
| <i>Tabulka 11 Souhrn výsledků opakovaného testu účinnosti desinfekčních přípravků na fága <math>\phi 6</math> .....</i>   | <i>60</i> |
| <i>Tabulka 12 Souhrn výsledků testu účinnosti desinfekčních přípravků na fága <math>\phi X174</math>.....</i>             | <i>62</i> |
| <i>Tabulka 13 Souhrn výsledků opakovaného testu účinnosti desinfekčních přípravků na fága <math>\phi X174</math>.....</i> | <i>63</i> |
| <i>Tabulka 14 Přehled doporučených dob působení pro testované koncentrace přípravků</i>                                   | <i>65</i> |