

**Pokus o standardisaci method
ke zkoušení antiseptik, modifikací
Rideal-Walkerova testu na podkladě
vyšetřovacího způsobu Jensenova.**

Doc. Dr. FRANTIŠEK PATOČKA.

Zvláštní otisk

z „ČASOPISU LÉKAŘŮ ČESKÝCH“

čís. 29, roč. 1938.



V PRAZE 1938.

Pokus o standardisaci method ke zkoušení antiseptik, modifikací Rideal-Walkerova testu na podkladě vyšetřovacího způsobu Jensenova.

Doc. dr. FRANTIŠEK PATOČKA.

Z bakteriologicko-serologického ústavu Karlovy university.

Probíráme-li obsáhlou literaturu, snažící se vyjádřiti účinnost nejrůznějších antiseptik číslicí, najdeme ciferné rozdíly, hodnotící stejná antiseptika, zkoušená v různých laboratořích shodnými i různými methodami, tak nápadné, že nám musí býti jasno, jak nesmírně jsme stále vzdáleni od kýženého cíle — definitivní standardisace desinfekčních látek. Problém jest skutečně tak komplikovaný, že ani není zatím naděje, že by se v dohledné době mohlo dospěti k jednotnému řešení, platnému jako absolutní pro všechny světové laboratoře. Zbývá pouze jedna možnost: přijmouti jako teoretické poučení číselné hodnoty, získané o antiseptiku, jež nás právě zajímá, v pokud možno velké řadě cizích ústavů, pracujících různými methodami, a přezkoušeti jejich exaktnost methodou vlastní, kterou nutno adaptovati podle teoretické rozvahy o výhodách a nevýhodách každé z nich a hlavně ji propracovati tak, aby pro nás dávala ve všech pokusech, třeba po dlouhou řadu let, výsledky analogické. To znamená vypracovati si standardní methodu vlastní laboratoře a srovnáním našich výsledků s cizími ověřiti si jejich pravděpodobnost. Návrh takové metody, která se snaží vyhnouti se některým chybám, vytykávaným ostatním, podávám

stručně níže. Podotýkám předem, že jsem si vědom všech jejích nedostatků, zejména teoretických. Nevyjadřuje a nemůže vyjádřiti absolutně platnou hodnotu antiseptik, jako žádná jiná ze světových method. Má však velikou výhodu praktickou — jest velmi snadná v provedení, absolutně pohodlná a rychlá pro experimentátora a velmi pružná co do šíře možnosti použití. Osvědčila se u nás velmi dobře během více než 4letého používání a zejména v posledním roce, díky spolupráci kolegy asist. Málka a dr. Wintra ze St. Z. Ú. byla modifikována tak, že nám dává výsledky skutečně vždy téměř identické a kolísající jen v mezích (ostatně úzkých) biologického pokusu. Jako naši standardisovanou metodu předkládám ji bakteriologickým laboratorům k posouzení. Úmyslně neuvádím všechna číselná ocenění antiseptik, provedená námi na řadě opakovaných pokusů, neboť to přenechám podrobnější publikaci svých spolupracovníků. Pokud se vzniku týče, jest jakýmsi přechodem mezi methodou Jensenových, která mne k jejímu vytvoření inspirovala a jejíž technické nevýhody jsem sám zkusil, a mezi methodou Paul-Krönigovou.

Teoretickými úvahami o působení antiseptik a jeho závislosti na důležitých faktorech zevních, jako je temperatura, koncentrace antiseptika, druh a stav bakterie, doba reakce a přítomnost organických látek v tekutině během antiseptického pokusu, obírali se nejrůznější mikrobiologové již v době Kochově, ale praktické důsledky ze získaných poznatků, zejména pro standardisaci hodnot, byly velmi chudé. Antiseptika se zkoušela zcela libovolně, podle toho, jak jich kdo hodlal použít. Někoho zajímala minimální smrtící doba, jiného spíše nejnížší smrtící koncentrace při velmi širokém časovém rozmezí, nebo konečně hledán t. zv. specifický účinek pouze na určitý druh mikroba, pro nějž žádáno elektivní působení. Přibližně z této doby po-

