

## Testování antimikrobiální účinnosti neporézních povrchů materiálů

### Testing antimicrobial activity of non-porous surfaces of materials

Jan Urban, Věra Melicherčíková, Petra Uttlová, Marcela Macháčková

#### Souhrn • Summary

S příchodem nanotechnologie a možností využití materiálů, kterým je přikládán antibakteriální (antimikrobiální) účinek nastala i otázka, jak tento účinek materiálů stanovit. V NRL pro dezinfekci a sterilizaci zkoušíme antibakteriální (antimikrobiální) účinnost povrchů materiálů metodou dle JIS Z 2801 a dle ISO 22196. Metodika byla modifikována také ke stanovení účinku proti mikroskopickým kvasinkovitým houbám a mikroskopickým vláknitým houbám – plísním.

K testování antibakteriální účinnosti používáme zástupce gram pozitivních bakterií (*Staphylococcus aureus*) a gram negativních bakterií (*Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa*). Ke stanovení účinnosti proti kvasinkám používáme *Candida albicans* a proti mikroskopickým vláknitým houbám zástupce plísní *Aspergillus brasiliensis* a *Penicillium aurantiogriseum*.

Během posledních deseti let jsme otestovali 68 hydrofobních materiálů (povrchů). Testování prokázalo, že existují povrchy materiálů (materiály) s antimikrobiálním účinkem. Účinek antimikrobiálních povrchů je vyšší při zkušební teplotě  $36 \pm 1$  °C než 20–25 °C. Testování účinku proti plísním bylo zkoušeno jen při teplotě 20–25 °C.

Při zkouškách bylo prokázáno, že zástupce gram pozitivních bakterií je odolnější vůči účinkům povrchů materiálů než zástupce gram negativních bakterií a to jak v době působení, tak v míře poklesu v log řádech oproti kontrole. Byla prokázána i účinnost proti kvasinkám a mikroskopickým vláknitým houbám.

*With the advent of nanotechnology and availability of materials assumed to have antibacterial (antimicrobial) activity, the question arises of how to measure such activity. In the National Reference Laboratory for Disinfection and Sterilisation (NRL DS), antibacterial (antimicrobial) activity of surfaces of materials is tested in accordance with JIS Z 2801/ISO 22196. The method has also been modified to measure activity against microscopic yeast fungi and microscopic filamentous fungi – moulds.*

*To test antibacterial activity, NRL DS uses representatives of Gram-positive (*Staphylococcus aureus*) and Gram-negative (*Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa*) bacteria. *Candida albicans* has been selected to test anti-yeast activity and the mould representatives *Aspergillus brasiliensis* and *Penicillium aurantiogriseum* are used to test activity against microscopic filamentous fungi.*

*Over the last decade, NRL DS tested 68 hydrophobic materials (surfaces). Some surfaces of materials (materials) have been proven to have antimicrobial activity. Antimicrobial surfaces have shown higher antimicrobial activity at a test temperature of  $36 \pm 1$  °C than at 20–25 °C. Anti-mould activity was only tested at a temperature range of 20–25 °C.*

*The tests have proven the representative of Gram-positive bacteria to be more resistant to the activity of the surfaces of materials than those of Gram-negative bacteria, as can be seen from both the exposure time and log reduction in microbial counts in comparison with controls. Activity against yeasts and microscopic filamentous fungi has also been proven.*

Zprávy CEM (SZÚ, Praha) 2016; 25(5): 178–181.

