

## Fyzikální a chemické prostředky pro kontrolu růstu mikroorganismů

### 1) Teoretická část:

#### DEZINFEKCE A STERILIZACE

Odstranění mikroorganismů z prostředí - dekontaminace - může být zabezpečeno různým způsobem a tomu odpovídá též dosažený efekt. Prostý úklid, mytí nebo praní a žehlení snižuje výskyt mikroorganismů až o 90 %. Dezinfekce s použitím chemických dezinficiencí nebo desinfekce fyzikální je definována jako ničení či zneškodňování patogenních mikroorganismů na neživých předmětech, ve vnějším prostředí (ve vodě, ve vzduchu apod.) a v infekčním materiálu. **Cílem dezinfekce je učinit předměty (zevní prostředí) neinfekční.** Účinnost dezinfekce je závislá na rezistenci mikroorganismů vůči těmto prostředkům. Dobré dezinficiens by mělo mít cidní účinek na většinu patogenních mikroorganismů.

Antiseptice je zneškodňování patogenních zárodků v prostředí živých tkání, v ranách, na sliznicích a na kůži s použitím antiseptik. Je namířena hlavně proti mikrobům vyvolávajícím hnisání. U antiseptik není striktní požadavek na baktericidní účinek jako u dezinficiencí, **stačí bakteriostatické působení**. Antiseptika musí splňovat požadavek nejedovatosti a dobré snášenlivosti živými tkáněmi. Na rozdíl od dezinficiencí proto podléhají schválení jako každý jiný lék. U antiseptik není nutná dobrá rozpustnost ve vodě.

Asepsy je souhrn opatření vedoucích ke stavu, kdy v prostředí je minimum mikroorganismů. Asepsy si klade za cíl **zabránit přístupu mikroorganismů k živým tkáním** při chirurgických operacích a to používáním sterilních nástrojů, obvazových látek, šicího materiálu, pryžových rukavic, přípravou operačního pole, dezinfekcí chirurgových rukou, používáním ústenek apod. Pojem asepsy zahrnuje také laboratorní a výrobní metody, u nichž je snaha **zabránit mikrobiální kontaminaci** např. u mikrobiologických laboratorních prací a při výrobě některých léků.

Sterilizace je **zničení všech živých mikroorganismů**, včetně vysoce rezistentních bakteriálních spór fyzikálními nebo chemickými postupy.

#### FYZIKÁLNÍ METODY STERILIZACE

##### Vlhké teplo

Přerušovaná, frakcionovaná sterilizace je sterilizace varem (100°C) působícím po dobu 30 minut v 18-24 hod. intervalech tři dny po sobě. Sterilizovaná látka musí být v mezidobí uložena při pokojové teplotě, aby termorezistentní spóry, které var přežily, mohly vyklíčit. Následující var je pak ničící jako vegetativní formy bakterií.

Tyndalizace se používá ke sterilizaci termolabilních roztoků bílkovin, které koagulují již při teplotě 60°C. Postup je podobný jako při frakcionované sterilizaci. Roztok se zahřívá ve vodní lázni při 56-58°C (resp. při 60-80°C) po 30-60 minut 3 dny po sobě.

Sterilizace nasycenou vodní parou pod tlakem (v autoklávu) se provádí nejčastěji za přetlaku 100 kPa při teplotě 120°C po dobu 20-30 minut. Tento způsob sterilizace umožňuje zničit bezpečně všechny formy mikroorganismů. Autokláv je tlakový sterilizátor opatřený vodoznakem pro stav vody ve vyvíječi páry (pokud není přímo napojen na přívod páry z centrálního zdroje). Dále je vybaven pojistným ventilem, dvěma manometry (jeden k měření přetlaku páry ve vyvíječi, druhý v pracovním prostoru), odvodušňovacím ventilem, vodní vývěvou a teploměrem (obr. 1). Dokonalé odvodušňování pracovního prostoru na začátku sterilizace je předpokladem úspěšného autoklávování (směs páry se vzduchem při 120°C a 30 minutové expozici nemá spolehlivý sterilizační efekt). V autoklávu lze sterilizovat obvazový materiál, operační prádlo, různé roztoky, kovové lékařské nástroje, pryžový materiál. Při sterilizaci bakteriologických půd je třeba dát pozor na možnost hydrolýzy disacharidů a poškození termolabilních látek. Textilní materiál se ukládá do sterilizačních bubnů. Tyto vkládáme do autoklávu otevřené a po skončení sterilizace je ihned uzavíráme (posuvný pás na obvodě bubnu). Materiál uzavřený v bubnu se považuje za sterilní jen dny po sterilizaci. Potom je nutno buben znovu přesterilizovat, i když nebyl otevřen. Vysterilizované textilie musí být před vyjmutím bubnu z autoklávu usušeny ve vakuu zapojením vodní vývěvy.