cháží Defriesova metoda, užívající bakteriálního povlaku, zaschlého na dně zkumavky, do níž naléváno antiseptikum, jež se pak nahradilo bouillonem. Znamější a dodnes používaná jest metoda Kochova s hedvábnými vlákny, na nichž zaschly spory bacila anthraxu, a metoda Paul-Krönigova s mikroby zaschlými na granátech (Jensen). O matematickém vyjádření získaných výsledků ve formě jednoduchých, stálých a vzájemně porovnatelných cifer nedalo se přirozeně vůbec mluvit. Podstatná změna poměrů nastala teprve zavedením fenolového koeficientu dle původní metody suspenzní (kapkové) udané Rideal-Walkerem 1903. Její podstata jest známá: zkoušené antiseptikum jest v různých koncentracích porovnáváno co do účinku s roztoky kyseliny karbolové, která jest považována za standard. (Svou stálostí antiseptického účinku se k tomu skutečně výjimečně dobře hodí.) Prakticky se provádí metoda ve velmi četných modifikacích, z nichž klasickou uvádím: K 5 cm postupných zředění zkoušeného antiseptika v destilované vodě se přidá 5 kapek 24hod. bouillonové kultury tyfových bacilů. Po protřepání se přenáší platinovou kličkou o průměru 3 mm subkultury do 5 cm bouillonu (o určitém stálém složení), a to po celkovou dobu 15 minut každé 2 a půl minuty. Totéž se děje se současně připravenými roztoky kyseliny karbolové. Koncentrace zkoušeného antiseptika, která usmrcuje bacila tyfového za dobu na př. 5 minut, se dělí koncentrací fenolu, která má za tutéž dobu stejný účinek, a výsledkem je číslo, nazvané fenolový koeficient. Hodnota 1 = účinku kyseliny karbolové. Hodnoty vyšší jsou charakteristické pro antiseptika účinnější, nižší (0.9 0.5 0.3) pro antiseptika méně účinná. Předpokladem úspěšného provádění této metody jest dodržování řady stálých faktorů, t. j. především určitého kmene bakteriálního, přesného složení kultivačních půd, zejmé-

na bouillonu, a 3denní inkubační doby při 37° C do ukončení experimentu. Ale i za nejpřísnějšího do-
 držování všech autorů přesně determinovaných
 kautel, ukázala se býti Rideal-Walkerova metoda
 neschopnou vyjádřiti absolutně platnou hodnotu
 antiseptik, a to z mnoha důvodů. Především nepo-
 čítá s faktem, který byl dokázán Chickem a potvr-
 zen nověji na př. Weyrauchem, že totiž vztah
 mezi koncentrací antiseptika a časem,
 potřebným k usmrcení mikroba, není
 jednoduchý, nýbrž exponenciální, při němž ex-
 ponent koncentrace zv. n (koncentrační koeficient)
 jest různý a charakteristický pro každé antisepti-
 kum. Důležitost exponentu n a následkem toho ne-
 možnost přesného srovnání poměrné účinnosti 2 nej-
 užívanějších antiseptik v různých běžně používa-
 ných koncentracích (fenolu a sublimátu) nám vy-
 svítne z příkladu uvedeného Topley - Wilsonem.
 Pro fenol jest udáno $n = 6$, pro sublimát $n = 1$.
 Při dosazení příslušných hodnot do vzorců (neuvá-
 díme pro jejich relativní komplikovanost) dojdeme
 k výpočtu, že dvojnásobné zředění sublimátu si vy-
 nutí zdvojnásobení času, potřebného k docílení té-
 hož účinku, kdežto stejné zředění u fenolu vede ke
 zvýšení doby účinku více než 60násobnému. Stejně
 poměrně málo dbá Rideal-Walkerova metoda tem-
 peratury, při níž se měření provádí. I zde jsou vzta-
 hy komplikovanější, nežli se zdálo s počátku, kdy
 zhruba při arithmetickém vzrůstu teploty byl hle-
 dán geometrický vzrůst rychlosti reakce; dnes je
 patrné, že logaritmické vyjádření těchto vztahů
 neodpovídá z největší části experimentální skuteč-
 nosti. Uvedené námítky — theoreticky velmi vážné
 — vyvolaly řadu modifikací, z nichž nejznámější
 jest Lancetova a Mc. Clinticova. Obě určují feno-
 lový koeficient dvakráté, (prvá pracuje s bac. coli,
 druhá s Ta testem), a to jednak minimální koncen-
 trací, jež usmrcuje po době 2½ minutové, jednak po

