

SBORNÍK

VOJENSKÉ ZDRAVOTNICKÉ LISTY

ROK 1965

ČÍSLO 1

STUDIUM ÚČINKU AEROSOLU KYSELINY PEROCTOVÉ NA ROZPRÁŠENÉ MIKROORGANISMY

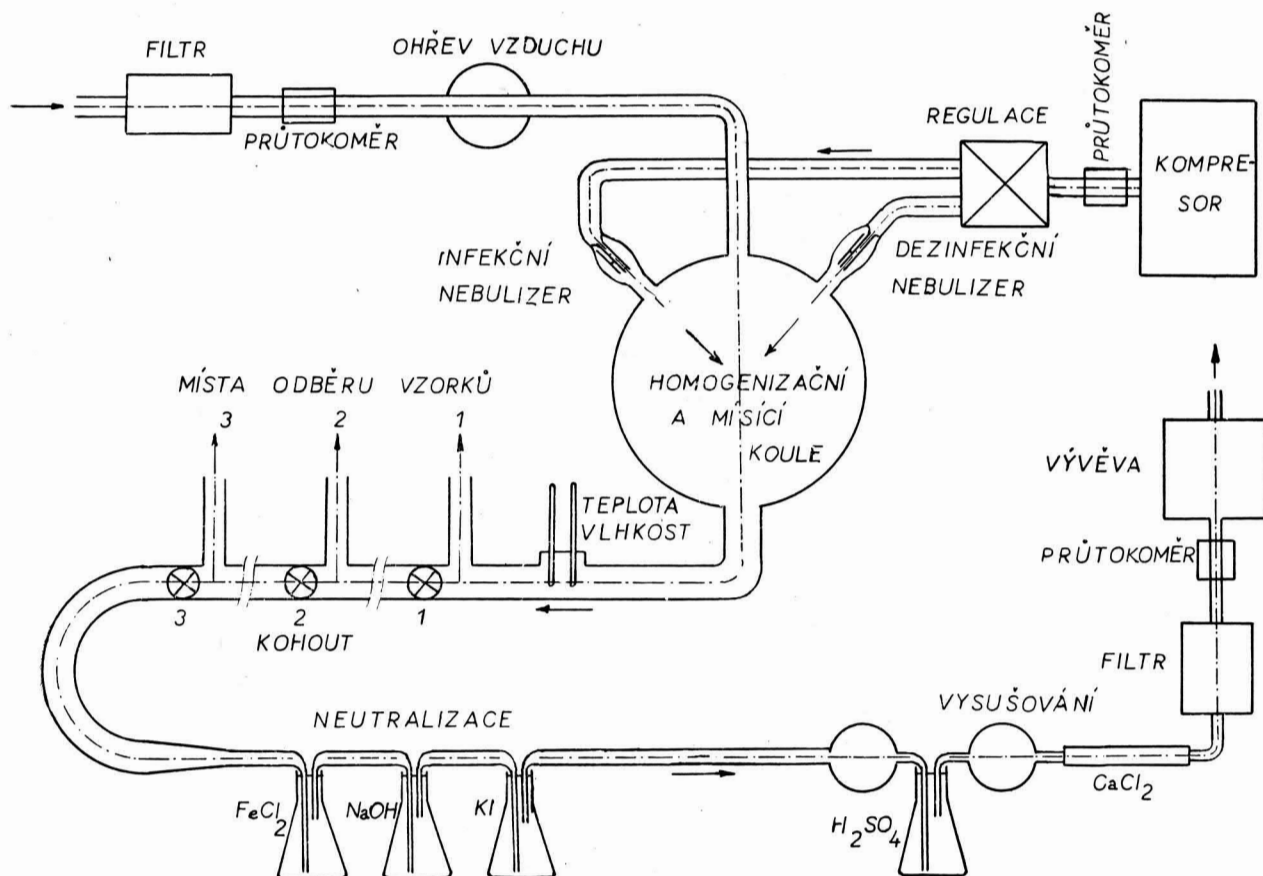
Podplukovník MUDr. Bohumil TICHÁČEK, CSc.

Dezinfekční aerosol je v současné době optimální aplikační formou, jež by mohla splnit základní požadavek na prostorovou dezinfekci, tj. komplexní zasažení vzduchu i s povrchem předmětů. Přitom je obecně známo, že mikrob volně se vznášející je dezinfekčním prostředkem postižitelnější než mikrob usazený na povrchu předmětů v prostoru se nacházejících. V široké škále látek zkoušených a navrhovaných k rozprašování či odpařování nalézáme velmi mnoho těch, jež účinně zasahují mikroby ve vzduchu, zato však selhávají ve svém účinku povrchovém (chlór obsahující preparáty, deriváty fenolu, glykoly, peroxid vodíku, éterické oleje, formalín, organické kyseliny, baktericid-

ní fumigancia a dezinfekční plyny). Žádanému společnému účinku se blíží do jisté míry jen některé vyšší glykoly a organické kyseliny, avšak i zde jsou rozdíly v nutných účinných expozicích a koncentracích velmi značné, v neprospěch povrchové dezinfekce.

Dosavadní zkušenosti s rychlostí a spolehlivostí baktericidního účinku kyseliny peroctové (Greenspan a spol. 1955, Ticháček 1962, 1964a, 1964b, 1964c) nás nutně vedly k tomu, abychom prověřili aerosol této kyseliny také z tohoto hlediska.

Tato první část práce se zabývá laboratorními pokusy zaměřenými na dezinfekci a sterilizaci vzduchu.