### Suché teplo

je méně účinné než pára pod tlakem. Má nižší koeficient vodivosti a proto sterilizace probíhá při vyšší teplotě a po delší expoziční dobu.

- **Otevřený plamen**  
se používá při žihání bakteriologické kličky, k likvidaci pokusných zvířat a některých předmětů malé hmotnosti, např. kontaminovaných obvazů.
- **Horkovzdušná sterilizace**  
skla, porcelánu, kovů, se provádí v horkovzdušných sterilizátorech. Doba vlastní sterilizace se počítá od okamžiku dosažení předepsaných teplot. V přístrojích s nucenou cirkulací vzduchu sterilizujeme obvykle buď při 160°C 60 minut, nebo při 180°C 20 minut.

### Sterilizace filtrací

slouží k odstraňování bakterií z tekutin tam, kde je jiný způsob dekontaminace nevhodný. Viry procházejí většinou bakteriálních filtrů. Podle konstrukce a použitého materiálu dělíme filtry na:

- **Azbestové Seitzovy filtry** - lisované z azbestu a celulózy. Filtry zadržující bakterie jsou označeny EK (Entkeimung). Filtrační vložky jsou jednoúčelové a sterilizují se i s filtračními nálevkami v autoklávu.
- **Skleněné jenské filtry** - z borosilikátového skla ve formě porézních destiček zatavených v nálevkách. Používají se opakovaně. Po použití se čistí konc. kyselinou sírovou nebo chromsírovou a promývají důkladně vodou. Sterilizují se horkým vzduchem nebo v autoklávu.

- *Membránové ultrafiltry* - z nitrocelulózy s různou velikostí pórů a průměru se u nás vyrábějí pod názvem Synpor. Vkládají se do speciálních kovových nálevek a sterilizují se v autoklávu nebo UV zářením germicidní lampou po dobu 20-30 minut ze vzdálenosti asi 50 cm. Filtrace výše uvedenými filtry se provádí za použití negativního tlaku pomocí vývěvy.

### Sterilizace zářením

- **Ultrafialové záření (UV)**  
Optimální baktericidní účinek je při vlnové délce kolem 254 nm, kdy je záření maximálně absorbováno nukleovými kyselinami. Jako zářiče se používají obvykle germicidní lampy. UV záření slouží ke sterilizaci vzduchu a pracovních ploch přímo vystavených paprskům. Používá se k vyzařování operačních sálů, aseptických boxů, piteven, odběrových místností v léčebnách tuberkulózy apod. Vyzáření nemůže nahradit úklid pomocí dezinfekčních prostředků. Účinnost UV klesá se čtvercem vzdálenosti ozařovaného objektu.
- **Ionizující záření**  
je výhodné, protože penetruje, ale nezahřívá sterilizovaný předmět a nemění vlastnosti většiny sterilizovaných látek. Zdrojem gama záření v praxi je obvykle radioaktivní kobalt (<sup>60</sup>Co). Gama záření se používá k průmyslové sterilizaci (obvazový materiál, plasty). Mezinárodně stanovená sterilizační dávka je 27 kGy.