působení delším (Lancet 30', Clintie 15'). Průměr obou hodnot je teprve fenolkoeficientem. Reichenbach proti tomu správně uvádí, že obě hodnoty jsou nesouměřitelné (viz, co uvedeno o n konstantě) a že z nich nelze bráti průměr. Lepší by bylo dle něho uváděti obě cifry vedle sebe. Reichl navrhl vyjádřiti účinek antiseptika v celkové křivce, která by vyjadřovala závislost mezi koncentrací antiseptika a usmrcovací dobou, a porovnati křivku každého antiseptika zkoušeného s některou křivkou zvláště jednoduchou. To ovšem by nemohla býti křivka fenolová, ale dobře se prý k tomu hodí formaldehyd. Lockeman chtěl rozdělit antiseptika do skupin dle jejich chemického složení, a pro každou skupinu určití její speciální typ, jehož účinnost by se považovala za jednotku. Oba poslední autoři zůstali při teoretickém návrhu. Za důležitou nevýhodu praktického rázu považuje Chick a Martin okolnost, že antiseptikum při pokusu účinkuje v destilované vodě, což neodpovídá poměrům v přírodě. Proto přidávají k roztokům desinfekční látky suspenzi sušených lidských faekalí asi v kvantu 3^o%. Pro zjednodušení poměrů používají však jednotné doby účinku, a to 30 minut. Přes tuto značně vyšší dobu jest fenolový koeficient dle Chick-Martiny modifikace značně snížen proti původním hodnotám Rideal-Walkerovým. Zhusta jest vytýkáno (a podle našeho názoru správně) klasickému fenolkoeficientu použití tyfového bacila jako testu. Jest mikrobem málo resistantním a mezi jednotlivými kmeny jsou ohromné rozdíly v citlivosti (Weyrauch, Reichenbach, Jensen, Pesch, Wright, který našel při použití různých kmenů tyfových kolísání koeficientu v mezích až 200^o!). Proto někteří používají za test kultury stafylokokka, jiní bact. coli, případně stanoví separátní koeficient pro více druhů bakterií (obyčejně Ta bacily, difterické bacily, bact. pyocyaneum, stafylokokka) a za konečnou

hodnotu považují průměr ze součtu jednotlivých dílčích koeficientů, dělený počtem použitých kmenů (Gottsacker). Wright ukázal dále nevýhody extraktivního bouillonu, který je předepsanou standardní půdou pro klasický Rideal-Walkerův test, a v němž jest prý resistance zárodků snižována. Za velmi podstatnou námitku proti používání kapkové metody fenolového koeficientu nutno považovati okolnost, že klíčkou při přenosu kultury ze zkoušeného roztoku antiseptika se přenáší současně jeho stopy do nové kultivační půdy, kde působí inhibičně na vzrůst bakterií. Zde jsme u jádra sporu, který se vleče jako nedosti rozřešený mikrobiologií až dodnes, hlavně proto, že četní autoři přímo tvrdohlavě nechtějí uznati možnost inhibice bakteriálního vzrůstu, vyvolané třeba jen infinitesimálními kvanty silně účinného antiseptika. Narazil na tento problém už ostatně za éry Kochovy Fraenkel a Behring, kteří seznali, že ani opěťované mytí někdy neodstraní všechno antiseptikum, vsáklé do Kochových nitek se zaschlými sporamí, a že toto malé množství antiseptika stačí k tomu, aby spory v kultivační půdě nevyklíčily, ač v experimentu na zvířeti se ukázaly býti bezvadně vitálními. Problém inhibice vzrůstu — a pravá antiseptická — byl pak mnohokrát diskutován teoreticky a zkoušen experimentálně, aniž bohužel, často na neprospěch věci, by dokázal přesvědčiti všechny autory o svém významu. Autoři američtí a angličtí, velmi pokrokoví zejména v otázkách praktických, byli si zřejmě záhy vědomi velké chyby zaviněné pouze inhibicí vzrůstu při fenolkoeficientu, takže již ve standardisované metodě americké (Hygienic-Laboratory-Method) se klíčka kultury z desinfekčního roztoku přenáší do 10 a nikoliv do původních 5 ccm bouillonu. Wright zjistil, že Chinosol má fenolkoeficient o 30% (zdánlivě) vyšší, bylo-li kultivováno