Obr. 1. Schéma dynamického systému ke studiu dezinfekčního účinku aerosolu kyseliny peroctové

Materiál, metodika a výsledky

Kyselina peroctová: Pro tuto část výzkumu bylo užito kyseliny peroctové připravené reakcí 30% peroxidu vodíku s kyselinou octovou. Koncentrace kyseliny peroctové i pracovních roztoků byly průběžně ověřovány (Kuliš 1963).

Pracovní kmeny: *Serratia marcescens*, sb. kmen č. 3, *Sarcina lutea* sb. kmen č. 24, oba známých a typických vlastností. *Bacillus megatherium*, sb. kmen č. 1. Spory přežívaly var v destilované vodě 25 min., hynuly za 30 min., v 10% fenolu přežívaly 60 min., ve 2% fenolu 24 hod.

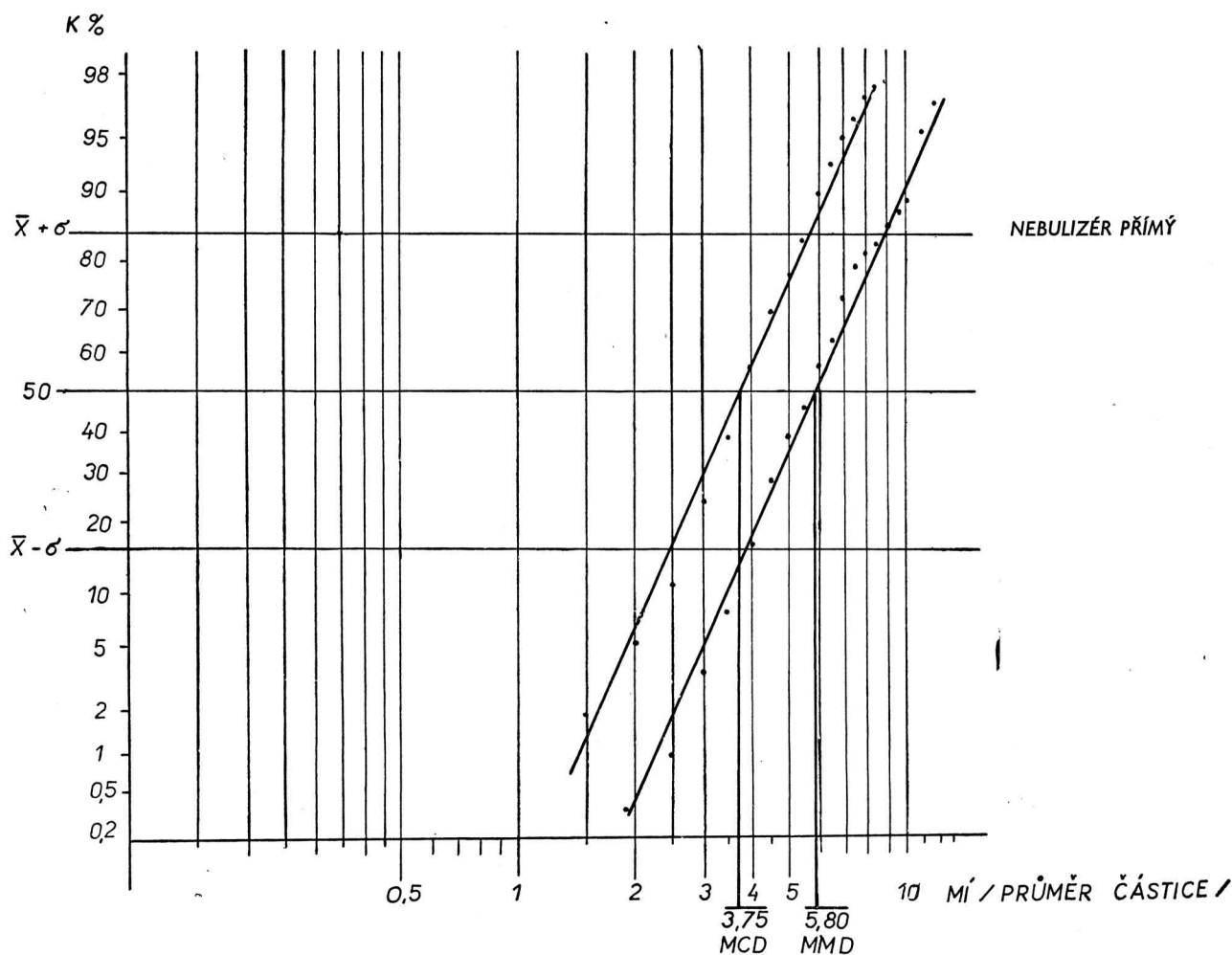
Kultivační půdy: Jako v základních pokusech s kyselinou peroctovou (Ticháček 1962).

Pokusná aparatura: Zvolili jsme náročnější dynamický systém vlastní konstrukce a uspořádání, přizpůsobený cíli výzkumu, kterým bylo: prověřit baktericidní účinek aerosolu kyseliny peroctové na mikroorganismy jednak rozprašené, jednak zasušené na pevném podkladě. V podstatě šlo o systém skleněného potrubí, sestavený z normovaných dílců o vnitřním průměru 50 mm (obr. 1).