### CHEMICKÉ PROSTŘEDKY DEZINFEKCE

Vzorkování a mikrobiologické vyšetření naředěných používaných dezinfekčních roztoků se testuje na standardních kmenech mikrobů, výsledky se odborně interpretují s ohledem na specifické důvody prováděné kontroly. Ve zdravotnických zařízeních se odeberou vzorky naředěných používaných dezinfekčních roztoků a co nejrychleji se transportují do mikrobiologické laboratoře ke stanovení jejich účinnosti na sbírkové kmeny mikrobů, případně účinnosti na mikroby izolované na konkrétním zdravotnickém pracovišti. Stanovit lze dezinfekční účinnost baktericidní, bakteriostatickou, fungicidní (vláknité a kvasinkovité houby), fungistatickou, tuberkulocidní, mykobaktericidní, sporicidní, sporistatickou, virucidní (obalené a neobalené viry). Testování lze přizpůsobit podmínkám čistého, špinavého, vysoce nebo málo znečištěného prostředí.

Specifický účinek chemických látek na mikroorganismy se projevuje v závislosti na jejich koncentraci a době působení (expozice).

Kriteria kvality dezinfekčních prostředků pro volbu jejich použití:

- široké spektrum účinku, jen málo látek působí zároveň baktericidně, virocidně i fungicidně,
- při trvalém používání nevzniká rezistence,
- nejsou toxická,
- mají rychlý dezinfekční účinek,
- mají afinitu k mikroorganismům,
- k dezinfikovanému předmětu jsou inertní,

- dezinfekční účinek je stálý za různých změn vnějších podmínek (teplota, vlhkost vzduchu, pH).

#### Mechanismus účinku

Antimikrobní látky nejčastěji přímo poškozují strukturu mikroorganismů nebo narušují jejich základní metabolické procesy, např. oxidací (sloučeniny chlóru, peroxidy, peroxid kyseliny), redukcí (aldehydy), hydrolýzou (kyseliny, louhy), dehydratací (alkoholy), koagulací bílkovin (alkoholy, fenoly), změnou permeability (detergenční látky).

#### Zásady a kyseliny:

Silně anorganické kyseliny a zásady se pro své toxické a agresivní účinky používají v praxi zřídka. Např. vápenné mléko, kyselina boritá, kyselina peroctová, persteril (32-36% roztok kyseliny peroctové s 10 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 1 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

#### Oxidační prostředky:

peroxid vodíku, manganistan draselný.

#### Sloučeniny halogenů:

chlorové vápno, Chloramin B, Dikonit.

#### Jód a jeho sloučeniny:

jódová tinktura, jodofory, Jodonal B, Jodisol.

#### Sloučeniny těžkých kovů:

Famosept, Merfen, Merthiolát, Thiomersal.

#### Alkoholy:

etanol, n-propanol, etylenoxid.

#### Aldehydy:

formaldehyd, formalin, glutaraldehyd.

#### Fenolové deriváty:

krezoly, Lysol, Orthosan BF 12.

#### Povrchové aktivní látky:

Ajatin, Septonex, Ophthalmo-Septonex.

### KONTROLA ÚČINNOSTI DEZINFEKCE A STERILIZACE

Ke kontrole se používá řada testů podle povahy sterilizované látky a způsobu provádění sterilizace nebo dezinfekce, např. papírové indikátory nebo bioindikátory, stěry sterilním vatovým tampónem.

## 2) Praktická část:

Cíl cvičení: Testování účinku vybraných fyzikálních a chemických prostředků pro kontrolu růstu mikroorganismů (UV záření, desinfekční látky – SAVO, Incidur a Ajatin).

### I) Fyzikální metody kontroly mikrobiálního růstu: UV záření

#### Úkol: Sledovat vliv UV záření na růst mikroorganismů

Experimentální vybavení: Petriho misky s MPA, sterilní vatové tyčinky, papír, alobal 10x10 cm, UV lampa, Erlenmeyerovy baňky se sterilní destilovanou vodou á 20ml

Mikroorganismy: **kultivované v bujonu, ve sladince**

*Pseudomonas fluorescens, Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Saccharomyces cerevisiae, Serratia marcescens*

#### Postup:

- Pomocí hokejky pečlivě rozetřeme 100 µl kultury po celém povrchu agaru (na všechny čtyři plotny s MPA)
- Tři misky rozdělíme fixou na poloviny, umístíme do boxu s UV lampou a odklopíme víčko.
- Polovinu každé misky zakryjeme alobalem.
- První misku ozařujeme 10 s, druhou 30 s a poslední 60 s.
- Po ozařování vrátíme misku zpět a zakryjeme víčkem. Misky inkubujeme dnem vzhůru 24 h při 30°C.