do 5, místo do 10 cm bouillonu. Leonard doplňuje Rideal-Walkerovu metodu ještě dalším přenesením z původních 10 cm do 40 cm bouillonu, jestliže prvá subkultura, vycházející přímo z pokusu, zůstala negativní (Transfer Test). Dalším přenesením se totiž antiseptikum ještě více zředí, takže již nepůsobí ani inhibičně. Na inhibici vzrůstu jakožto možnost absolutně zkreslující výsledky fenolového koeficientu u silných antiseptik energicky upozorňuje Reichenbach na základě vlastních pozorování i vývodů Hailerových, který jí právě vysvětluje ohromné a zdánlivě nepochopitelné rozdíly fenolkoeficientu při použití jednak method suspensních (klasický Rideal-Walker) jednak method s nosičem zárodků (Paul-Krönig, Koch, atd.) Inhibiční vliv některých antiseptik lze odstraniti chemicky (sublimát — přívodem H_2S), ale u většiny nezbývá nežli zákrok mechanický. Nejdůsledněji bojuje proti inhibici vzrůstu, předstírající antiseptický účinek, Jensen ve své methodě s krycími sklíčky, kterou jsme přepracovali a propracovali na metodu naší laboratoře. Z předeslaného lze viděti, že v novější době se rozpadly metody užívané ke zkoušení antiseptik na 2 velké skupiny. Skupinu method suspensních (originální Rideal-Walkerova a její modifikace) a skupinu method, kde jsou zárodky, sloužící k testu, přichyceny na nějakém tuhém nosiči. Obě skupiny method pak se snaží hodnotu antiseptika vyjádřiti buď číselně fenolovým koeficientem, nebo slouží jinému, praktickému účelu, podle upotřebení antiseptika; na př. ke stanovení minimální doby, která při vhodné koncentraci s jistotou usmrtí určitý druh bacteria. K vůli úplnosti je možno se zmíniti ještě o skupině třetí, která ku podivu jest stále ještě používána k hodnocení antiseptického účinku, ač vlastně ukazuje pouze inhibici vzrůstu — to jsou ty metody, kde se antiseptikum přidává přímo do kultivačních pūd, zejména

tuhých, na nichž pak jsou bakterie kultivovány. Jak daleko mají tyto poslední metody do supponovaného cíle, dovede si každý představit podle shora uvedeného, zejména jde-li o mikroby citlivé (gonokokky, streptokokky) nebo nesnadno rostoucí (bac. tuberkulosy). Chceme-li se vyhnouti výtce neúplné objektivity, musíme doplniti, že, ačkoliv jsme považovali od práce Jensenových tuto otázku za vyřízenou ve prospěch method s nosičem zárodků, našli opět v nejnovější literatuře někteří autoři (Gottsacker) dosti důvodů pro polemiku o bezpředmětnosti obav z přenosu infinitesimálních kvant antiseptika do půd při methodách suspensních. Uvedený autor si skutečně dal práci s výpočtem, jaké množství antiseptika může býti přeneseno platinovou kličkou do subkultury a jak dále se tam zředí; vypočítané kvantum v řadě kontrol přimísil do bouillonu, který pak infikoval a zjistil, že inhibice patrna není. Nemůže se však vyhnouti závažné výtce, že jest ohromný rozdíl mezi čerstvou bakteriální kulturou a tou, která byla těžce poškozena ve své vitalitě předcházejícím, déle trvajícím stykem s antiseptikem. Naše vlastní zkušenosti, získané během 4 let na velmi rozsáhlém materiálu, svědčí rozhodně proti zevšeobecňování názorů Gottsackerových a udržují nás v přesvědčení o nutnosti používání takových nosičů zárodků, ze kterých lze stopy antiseptika co nejdokonaleji a nejrychleji odstraniti mechanickou cestou. Netvrdíme ovšem naprosto, že je to nutné všude a jsme ochotni pro prostředně působící a snadno rozpustná antiseptika přiznati výhodu poměrné jednoduchosti methodám suspensním. Všude tam však, kde jde o přesné zhodnocení účinku antiseptika velmi silného nebo antiseptika špatně rozpustného (takže se mohou při suspensní methodě přenášeti jeho velké částice, které se teprve v subkultuře náležitě di-

sociují a vyvinou v tomto stavu svůj charakteristický účín, zde ovšem nežádoucí), či konečně tam, kde jde o látky (ostatně dosti časté) o mylem za antiseptika vydávané, které však mají pouze účinek inhibiční, jsou jedině metody s nosičem na místě. S jednou z takových látek jsme se dokonale seznámili a vlastně ona byla příčinou našeho dalšího podrobného studia antiseptických method. Je to chlorxylenol, látka těžko rozpustná, ale dobře zmýdelnitelná, která v suspensním pokusu udávala antiseptické hodnoty rovnající se téměř sublimátu, ale při důkladném odstranění antiseptika se ukázala býti mnohem méně hodnotnou, nežli fenol.