**Klíčová slova:** antimikrobiální účinnost, neporézní povrch materiálu

**Keywords:** antimicrobial activity, non-porous surface

#### ÚVOD

S příchodem nanotechnologie a možností využití materiálů, kterým je přikládán antibakteriální (antimikrobiální) účinek nastala i otázka, jak tento účinek materiálů stanovit. V NRL pro dezinfekci a sterilizaci zkoušíme antibakteriální (antimikrobiální) účinnost materiálů (povrchů materiálů) od roku 2006 dle JIS Z 2801 a v roce 2008 jsme metodiku upravili dle ISO 22196. V současné době máme zpracovanou metodiku dle JIS Z 2801:2010 (Antibakteriál-

ní produkty – Stanovení antibakteriální aktivity a účinnosti) a ISO 22196:2011 (Stanovení antibakteriální účinnosti plastů a jiných neporézních povrchů). Během posledních deseti let jsme otestovali 68 neporézních povrchů materiálů (hydrofobních materiálů).

#### TESTOVANÉ MIKROORGANISMY

K testování antibakteriální účinnosti používáme zástupce gram pozitivních bakterií *Staphylococcus aureus* (ATCC<sup>1</sup> 6538) a gram negativních bakterií *Escherichia coli* (ATCC<sup>1</sup> 10536) a *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC<sup>1</sup> 15442). Ke stanovení účinnosti proti kvasinkám používáme *Candida albicans* (ATCC<sup>1</sup> 10231) a proti mikroskopickým vláknitým houbám zástupce plísní *Aspergillus brasiliensis* (ATCC<sup>1</sup> 16404) a *Penicillium aurantiogriseum* (CCM<sup>2</sup> F-389).

## TESTOVANÉ VZORKY MATERIÁLŮ

K závěrečnému hodnocení byly použity výsledky od všech zkoušených vzorků materiálů. Konkrétně zde zmiňujeme a hodnotíme výsledky od 4 vzorků testovaných v roce 2015, které vykazovaly antimikrobiální účinnost. Vzorek č. 1 – Podlahovina s antibakteriálními vlastnostmi. Vzorek č. 2 – Těsnění s antibakteriálními vlastnostmi. Vzorek č. 3 – Slitina různých kovů. Vzorek č. 4 – Nátěr s antimikrobiálními vlastnostmi na skle.

## ZKUŠEBNÍ METODY

Jak jsme již zmínili v úvodu tak v současné době používáme ke zkouškám metodiku zpracovanou dle JIS Z 2801:2010 [1] a ISO 22196:2011 [2]. Metodiku jsme upravili i ke stanovení účinku proti mikroskopickým kvasinkovitým houbám a mikroskopickým vláknitým houbám – plísním. Touto metodou jsme zkoušeli a vyhodnotili i ve výsledcích zmiňované 4 vzorky (testovány v roce 2015).

Standardní postup a závazná kritéria jsou nastavená takto: Zkušební suspenze se nanese na povrch materiálu a přikryje se sterilní plastovou fólií, která se přitlačí tak, aby se zkušební suspenze dostala i do okrajů. Zkouška probíhá při dobách působení 5 a 24±1 hodin při teplotě prostředí 36±1 °C a relativní vlhkosti prostředí 90 % nebo za stejných podmínek při teplotě prostředí 20–25 °C. Při testování fungicidní účinnosti na mikroskopické vláknité houby – plísně zkoušíme účinnost povrchů materiálů pouze při teplotě prostředí 20–25 °C. Doba působení se může nastavit i dle požadavků zadavatele, ale zkouška při standardních podmínkách se provede vždy.

## VÝSLEDKY

Zkoušený vzorek materiálu č. 1 (podlahovina s antibakteriálními vlastnostmi) – viz **tabulka výsledků 1:**

- nevykazoval antibakteriální účinek na zástupce gram pozitivních bakterií (*Staphylococcus aureus*) při testovaných dobách působení 5 hodin, 24 hodin, 48 hodin a 72 hodin, zkušebních teplotách 36±1 °C a 20–25 °C. (relativní vlhkost prostředí větší než 90 %)
- nevykazoval baktericidní účinnost na zástupce gram negativních bakterií (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*) při zkušebních teplotách 36±1 °C při dobách působení 5 hodin a 24 hodin a 20–25 °C při dobách působení 5 hodin, 24 hodin a 48 hodin. (relativní vlhkost prostředí větší než 90 %)