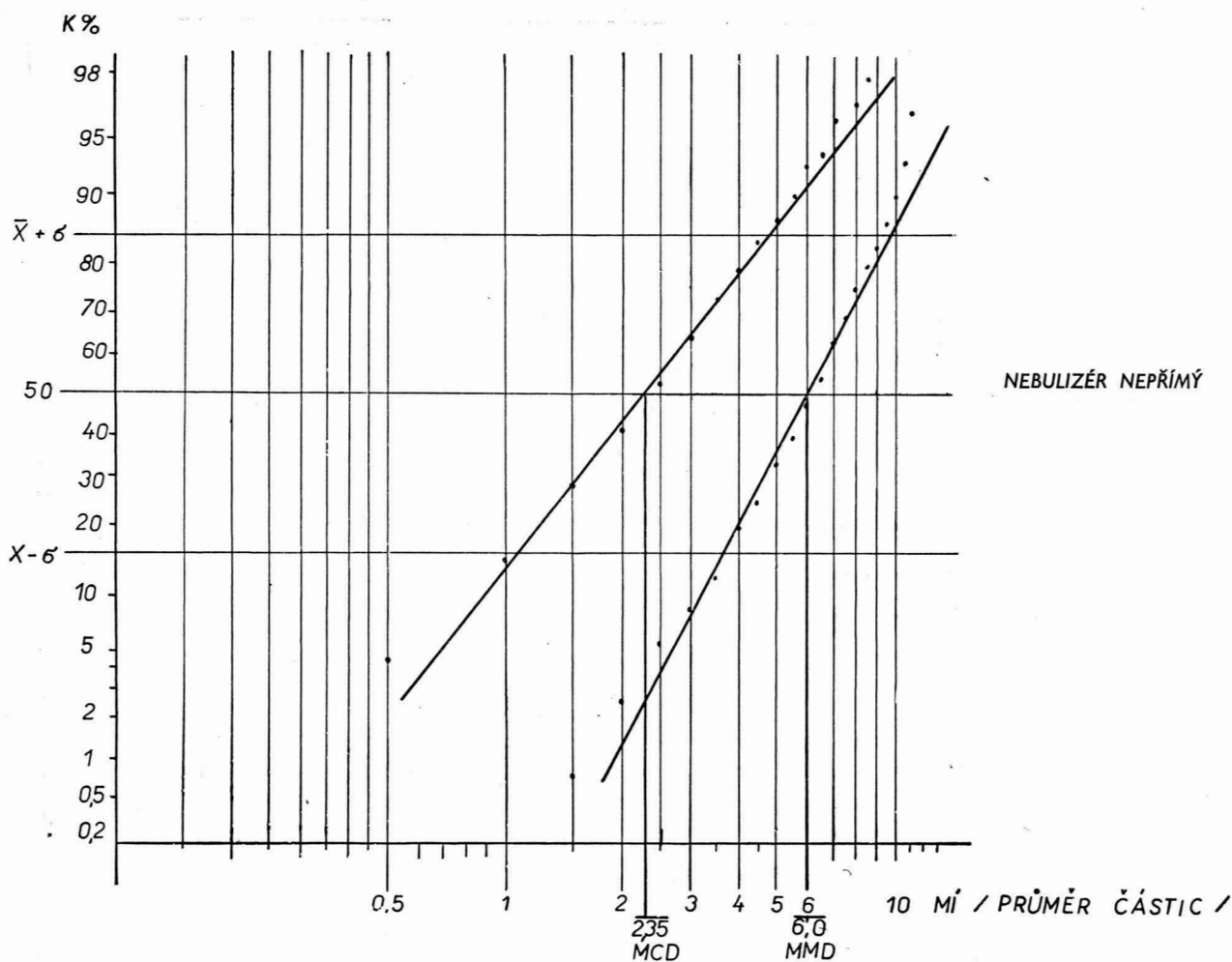
Infekční aerosol byl vytvářen skleněným přímým nebulizérem, dávajícím spektrum o MCD 3,75 a MMD 5,8 mí. Dezinfekční aerosol byl pro-

dukován nepřímým nebulizérem, dávajícím aerosol o MCD 2,35 mí a MMD 6,0 mí. Uvedené hodnoty i s příslušnými odchylkami vyplývají z grafů 1 a 2.

Oba nebulizéry byly napojeny na kompresor přes regulační průtokoměr a regulační panel, umožňující jednotlivé nebo současné zapojení při kontrolované a regulovatelné rychlosti průtoku. Nebulizéry, obvyklým způsobem okalibrované, ústily do plexi-koule ve směru jejich dvou poloměrů pod úhlem 45° od svislé osy koule. Vzduch do koule byl přiváděn ještě dalším otvorem přes nádobku v pískové lázni, což umožňovalo měnit teplotu přiváděného vzduchu. Na samém začátku přívodu byl pak filtr z ochranné masky a průtokoměr. Koule plnila funkci homogenizační a mísící. Na plexikouli bylo napojeno skleněné stavebnicové potrubí, opatřené třemi odběrovými vývody. Za každým vývodem byl umístěn trojcestný kohout, který sloužil k přerušení hlavního vedení za odběrovým místem, ze kterého byl odběr právě prováděn. Před prvním odběrovým místem byly do potrubí umístěny vlhký a suchý teploměr. Za třetím odběrovým místem a posledním kohoutem byly vřazeny tři velké nádoby, obsahující neutralizační roztoky (FeCl_2 , NaOH , KJ), dále filtr, exsikační zařízení a průtokoměr před vý-



Graf 1. Grafické znázornění MCD a MMD u přímého (infekčního) nebulizéru



Graf 2. Grafické znázornění MCD a MMD u nepřímého (dezinfekčního) nebulizéru

věvou, odkud byl vzduch odváděn do větrací šachty digestoře.