K doplnění celkového obrazu o dnes používaných methodách zmíním se pouze o několika nejnovějších. Především je to metoda Jensenových z roku 1933, o níž několikráte byla zmínka. Bakteriálním testem není tyfový bacil, nýbrž *Pyococcus aureus*. Přesné množství spláchnuté, 24hodinové kultury na šikmém agaru, (která se filtruje skleněnou vatou, aby se dosáhlo homogenosti suspence) se nanesou na sterilní krycí sklíčko a nechá zaschnouti. Sklíčka (nosiči zárodků) se ponoří při experimentu do různých zředění antiseptika v destilované vodě při teplotě 20° C, a to v intervalech asi 30 vteřin za sebou. Po celkové době 2 minut působení antiseptika se sklíčka postupně vytahují, oplachují ve sterilní destilované vodě a po opláchnutí vkládají do 10 ccm bouillonu přesného složení, v němž se inkubují 48 hodin při 37° C. Interval 30 vteřin mezi vložení jednotlivých sklíček do antiseptika stačí opět úplně při jejich vynětí z roztoku k provedení celé operace, zejména důležitého opláchnutí. Při určování fenolkoefficientu se mění pouze koncentrace antiseptik (fenolu i zkoušeného), doba působení zůstává stejná, t. j. 2 minuty, takže propočí-

tání koeficientu jest velmi jednoduché. Pro fenol užívá autor následujícího zředění: 1 : 55, 1 : 60, 1 : 65, 1 : 70. V řadě jeho pokusů při 2minutovém působení usmrcuje fenol pravidelně ve zředění 1 : 55 — 1 : 60. Příkladem výpočtu budiž izal, jenž usmrcuje za stejný čas v koncentraci 1 : 140. Jest tedy jeho fenolový koeficient dle metody Jensenových = 2·5, t. j. jde o antiseptikum více než 2krát účinnější nežli fenol. Za největší plus Jensenova způsobu nutno pokládati možnost, opláchnutím odstraniti prakticky všechny stopy zkoušeného antiseptika. Ještě novější je metoda Peschova (1936—1937), svou neobvyklostí a zvláštním způsobem matematického vyjádření naprosto odlišná od všech dosavadních. Podle našeho názoru pracuje s tolika neznámými a blíže neurčitelnými faktory, že jest matematická hodnota jím zkoušených antiseptik ještě problematičtější ceny, nežli u všech method dosavadních, a nemyslím, že i relativně veliký počet dílčích resultátů, z nichž bere průměrné hodnoty, by na tom něco změnil k lepšímu. Jde o metodu s nosičem zárodků, jímž jsou sterilisované hrachy, nasáklé bakteriálními kulturami těchto mikrobů: *bact. coli*, *staphylococcus*, *streptococcus*, *corynebact. diphtheriae*. Nosiče se vkládají do roztoku antiseptika a vystavují jeho účinku po dobu 1, 3, 5, 10, 30 minut, 1 hod., 3 hod., 5 hod., 7 hod., 24 hodin. Zkouší se tedy působení jedné koncentrace antiseptika celkem při 10 různých časech za použití 4 různých bakterií, tedy celkem 40krát. V celém pokuse se sčítá celkový počet pozitivních vzrůstů a bouillonů sterilních. Příkladem jeden fenolový pokus: ze 40 hodnot 22krát vzrůst pozitivní, 18 negativní (mikroby usmrceny). V opakovaných pokusech se tyto hodnoty musí sobě blížiti. Totéž se zkouší za použití 3 různých koncentrací téhož antiseptika (na př. fenol 1 : 50, 1 : 100, 1 : 200) a celkovou hodnotou pro fenol je průměr vyšlý z těchto tří

zředění. Při porovnávání fenolu s jinými antiseptiky (nutno prováděti v témže pokuse) označuje hodnotu fenolu jako ± 0 (?). Příkladem budiž zephirol a sagrotan, srovnaný s fenolem z předcházejícího pokusu:

Fenol 22 výsledků +, 18 — = ± 0 ,

Zephirol 16 výsledků +, 24 — = $24 - 18 = + 6$,
t. j. účinek 6krát silnější, nežli u fenolu.