**Tabulka 1: ANTIBAKTERIÁLNÍ ÚČINNOST VZORKU MATERIÁLU č. 1 (pokles v log)**

Doba působení	<i>S. aureus</i>		<i>Paeruginosa</i>		<i>E. coli</i>	
	teplota prostředí		teplota prostředí		teplota prostředí	
	36±1 °C	20-25 °C	36±1 °C	20-25 °C	36±1 °C	20-25 °C
5 hod	0,01	0,01	0,11	0	0,41	0
24 hod	0	0,01	1,1	0,41	1,61	1,16
48 hod	0	0	N	0,47	N	1,26
relativní vlhkost prostředí ≥90 %						

N - nelze vyhodnotit účinek - nedostatečný nárůst kontroly

- vykazoval antibakteriální účinnost na zástupce gram negativních bakterií (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*) při zkušebních teplotách 36±1 °C – pokles o 1,1 až 1,61 log a 20–25 °C – pokles jen u *E. coli* o 1,26 log od doby působení 24 hodin. (relativní vlhkost prostředí větší než 90 %)

Při teplotě prostředí 36±1 °C vykazoval vzorek materiálu vyšší účinnost než při teplotě prostředí 20–25 °C.

Zkoušený vzorek materiálu č. 2 (těsnění s antibakteriálními vlastnostmi) – viz **tabulka výsledků 2:**

- nevykazoval antibakteriální účinek na zástupce gram pozitivních bakterií (*Staphylococcus aureus*) při testovaných dobách působení 5 hodin, 24 hodin, 48 hodin a 72 hodin, zkušebních teplotách 36±1 °C a 20–25 °C. (relativní vlhkost prostředí větší než 90 %)
- nevykazoval baktericidní účinnost na zástupce gram negativních bakterií (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*) při zkušebních teplotách 36±1 °C při dobách působení 5 hodin a 24 hodin a 20–25 °C při dobách působení 5 hodin, 24 hodin a 48 hodin. (relativní vlhkost prostředí větší než 90 %)
- vykazoval antibakteriální účinnost na zástupce gram negativních bakterií (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*) při zkušebních teplotách 36±1 °C – pokles o 2,93 až 3,3 log a 20–25 °C – pokles o 1,17 až 1,51 log od doby působení 5 hodin. (relativní vlhkost prostředí větší než 90 %)

Při teplotě prostředí 36±1 °C vykazoval vzorek materiálu vyšší účinnost než při teplotě prostředí 20–25 °C.

**Tabulka 2: ANTIBAKTERIÁLNÍ ÚČINNOST VZORKU MATERIÁLU č. 2 (pokles v log)**

Doba působení	<i>S. aureus</i>		<i>Paeruginosa</i>		<i>E. coli</i>	
	teplota prostředí		teplota prostředí		teplota prostředí	
	36±1 °C	20-25 °C	36±1 °C	20-25 °C	36±1 °C	20-25 °C
5 hod	-0,01	0	3,3	1,17	2,93	1,51
24 hod	0,01	0	3,57	2,41	3,43	3,13
48 hod	0	-0,01	N	2,73	N	3,38
72 hod	-0,02	-0,01	N	N	N	N
relativní vlhkost prostředí ≥90 %						

N - nelze vyhodnotit účinek - nedostatečný nárůst kontroly

Zkoušený vzorek materiálu č. 3 (slitina různých kovů) – viz **tabulka výsledků 3:**

- nevykazoval baktericidní účinek (na zástupce gram pozitivních i gram negativních bakterií) při testovaných dobách působení 1 hodina až 24 hodin a zkušebních teplotách 36±1 °C a 20–25 °C. (relativní vlhkost prostředí větší než 90 %)
- vykazoval antibakteriální účinnost na zástupce gram pozitivních bakterií (*Staphylococcus aureus*) při zkušebních teplotách 36±1 °C – pokles o 1,95 log a 20–25 °C – pokles o 1,18 log při době působení 24 hodin. (relativní vlhkost prostředí větší než 90 %)
- vykazoval antibakteriální účinnost na zástupce gram negativních bakterií (*Pseudomonas aeruginosa*, *Esche-*