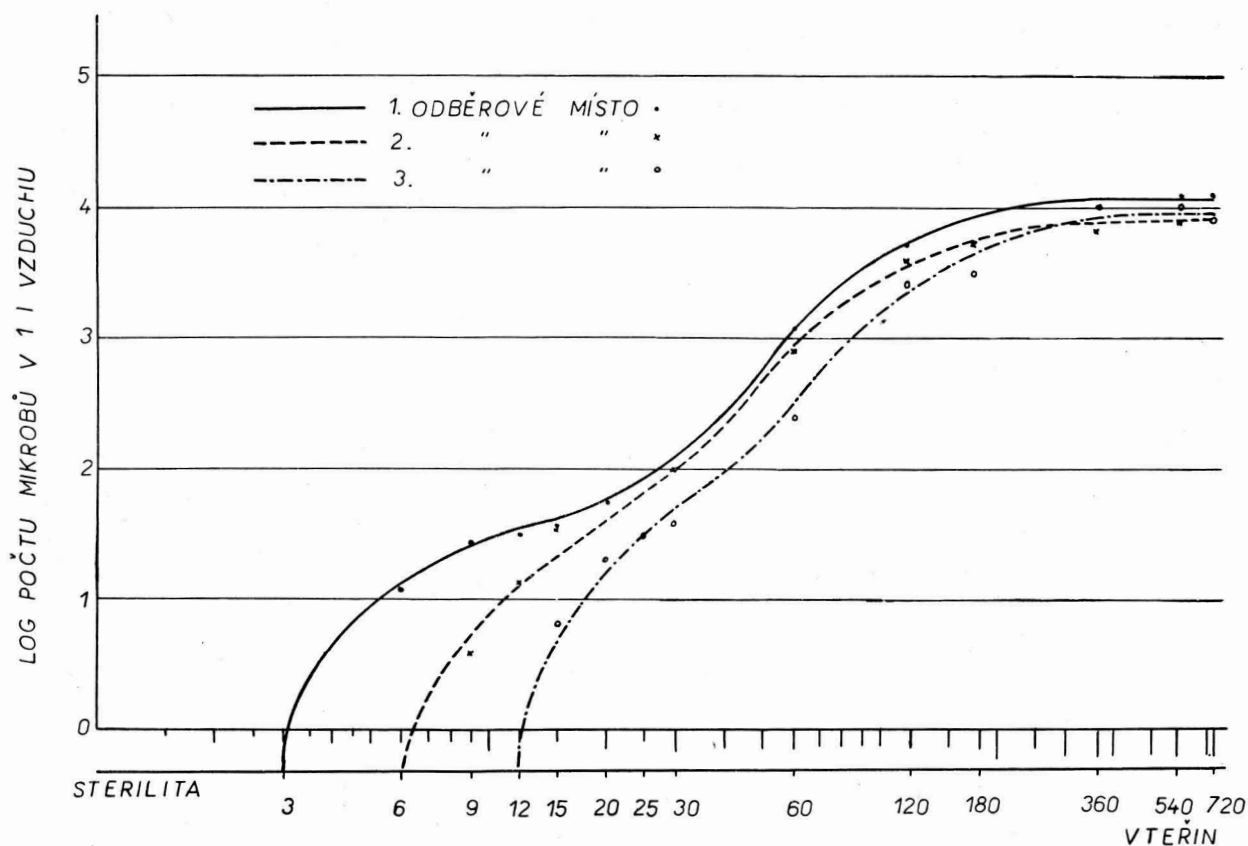
Příprava pracovního postupu: Jednou ze základních otázek v přípravě pracovního postupu bylo stanovit expozice, odpovídající vzdálenosti jednotlivých odběrových míst od mísící plexikoule. Z dostupných prostředků přicházely v úvahu tři cesty, jak změřit dobu potřebnou ke společné cestě infekčního a dezinfekčního aerosolu k jednotlivým odběrovým místům a stanovení doby potřebné k dosažení aerodynamické stálosti v dynamickém systému:

- chemická indikace první stopy kyseliny peroctové v jednotlivých odběrových místech,
- použití průtokového nefelometru,
- mikrobiologické metody.

Po ověření jednotlivých postupů jsme se rozhodli pro model nejbližší plánovaným pokusům. Kvantitativními mikrobiologickými metodami jsme sledovali pohyb definovaného aerosolu *Serratia marcescens*. K tomuto účelu se ukázaly vhodnými skleněné hřebeny, opatřené kóhoutky, a sada impingerů, jež bylo možno podle

potřeby postupně zařazovat či vyřazovat. Složitě aerodynamické poměry byly v důležitých místech sledovány průtokoměry nebo rtuťovými manometry a udržovány při zjišťování expozic ve stejných konstantních podmínkách jako později ve vlastních pokusech. Před nebulizéry byla udržována průtoková rychlost podle kalibračních křivek na hodnotě 15 l/min. u infekčního nebulizéru, odběr vzorků impingerem probíhal při rychlosti 8 l/min.

Na konci celého složitého systému, kde byla zdrojem odsávání olejová vývěva, byla udržována hodnota průtoku na 80 l/min. Za těchto podmínek bylo možno udržovat celý systém v dynamice libovolně dlouho. Ukázalo se, že v podmínkách pokusu se objeví první mikroby za 6 vteřin v prvním odběrovém místě, za 9 vteřin ve druhém a za 15 vteřin v třetím odběrovém místě. Tyto hodnoty jsme vzali jako základ pro charakteristiku expozic v jednotlivých místech dynamického systému. Z výsledků dále vyplynulo, že po 6–10 min. od uvedení do chodu nastává vyrovnání aerodynamických poměrů. Stanovili jsme tedy 10 min. jako interval, jenž musí být v každém pokuse dodržen do zapojení systému k odběru vzorků (graf 3).