Sagrotan 28 výsledků +, 12 — = $12 - 18 = - 6$,
čili účinek 6krát slabší, nežli u fenolu.

Největší nevýhodou metody, mimo obtížné a zdlouhavé provedení, jest jistě příliš měnivý charakter biologického nosiče, kde nelze nikdy říci, jak hluboko vlastně suspense do něho vnikla a jaké vlivy povrchové zde spolupůsobí. Samozřejmě jest i možnost inhibice zde neobyčejně veliká. Přesto věříme, že metoda může dáti velmi zajímavé výsledky tam, kde jde o obtížnou desinfekci hrubších předmětů poresních, kde je nutné pomalé pronikávání antiseptika do hloubky a kde nezáleží na čase, ale na spolehlivosti konečného efektu. Blaas porovnával Peschovu metodu s různými methodami suspensními a doplnil ji svou vlastní za použití nosiče lískových ořechů. Jeho neexaktní práce jest klasickým příkladem ohromných rozdílů v číselné hodnotě stejných antiseptik, různým způsobem zkoušených. Nelze mi konečně pominouti mlčením návrh A. J. Salle, téměř nutný a dosud ostatně všelijak obcházený, který hodnotí antiseptika podávaná per os, nebo aplikovaná na sliznice, či dokonce parenterálně, nikoliv podle fenolkoeficientu, nýbrž dle tak zvaného Toxicity Index, jenž se provádí jednak na zkoušeném bakteriu, jednak na tkáňových kulturách a jenž se rovná nejvyššímu zředění antiseptika, zabraňujícímu ještě vzrůstu fibroblastů v tkáňových kulturách, lomenému nejvyšším zředěním antiseptika zabíjejícím mikroba užitého jako test. Čím nižší index, tím dokonalejší jest antiseptikum

pro hořejší účel. Příklady: jod = 0·09, jodtrichlorid = 0·4, sublimát = 2·8, fenol = 12·9, merthiolát = 35·4, merkurochrom = 262. Návrh si zaslouží všestranné pozornosti, ale pro většinu laboratoří (tkáňové kultury!) bude, bohužel, těžko realizovatelný. Jako doplněk uvádím několik cifer fenolkoeficientů dle uvedených autorů; úsudek o získaných cifrách přenechávám čtenáři.

	Sublimát	Sagrotan	Zephirol	Chloramin
Weyrauch	St. 88	St. 1·3	—	St. 133!
Jensen	St. 41·7	St. pod 1	—	St. pod 1!
Blaas	—	St. 3	St. asi 100	—
Pesch (průměr 4 různých mikrobů při hodnotě fenolu ± 0).	—	— 0·3	+ 10·4	—
Gottsacker	—	—	St. 100	—
Vlastní metoda	St. 35	St. 1·2	St. 35—40	St. 1·35!

St. = koeficient se staphylo-testem.

Popis naší metody podávám co nejstručněji. Během asi 4letého používání prodělala řadu modifikací, z nichž právě popsaná jest poslední a dává nám během několika měsíců s tímž kmenem mikroba výsledky stále stejné. Jako testu užíváme kmene staphylococcus pyogenes aureus značka T, izolovaného z furunkulosity, který konservujeme v málo vyrostlém vpichu, v hluboké agarové vrstvě, přelity sterilním parafinovým olejem. Jeho citlivost na antiseptika zůstává během asi 1½ roku za těchto podmínek stále stejná. Před pokusem rozočkujeme z konservační půdy mikroba na obyčejné šikmé agary konstantního složení, tak, jak se jich užívá k běžné práci v naší laboratoři. 24hodinová kultura tohoto mikroba se spláchne 20 ccm sterilního fyziologického roztoku a naleje do široké zkumavky, načež se nechá státi na temném a chladném místě po dobu 15—20 minut, tak, aby hrubší chuchvalce bak-