*richia coli*) při zkušební teplotě  $36\pm 1$  °C od doby působení 2 hodiny – pokles o 1,76 až 2 log a při zkušební teplotě 20-25 °C od doby působení 3 hodiny – pokles o 1,02 až 1,56 log. (relativní vlhkost prostředí větší než 90 %)

Při teplotě prostředí  $36\pm 1$  °C vykazoval vzorek materiálu vyšší účinnost než při teplotě prostředí 20-25 °C.

**Tabulka 3: ANTIBAKTERIÁLNÍ ÚČINNOST VZORKU MATERIÁLU č. 3 (pokles v log)**

Doba působení	<i>S. aureus</i>		<i>Paeruginosa</i>		<i>E. coli</i>	
	teplota prostředí		teplota prostředí		teplota prostředí	
	36±1 °C	20-25 °C	36±1 °C	20-25 °C	36±1 °C	20-25 °C
1 hod	0	0	0,02	0,01	1,62	0,35
2 hod	0,01	0,01	1,76	0,01	2	0,97
3 hod	0	0	1,95	1,02	2,3	1,56
4 hod	0,01	0	1,98	1,49	2,74	2,49
5 hod	0,04	0,01	2	1,59	3,91	3,62
24 hod	1,95	1,18	2,4	1,82	3,99	3,65
relativní vlhkost prostředí ≥90 %						

N - nelze vyhodnotit účinek - nedostatečný nárůst kontroly

Zkoušený vzorek materiálu č. 4 (nátěr s antimikrobiálními vlastnostmi nanášený na skle) vykazoval:

- a) antibakteriální účinek při testované době působení 5 hodin a zkušebních teplotách  $36\pm 1$  °C – pokles o 1,32 až 2,8 log a 20-25 °C – pokles 0,99 až 1,49 log. (relativní vlhkost prostředí větší než 90 %) – viz tabulka výsledků č. 4

Při teplotě prostředí  $36\pm 1$  °C vykazoval vzorek materiálu vyšší účinnost než při teplotě prostředí 20-25 °C.

- b) baktericidní účinek při testovaných dobách působení 24 hodin a 48 hodin a zkušebních teplotách  $36\pm 1$  °C a 20-25 °C. (relativní vlhkost prostředí větší než 90 %) – viz tabulka výsledků 4.

**Tabulka 4: ANTIBAKTERIÁLNÍ ÚČINNOST VZORKU MATERIÁLU č. 4 (pokles v log)**

Doba působení	<i>S. aureus</i>		<i>Paeruginosa</i>		<i>E. coli</i>	
	teplota prostředí		teplota prostředí		teplota prostředí	
	36±1 °C	20-25 °C	36±1 °C	20-25 °C	36±1 °C	20-25 °C
5 hod	1,32	1	2,8	0,99	2,08	1,49
24 hod	≥ 5	≥ 5	≥ 5	≥ 5	≥ 5	≥ 5
48 hod	NN	≥ 5	NN	≥ 5	NN	≥ 5
relativní vlhkost prostředí ≥90 %						

NN - testování nebylo provedeno

- c) protikvasinkový účinek při testované době působení 24 hodin a zkušební teplotě  $36\pm 1$  °C – pokles o 2,23 log. Při zkušební teplotě 20-25 °C a době působení 24 hodin protikvasinkový účinek nevykazoval. (relativní vlhkost prostředí větší než 90 %) – viz tabulka výsledků č. 5

Při teplotě prostředí  $36\pm 1$  °C vykazoval vzorek materiálu vyšší účinnost než při teplotě prostředí 20-25 °C.