Graf 3. Stanovení expozic v jednotlivých odběrových místech dynamického systému

Průběh pokusu:

1. Zapojení vývěvy jako základního zdroje odsávání a ustálení hodnoty průtokoměru u vývěvy na 80 l/min.

2. Zapojení infekčního nebulizéru obsahujícího definovanou mikrobiální suspenzi. Rychlost průtoku před nebulizérem byla určena podle kalibračních křivek a odpovídala 15 l/min.

3. Po deseti minutách, nutných k vyrovnání systému, byl proveden odběr kontrolního vzorku. Odběr byl prováděn pomocí kapalinových impingerů se zúženým ústím při průtoku 8 l/min. Impingery byly plněny po 10 ml tekutiny, obsahující 2 g želatiny, 4 g Na_2HPO_4 , destilované vody ad 1000 ml. pH 7,0. Odběr trval 60 vteřin.

4. Pak byl do dynamického systému zapojen dezinfekční aerosol bez přerušení přísunu infekčního aerosolu. Zapojení bylo provedeno na rozvodném panelu, aby rychlost průtoku infekčním nebulizérem zůstala nezměněna. Rychlost průtoku, připadající na dezinfekční nebulizér, odpovídala v tomto případě 25 l/min.

5. Po opětovném vyrovnání systému byl proveden ze stejného odběrového místa, odpovídajícího příslušné expozici, odběr za stejných podmínek jako v kontrole.

6. Vzorky byly obvyklým kvantitativním způsobem zpracovány a výsledky vyhodnoceny podle zásad, jež uvádí Rosebury (1947). Hodnoty čtyř počítatelných ploten (plotny s počtem pod 15 a nad 300 kolonií a odchylky větší $\pm 40\%$

se odkládaly) kontrolních a čtyř počítatelných ploten pokusných byly uvedeny ve vztahy, jež byly v dalším graficky vyjádřeny.

7. Neutralizaci přebytků dezinfekčního prostředku jsme neprováděli (s výjimkou práce s bakteriofágem), neboť v impingeru docházelo k naředění a rychlému rozkladu stop kyseliny peroctové. Provedli jsme v tomto směru četné kontroly, které potvrdily již publikované údaje (Greenspan a spol. 1955), že neutralizace kyseliny peroctové není nutná.

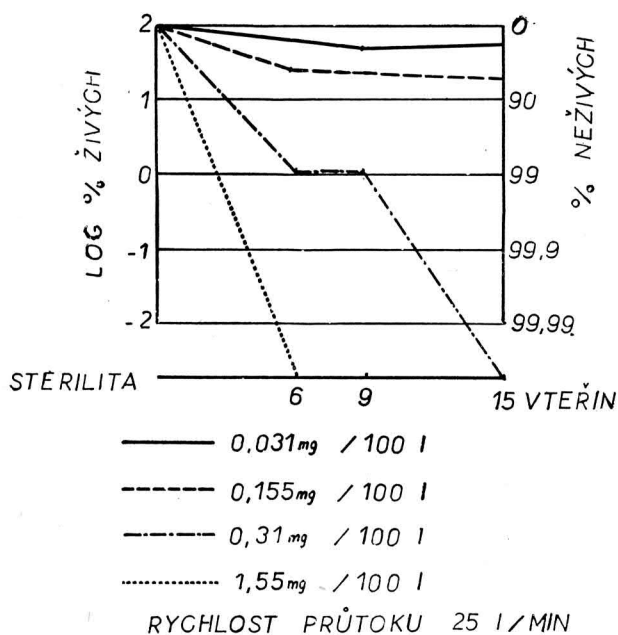
8. V průběhu každého pokusu jsme registrovali teplotu a relativní vlhkost vzduchu v systému před odběrem vzorku.

9. Mezi každým pokusem jsme provedli důkladné provětrání zařízení s jodometrickou kontrolou chemické čistoty a mikrobiologickou kontrolou sterility zařízení. Přesto, že jsme měli vypracován celý systém dezinfekce a promývání, ukázalo se, že jednu hodinu trvající chod zařízení naprázdno zcela stačil k tomu, že v žádném případě mikrobiologických kontrol sterility, prováděných před každým pokusem, nebyl prokázán ani jediný mikrob z předchozího pokusu.

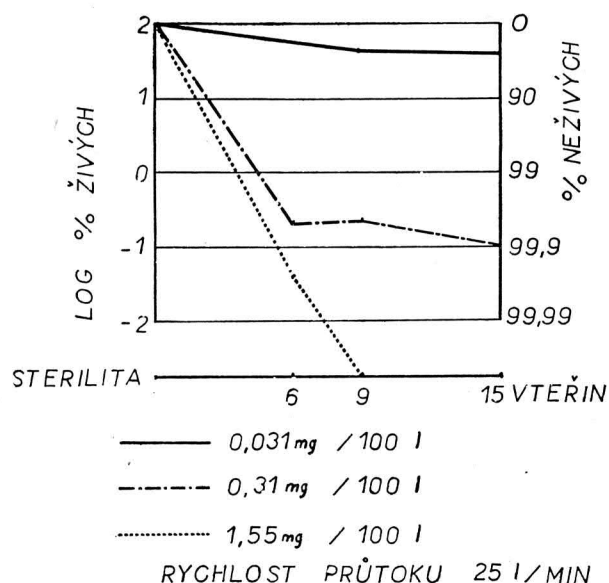
10. Koncentraci kyseliny peroctové jsme stanovovali jednak přepočtem z výchozích koncentrací perkyseliny a kalibračních křivek dezinfekčního nebulizéru, jednak bylo provedeno pro každou novou koncentraci ověřovací chemické stanovení. Výsledné hodnoty jsou uváděny v mg na 100 l pro příslušnou průtokovou rychlost.