teriální kultury měly čas klesnouti ke dnu. Jako nosiče užíváme skleněné kuličky stejné velikosti, jemně matného povrchu. Jejich průměr je přibližně asi 7 mm, což odpovídá velikosti hrachu. Kuličky lze snadno sterilisovati suchým teplem, ale mohou být používány jenom tak dlouho, pokud nepopraskají. Na dno sterilní mísy, vysoké asi 5 cm, vložíme sterilní síť z pozinkovaného plechu, jejíž oka jsou asi tak velká, aby kuličky do ní zapadaly asi osminou svého objemu. Síť může státi na třech 1—2 cm vysokých nožičkách, aby se kuličky nedotýkaly dna misky. Do každého oka sítě vložíme jednu kuličku (tak, aby se pokud možno vzájemně nedotýkaly) a nyní kuličky i se sítí přelejeme shora připravenou suspensí bakterií, kterou dekantujeme od sedimentu, vzniklého mezi tím, tak, aby tyto byly suspensí všude pokryty a nevyčnívaly nad její povrch. Vše necháme stát při teplotě kolem 20° C po dobu 2 hodin na temném místě. Po této době se kuličky vybírají sterilní pinsetou, vkládají na povrch jiné, podobné sterilní sítě, která však byla před tím pokryta vrstvou sterilisovaného filtračního papíru. Tato síť s kuličkami se vloží do termostatu zastaveného na teplotu kolem 35° C a nechá se v něm po dobu několika hodin (5—6), pokud suspence mikrobů na jejich povrchu nezaschne. Po zaschnutí se kuličky sterilní pinsetou odeberou, vloží do sterilní Petriho misky a nechají na temném a chladném místě průměrně po dobu 1 týdne, dříve nežli se jich použije k vlastnímu pokusu. Tento časový interval není sice absolutně nutný, neboť je možno pracovati ihned s kuličkami čerstvě zaschlými, je však přesto značně výhodný, neboť stárnutím se vyrovnají eventuální rozdíly mezi bakteriálním obložením některých kuliček a výsledky jsou pak daleko stejnoměrnější, i když fenolkoeficient jest o něco vyšší, nežli při použití kuliček čerstvých. Roztoky antiseptika připravujeme

v destilované vodě a sice tak, že každý následující roztok je o 20% méně koncentrovaný, nežli předcházející. Menší rozdíl v koncentraci vede k výsledkům méně pravidelným, neboť biologický charakter této metody vylučuje vystižení příliš jemných rozdílů. Doba působení antiseptika je ve všech pokusech stejná a trvá 4 minuty. Při vlastním pokusu si počínáme tak, že si připravíme řadu předem označených Petriho misek, které klademe vedle sebe a z nichž každá obsahuje předem určené zředění antiseptika. Vedle každé misky s antiseptikem je další miska se sterilní destilovanou vodou, přirozeně pro každou koncentraci zvláštní. Při započetí pokusu vkládáme asi v $\frac{1}{2}$ minutových intervalech kuličky do misky s antiseptikem, v němž musí být úplně ponořeny. Po uplynutí 4minutového intervalu vyndáme pinsetou kuličku z prvního zředění antiseptika, rychle ji opláchneme několikerým protřepáním v sousedící misce s destilovanou vodou a vhodíme do zkumavky kultivačního bouillonu. $\frac{1}{2}$ minutový interval pro tuto operaci úplně stačí, takže pohodlně zachycujeme velmi přesně odečtené, 4minutové působení každého zředění antiseptika. Konečný resultát vzrůstu se odečítá po 4 dnech při teplotě 37° C. Při každém pokuse samozřejmě musí být provedena nejprve reakce s fenolem a pak teprve reakce se zkoušeným antiseptikem. K snazšímu pochopení metodiky a pro počítávání získaných výsledků uvádím jediný příklad, t. j. určování fenolového koeficientu pro sublimát. Je přirozeno, že v řadě po sobě opakovaných pokusů, časově od sebe značně vzdálených, nemohou být výsledky vždycky absolutně stejné, ale jak jsem již uvedl, kolísají pouze v mezích biologického pokusu a dají se mezi sebou mnohem lépe srovnávat, nežli výsledky, docílené na př. originální Rideal-Walkerovou methodou různými autory v různých částech světa. O podrobnostech pokusů

v našich laboratořích provedených, jakož i o mezích, ve kterých naše cifry kolísají, budou referovati podrobněji moji shora uvedení spolupracovníci:

Zředění fenolu — vzrůst:		Zředění sublimátu — vzrůst:	
1 : 58	0	1 : 1960	0
1 : 70	0	1 : 2360	0
1 : 85	0	1 : 2830	0
1 : 102	+	1 : 3400	+
1 : 120	+	1 : 4100	+

celková doba působení obou antiseptik = 4 minuty, po opláchnutí v destilované vodě kuličky inkubovány v obyčejném bouillonu po dobu 4 dnů při 37° C.