- d) levurocidní (mikroskopické kvasinkovité houby) účinek při testované době působení 48 hodin a zkušebních teplotách  $36\pm 1$  °C a 20-25 °C. (relativní vlhkost prostředí větší než 90 %) – viz tabulka výsledků č. 5

**Tabulka 5: PROTIKVASINKOVÝ ÚČINEK VZORKU č. 4 (pokles v log)**

Doba působení	<i>Candida albicans</i>	
	teplota prostředí	
	36±1 °C	20-25 °C
5 hod	0,24	0,1
24 hod	2,23	0,38
48 hod	≥ 4	≥ 4
relativní vlhkost prostředí ≥90 %		

- e) účinek proti mikroskopickým vláknitým houbám - plísním při testované době působení 72 hodin a zkušební teplotě 20-25 °C (relativní vlhkost prostředí větší než 90 %) – pokles u *A. brasiliensis* o 2,08 log. U zkušebního kmene *P. aurantiogriseum* došlo za stejných podmínek k poklesu o více jak 4 log, což znamená fungicidní účinnost. – viz tabulka výsledků č. 6
- f) fungicidní (mikroskopické vláknité houby - plísně) účinek při testované době působení 1 týden a zkušební teplotě 20-25 °C (relativní vlhkost prostředí větší než 90 %). – viz tabulka výsledků 6 a obrázek 1.

Při testování s mikroskopickými vláknitými houbami – plísněmi byla použita pouze zkušební teplota 20-25 °C.

**Tabulka 6: ÚČINEK PROTI PLÍSNÍM VZORKU č. 4 (pokles v log)**

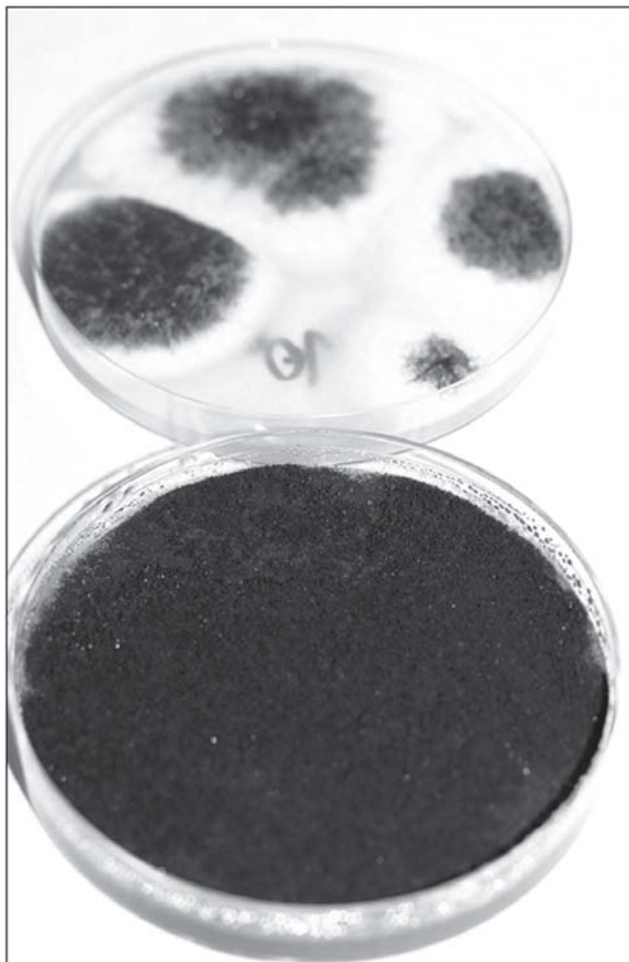
Doba působení	Pokles v log	
	teplota prostředí 20-25 °C	
	<i>A. brasiliensis</i>	<i>P. aurantiogriseum</i>
24 hod	0,11	0,02
72 hod	2,08	≥ 4
1 týden	≥ 4	≥ 4
relativní vlhkost prostředí ≥90 %		