Výsledky první části pokusů s účinkem aerosolu kyseliny peroctové na aerosol *Serratia marcescens*, *Sarcina lutea* a spory *B. megatherium* ukazují grafy 4, 5, 6.

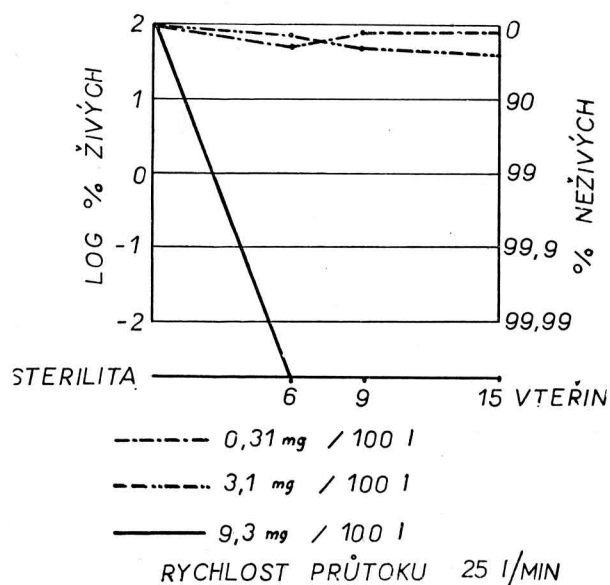
Vyplývá z nich vysoká rychlost účinku aerosolu kyseliny peroctové na rozprášené mikroorganismy, kdy bylo možno dosáhnout sterilizující koncentrace již v prvním odběrovém místě, odpovídajícím šesti vteřinové expozici. U *Serratia marcescens* a *Sarcina lutea* to byla koncentrace 1,55 mg na 100 l při 25 l/min. a u spor *B. megatherium* to byla koncentrace 9,3 mg na 100 l při 25 l/min. Tyto pokusy probíhaly při teplotě 22,2–23° C (v průběhu po-



Graf 4. Dynamika účinku aerosolu kyseliny peroctové na aerosol *Serratia marcescens*



Graf 5. Dynamika účinku aerosolu kyseliny peroctové na aerosol *Sarcina lutea*



Graf 6. Dynamika účinku aerosolu kyseliny peroctové na rozprášené spory *B. megatherium*

kusu téměř stálé) a při výchozích hodnotách relativní vlhkosti 36–39 %, která ke konci pokusu dosahovala hodnot 63–73 %.

Všechny tyto pokusy byly neobyčejně náročné zejména v podmínkách našeho zařízení, sice důkladně a dlouho prověřovaného, přece však technicky schopného pouhé registrace a nikoli přesné regulace základních hodnot (teplota, vlhkost).

Získané hodnoty potvrzují, že vysoká rychlost účinku, známá z práce s roztoky kyseliny peroctové, se projevuje i při účinku na rozprášené mikroby.

V dalším jsme se chtěli alespoň modelově přesvědčit o účinku aerosolu kyseliny peroctové na rozprášeného stafylofága. Pro tyto zkoušky, prováděné ve stejné aparatuře, bylo však nutné upravit metodiku odběru vzorků. Vyzkoušeli jsme různé metody průkazu bakteriofága v tekutém i tuhém prostředí. Jako nejlepší se nám jevil vychytávání vzorků aeroskopem Chirana. Protože však na pevné půdě (na rozdíl od impingerů) ovlivňovaly stopy kyseliny peroctové ve vyšších koncentracích nepříznivě samotnou kulturu, na níž měl být bakteriofág prokazován, bylo nutno v tomto případě vyřešit neutralizaci zbytků aerosolu kyseliny peroctové. Jako velmi úspěšné v tomto směru se ukázalo předřazení impingeru (promývačky bez jakékoli úpravy ústí) před aeroskop. Šlo tedy o jakýsi preimpinger, který propouštěl bakteriofága a zbavoval jej do určitého stupně, jak vyplývá dále z tabulky, stop kyseliny peroctové. Jedině tak mohl být správně ohodnocen konečný výsledek, tj. lytická reakce způsobená bakteriofágem, od zábrany růstu stafylokoků, způsobené kyselinou peroctovou.

Po vypracování systému kontrol byly provedeny potřebné pokusy za podmínek jinak stejných jako při práci s bakterii. Výsledky jsou shrnuty v přehledové tabulce 1.

Je z nich možno vyčíst, že pokusy jsou hodnotitelné pouze do koncentrace 1,55 mg/100 l vzduchu; při vyšších koncentracích přestal preimpinger plnit svoji úlohu a propouštěl s fágem i přebytek kyseliny. Redukce bakteriofága pod účinkem aerosolu kyseliny peroctové byla patrná již od koncentrace 0,15 mg/100 l. Koncentrace účinkující fagocidně od 9 vteřin pak byla 1,55 mg/100 l.