Fenolkoeficient se rovná: 2830 (první sterilní kulička sublimátová): 85 (první sterilní kulička fenolová) = 33.3. Vychází tedy v tomto pokusu fenolový koeficient pro sublimát přibližně 33, což znamená, že za našeho experimentálního uspořádání je sublimát více než 30krátě účinnějším antiseptikem, nežli fenol.

Zředěním, které u všech antiseptik o 20% stoupá, jsme se snažili vyhnouti, byť i jen velmi nedokonalé, chybám, plynoucím z měněné koncentrace. Je samozřejmo, že tato metoda může býti snadno adaptována pro konkrétní praktické účely, na př. stanovení minimální koncentrace určitého antiseptika, působícího spolehlivě pro předem určenou dobu (na př. při mytí rukou), nebo pro vyzkoušení citlivosti různých druhů bakteriálních. Jejich hlavní výhoda jest v tom, že nám dává výsledky velmi málo kolísavé a že bezpečně odstraňuje inhibiční účinek antiseptik málo rozpustných, nebo velmi účinných, takže se hodí na př. i pro zjištění antiseptického účinku látek kalných, neprůhledných, anilinových barviv, esencí, případně i látek rozpustných v oleji.

Sommaire.

L'auteur donne une analyse détaillée des vues et méthodes concernant l'examen des antiseptiques, surtout en ce qui regarde leur standardisation. Ayant examiné les données bibliographiques et s'appuyant sur ses expériences propres, il trouve que les méthodes à support bactériel seules sont adaptées aux antiseptiques particulièrement forts, difficilement solubles et à effet d'inhibition puissant. S'étant persuadé de l'imperfection relative des autres méthodes, l'auteur a élaboré la sienne, dont il donne une description détaillée. Des billes de verre rugueuses, de la grosseur d'un pois y fonctionnent comme support bactériel. Ses principaux avantages sont d'être facilement maniable et très rapide, ainsi que d'empêcher parfaitement, par un simple bain d'eau distillée appliqué aux billes, la pénétration de l'antiseptique dans le milieu de culture, conséquence inévitable chez les méthodes de suspension (original Rideal-Walker), et qui ruine la précision des résultats obtenus à l'aide de ces méthodes.

Literatura.

Reichenbach: Ztrbl. f. B. Orig. I. 89; 15, 1923. — **Weyrauch:** Ztrbl. Orig. I. 1903; 123, 1927. — **Laubenheimer, Pells-Leusden:** Arch. f. Hyg. u. Bakt. 107; 387, 1932. — **Jensen-Jensen:** Ztrbl. f. Bakt. Orig. I. 130; 144, 1933. — **Dujarie de la Rivière:** L'immunité par mécanisme physico-chimique. Paris 1934. Masson & Cie. — **Wetzel:** Arch. f. Hyg. u. Bakt. 114; 1, 1935. **Gottsacker:** Arch. f. Hyg. u. Bakt. 115; 198, 1936. **Gottsacker:** Arch. f. Hyg. u. Bakt. 116; 88, 1936. — **Gottsacker:** Ztrbl. f. Bakt. Orig. I. 139; 70, 1937. — **Blaas:** Ztrbl. f. Bakt. Orig. I. 140; 51, 1937. — **Pesch:** Ztrbl. f. Bakt. Orig. I. 140; 81., 1937. — **A. J. Salle:** Proceedings 38 Ann. meeting of the Soc. Amer. Bacter. 1936. Journ. of Bacter. 1937, Vol. 33. Nro. 1. P. 33. G. 26. — **Topley-Wilson:** The principles of bacteriology and immunity. London 1937. P. 86—131. — **Kliewe:** Ztrbl. f. Bakt. Orig. I. 141; 194., 1938.