## ZÁVĚR

Testování prokázalo, že existují materiály (povrchy) s antimikrobiálním účinkem. Antimikrobiálním účinkem rozumíme pokles o ≥1 log oproti kontrolnímu vzorku materiálu bez antimikrobiálních vlastností. Dále stanovujeme baktericidní účinek, což je pokles o ≥5 log a levurocidní (kvasinky) a fungicidní (mikroskopické vláknité houby – plísně) kde vykazuje povrch materiálu tuto účinnost při poklesu o ≥4 log oproti kontrolnímu vzorku.

Účinek antimikrobiálních povrchů je vyšší při zkušební teplotě  $36\pm 1$  °C než 20-25 °C. U antibakteriálního účinku je rozdíl jak ve velikosti poklesu v log řádech tak i v délce doby působení. Účinek proti kvasinkám vykazuje rozdíl pouze ve velikosti poklesu v log řádech. Testování účinku proti plísním bylo zkoušeno jen při teplotě 20-25 °C.

**Obrázek 1: NÁRŮST PLÍSNĚ *ASPERGILLUS BRASILIENSIS* po době působení 1 týden – vzorek materiálu č. 4 (horní plotna) a kontrolní vzorek (dolní plotna) – v ředění  $10^0$**



U dvou ze čtyřech zde uvedených vzorků prokázalo testování nutnost doplnit oproti bakteriím uvedeným v normách zástupce gram negativních bakterií *Escherichia coli* ještě o *Pseudomonas aeruginosa*, protože *P.aeruginosa* byla více odolná účinkům povrchů materiálů oproti *E.coli*, konkrétně v době působení a ve velikosti poklesu v log řádech.

Při zkouškách bylo prokázáno, že zástupce gram pozitivních bakterií je odolnější vůči účinkům povrchů materiálů než zástupce gram negativních bakterií a to jak v době působení, tak v míře poklesu v log řádech oproti kontrole. Byla prokázána i účinnost proti kvasinkám a mikroskopickým vláknitým houbám.

Minulý rok 2015 bylo touto metodou otestováno 11 materiálů, z nichž u 4 vzorků byla prokázána alespoň antibakteriální účinnost proti zástupcům gram negativních bakterií. Ovšem u jednoho vzorku materiálu byla prokázána i účinnost proti mikroskopickým kvasinkovitým houbám (zástupce: *Candida albicans*) a proti mikroskopickým vláknitým houbám – plísním (zástupce: *Aspergillus brasiliensis* a *Penicillium aurantiogriseum*).

Za období 2006-2015 bylo celkem otestováno 68 vzorků materiálů. Z tohoto počtu bylo zkoušeno 66 vzorků na antibakteriální účinnost, 44 vzorků na účinek proti kvasinkám a 26 vzorků na účinek proti plísním. Antibakteriální účinnost na zástupce gram negativních bakterií vykazovalo 25 vzorků a na zástupce gram pozitivních bakterií 13 vzorků. Účinek proti kvasinkám mělo 16 vzorků a účinek proti plísním 3 vzorky. Výsledky testování všech vzorků potvrzují závěry shrnuté z výsledků testování 4 vzorků zde uvedených.

#### LITERATURA

1. Japanese Industrial Standard JIS 2801:2010 (SIAA/JSA) – Antibacterial products – Test for antibacterial activity and efficacy (Antibakteriální produkty – Stanovení antibakteriální aktivity a účinnosti).
2. ISO 22196:2011 – Measurement of antibacterial activity on plastics and other non-porous surfaces (Stanovení antibakteriální aktivity plastů a jiných neporézních povrchů).

Jan Urban  
Věra Melicherčková  
Petra Uttlová  
Marcela Macháčková  
NRL pro dezinfekci a sterilizaci  
CEM - SZÚ, Praha