Poslední skupina pokusů měla za cíl ověřit si alespoň orientačně (přesné studium zkušební zařízení vylučovalo), zda se v účinku aerosolu na rozprašené zárodky projeví změny relativní vlhkosti vzduchu. V uspořádání pokusů se změnilo pouze to, že přiváděný vzduch byl ohříván v pískové lázni a před pokusem byla mísící koule předvlhčena 15 min. v háněním sterilní destilované vody (nebulizérem). V místě odběru bylo možno sledovat a registrovat mě-

nící se hodnoty teploty i vlhkosti. Hodnoceny pak byly pouze údaje z doby odběru. Výsledky jsou uvedeny v tab. 2.

Účinek je vyjádřen konstantou hynutí (Fincher a spol. 1957, Kethley a spol. 1957) a ukazuje, že její hodnoty nevykazují nápadnější výkyvy při změně teploty a relativní vlhkosti. Tyto výsledky jsou v souladu s nízkým teplotním koeficientem peroctové kyseliny (Ticháček 1962, 1964a).

Diskuse

V úvodní části bylo zdůrazněno, že pro ohodnocení účinku dezinfekčního aerosolu je důležitý komplexní účinek na celý prostor. Přesto jsme věnovali značný čas i úsilí, abychom získali informace i o účinku aerosolu kyseliny peroctové na rozptýlené zárodky. Považovali jsme

Tabulka 1. Účinek aerosolu kyseliny peroctové na rozprašeného stafylofága typ 3A

		*)	Koncentrace kys. peroctové v mg/100 l					Expozice v sec	
			0,155	0,31	1,55	3,1	6,2		
Kontrola	Fág (RDT)	I A	0 CL	0 CL	0 CL	0 CL	0 CL	6	
	Kys. peroctová	I A	0 0	0 0	0 0	0 +	0 ++		
Pokus		I A	0 106	0 89	0 50	0 24	0 ++		
Vyhodnocení pokusu			fág prokázán			nelze hodnotit			
Kontrola	Fág (RDT)	I A	0 CL	0 CL	0 CL	0 CL	0 CL		9
	Kys. peroctová	I A	0 0	0 0	0 0	0 +	0 ++		
Pokus		I A	0 12	0 10	0 0	0 0	0 ++		
Vyhodnocení pokusu			fág prokázán		fág negat.	nelze hodnotit			
Kontrola	Fág (RDT)	I A	0 CL	0 CL	0 CL	0 CL	0 CL	15	
	Kys. peroctová	I A	0 0	0 0	0 0	0 +	0 ++		
Pokus		I A	0 10	0 6	0 0	0 0	0 ++		
Vyhodnocení pokusu			fág prokázán		fág negat.	nelze hodnotit			

Legenda: 0 - žádná fagolýza ani jiné známky zábrany růstu
 CL - splývající fagolýza
 +, ++ - stupeň zábrany růstu. Číslo udává počet plaků/cm²
 *) - I-impinger A-aeroskop

Tabulka 2. Sledování vlivu relativní vlhkosti vzduchu na dynamiku dezinfekce rozprášených mikroorganismů aerosolem kyseliny peroctové

Kmen	Koncentrace kyseliny peroctové v mg/100 l	Relativní vlhkost v %	k	Teplota vzduchu ve °C
Serratia marcescens	0,031	32	0,191	32
		34,5	0,038	32
		47	0,375	33,3
		83,5	0,290	26,2
	0,155	84	0,261	23
		38	0,453	32
		43	0,459	26,5
		48	0,395	30
Sarcina lutea	0,155	87	0,555	21,5
		33	0,162	32
Spory Bacillus megatherium	0,31	71	0,139	24
		40	0,305	31,5
		48	0,153	34,2
		77	0,168	24
		85	0,130	28,2

Legenda: k – konstanta hynutí = $\frac{\log n_0 - \log n_1}{t}$

n_0 – počet živých mikrobů v kontrole

n_1 – počet mikrobů v pokuse

t – expozice v sec

za nutné ověřit si, zda se neobyčejná rychlost účinku, se kterou jsme se setkali při práci s roztoky, projeví i při aerosolové aplikaci. Chtěli jsme také získat podklady pro srovnání s ostatními dezinfekčními aerosoly, použitelnými jen k dezinfekci samotného vzduchu. Na druhé straně však nebylo možné ani účelně studovat všechny vztahy a faktory, ovlivňující dynamiku účinku na rozprášené zárodky. Jednak proto, že všechny potřebné zákonitosti účinku byly podrobně studovány při hodnocení základních vlastností kyseliny peroctové (viz výše citované práce) a hlavně proto, že pro praktické využití aerosolů bude třeba opírat se také o výsledky studia povrchového účinku, které předkládáme v samostatném zpracování.

K metodice pokusů: Volba dynamického systému v provedení vlastních pokusů vycházela z důkladného studia všech možností, jež přicházely v úvahu. Dynamický systém je nesporně dokonalejší, i když technicky mnohem náročnější než statický. Naše technické možnosti byly sice omezené, ale nakonec jsme zvolili dynamické zařízení z těchto důvodů:

a) Chtěli jsme je v podstatě použít i pro všechny zkoušky povrchového účinku a ověření inhalační toxicity a tím zachovat v celé práci standardnost nejdůležitější složky, tj. dezinfekčního aerosolu.

b) Dynamický systém umožnil nejlépe splnit zásadu, kterou považujeme za nejdůležitější ve výzkumu dezinfekce vůbec, tj. že hodnota všech používaných metod zkoušení dezinfekčního účinku spočívá v tom, do jaké míry se podaří fixovat všechny proměnlivé veličiny. I když jsme nemohli technicky dosáhnout úplného ovládnutí aerodynamických poměrů v systému a i když nebylo možné získat absolutně citlivou metodu odběru vzorků, přesto umožnil dynamický systém takové uspořádání pokusů, aby kontrola i vlastní pokus probíhaly v podmínkách se stejnými výhodami i případnými chybami. Pro hodnověrnost a reprodukovatelnost výsledků je to nejdůležitější.

c) Dynamický systém nám poskytl podmínky pro další významnou část studia dezinfekčních aerosolů, tj. hodnocení a interpretace výsledků. V pracích studujících účinek dezinfekčních aerosolů na rozprášené mikroorganismy setkáváme se nejčastěji s vyjádřením relativní hodnoty, tj. poměru přeživších v čase t k přeživším v čerstvě připraveném aerosolu (Dunklin, Puck 1948). Často bývá zjišťována koncentrace živých mikrobů jako počet v objemové jednotce aerosolu z počtu kolonií získaných plotnovou metodou ze vzorků z impingerů (Ferry, Maple 1954), kdy počet živých (kolonií) v ml dělíme celkovým počtem v ml a celek násobíme stem. Nejčastěji se však setkáváme s hodnotami konstant hynutí $k = \frac{\log n^0 - \log n_1}{t}$

(Fincher a spol. 1957, Ketley a spol. 1957), kdy n^0 – počet v kontrole a n_1 – počet konečný a t – čas v min. Za určitých okolností bývá výhodné vyjadřovat výsledky časem nutným k zabití určitého procenta mikrobů, např. t_{90} a t_{99} apod. (Husman 1960). Sami máme nejlepší zkušenosti s metodou, která vyjadřuje dynamiku hynutí grafem získaným vnesením hodnot log přeživších (nebo log % přeživších) v závislosti na expozici (De Ome 1944). Použili jsme ji proto ke grafickému znázornění většiny základních pokusů. Tento způsob je velmi výhodný právě pro vyjadřování účinnosti vzdušné dezinfekce. Musíme totiž počítat s tím, že nezachytíme ve vzorku všechny mikroby, ale pouze jejich část. V dezinfekčních pokusech by tato skutečnost mohla být někdy závažná. V našem případě jsme použili jednoduchý subsonický impinger, který může propouštět částice připadající na tu část spektra, která se týká rozměrů kolem 1 mí. Touto chybou je však ztížena i kontrola. Kontroly v našem případě poskytovaly přesto dostatečné počty mikrobů, pohybující se řádově a po přepočtu na 1 litr vzduchu v hodnotách nejméně tisícových. Vztah užitý pro grafické znázornění (log % živých a čas) bere všechny tyto skutečnosti v úvahu a pro posouzení dynamiky hynutí je velmi názorný. Umožňuje současně odečíst i procento neživých, hodnoty $t_{90-99,99}$, posoudit stupeň statistické přesnosti výsledků i odlišit redukční účinek od sterilizačního.

Závěry

1. Aerosol kyseliny peroctové v koncentraci 1,55 mg/100 l sterilizoval při rychlosti pohybu 25 l/min. vzduch od *Serratia marcescens* a *Sarcina lutea* do 6 vteřin. Ke sterilizaci vzduchu od rozprášených spor *B. megatherium* bylo pak třeba v jinak stejných podmínkách koncentrace 9,3 mg/100 l.

2. Aerosol kyseliny peroctové v koncentraci 1,55 mg/100 l působil sterilizačně na vzduch s rozprášeným stafylofágem 3A od 9 vteřin.

3. Baktericidní účinek aerosolu kyseliny peroctové na rozprášené mikroorganismy nebyl ovlivněn změnami relativní vlhkosti vzduchu v rozmezí od 32 % do 87 %.

Za výrobu a stanovení kyseliny peroctové děkují inž. V. Kulišovi, za technickou spolupráci M. Blechové a V. Bubínkovi.

Souhrn

Autor předkládá výsledky studia účinku aerosolu kyseliny peroctové na rozprášené mikroorganismy. V dynamickém systému byly stanoveny účinné koncentrace a expozice při práci s modelovými kmeny: *Serratia marcescens*, *Sarcina lutea*, spory *B. megatherium* a stafylofág.

Pro konečné ohodnocení praktické použitelnosti aerosolu kyseliny peroctové k prostorové dezinfekci považuje autor za nezbytné znát ještě povrchový účinek aerosolu kyseliny peroctové a její toxikologické vlastnosti. Výsledky těchto studií budou předloženy v další práci.

Literatura

- Dunklin E. W., Puck T. T.*: J. Exptl. Med., 2, 87-101, 1948.
- Ferry R. M., Maple T. G.*: J. Inf. Dis., 95, 142-154, 1954.
- Fincher E. L. a spol.*: Appl. Microbiol., 5, 2, 131-135, 1957.
- Greenspan F. a spol.*: Proc. the 42. ann. meet. of the chem. Spec. Manuf. Ass., Dec., 5, 6, 7, 1955.
- Husman K. H.*: Zbl. f. Biol. Aerosolf., 9, 179-194, 1960.
- Kethley T. W. a spol.*: Appl. Microbiol., 5, 1, 1, 1957.
- Kuliš V.*: I. věd. konf. VÚHEM 1963.
- De Ome K. B.*: Am. J. Hyg., 40, 239-250, 1944.
- Rosebury T.*: Experimental air-borne infection, Baltimore 1947.
- Ticháček B.*: Voj. zdrav. l., 5, 222-227, 1962.
- Ticháček B.*: Voj. zdrav. l., 2, 46-51, 1964a.
- Ticháček B.*: Voj. zdrav. l., 4, 182-185, 1964b.
- Ticháček B.*: Čs. epidemiol. 3, 175-179, 1964c.