*Pozn: je nutno dbát na řádné a dostatečné rozetření kultury, kterou jsme v dostatečném množství nabrali na vatový tampon!!*

#### Vyhodnocení:

Prohlédněte všechny agarové plotny, výsledky zaznamenejte. Zhodnoťte vliv UV záření na růst bakterie podle jeho délky účinku. Zhodnoťte i růst v zakryté části agarové plotny.

#### Otázky:

*Jak je při ozařování agaru na misce UV světlem nutno odstranit víčko?*

Víčko by pohltilo UV záření .

*Mnohé mikroorganismy nacházející se v prostředí jsou zbarvené. Jakou výhodu může pigment představovat pro organismu?*

Pigment znamená přítomnost barviv. Tato barviva mohou pohlcovat určitou vlnovou délku světla a mikroorganismu tuto světelnou energii může použít na energii chemickou potřebnou pro syntézu živin a pro další mechanismy důležité pro život. V této úloze má pigment souvislost s ochrannou funkcí před UV zářením – záření je odráženo a pohlcováno barvivem. Bylo by možné srovnání s tmavými slunečními brýlemi.

#### Závěr:

- Provedené cvičení nám dokázalo, že mikroorganismy jsou/nejsou ovlivněny UV zářením.
- Tento vliv závisí/nezavisí na druhu mikroorganismu a na době expozice.

- Čím déle záření na plotnu působilo, tím byl/nebyl nárůst menší, co do kvality, tak i kvantity. Proto se také využívá ke sterilizaci laminárních boxů UV lampa.
- UV záření není příliš pronikavé. Dostane se spolehlivě přes list papíru, ale vrstva alobalu už pro něj byla/nebyla překážkou, jak bylo ukázáno v pokusu.

## 2) Chemické prostředky kontroly růstu – desinfekční látky

### Úkol: Zjistit účinnost různých chemických látek jako antimikrobiálních činidel

Experimentální vybavení: Petriho miska s MPA, sterilní mikrobiologické zkumavky, sterilní voda, MPB (10 ml), Petriho miska s Mueller-Hintonovým agarem nebo s MPA, sterilní vatová tyčinka, sterilní pinzeta, automatická pipeta, sterilní špičky, klička, desinfekční činidla (Savo, Incidur, Ajatin)

Mikroorganismy: kultivované v bujonu (bakterie) nebo ve sladince (kvasinky)

*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, ,  
*Bacillus cereus*, *Saccharomyces cerevisiae*

### Postup:

#### a) Účinnost desinfekčních prostředků: vliv doby kontaktu

- Do sterilní zkumavky si připravíme desinfekční prostředek v koncentraci doporučené na obale výrobcem
- Pro Incidur je to 0,5% roztok, tedy do celkového objemu 5 ml přidáme 25 µl prostředku a doplníme 4,975 ml vody
- Pro Savo je to 100 ml do 3 l, tj. 3,33% roztok, tedy do potřebných 5 ml odpipetujeme 166,7 µl Sava
- Pro AJATIN je to 1% roztok
- Misku s MPA rozdělíme na 3 sektory, které označíme 0 minut, 1 minuta a 10 minut (nebo alternativa: 0 minut, 2,5 minut, 5 a 10 minut)
- Do zkumavek přidáme asepticky 0,5 ml kultury
- do sektoru 0 pipetujeme kulturu v roztoku se suspenzí v čase 0 (alternativa – lze vyzkoušet pipetovat pouze samotnou kulturu – pak složí jako kontrola růstu)
- Protřepeme. Ze zkumavky po 1 a po 10ti minutách (nebo po 2,5, 5ti a 10ti minutách) očkujeme do odpovídajících sektorů na misce. Inkubujeme 24 h při 37°C.

#### b) Účinnost desinfekčních prostředků: vliv koncentrace. Stanovení minimální inhibiční koncentrace ředící metodou.

- Sadu sterilních zkumavek si označíme čísly 1-6
- Do první zkumavky si připravíme 2% roztok Inciduru nebo 3% roztok Sava v MPB, tak aby celkový objem činil 2 ml (v případě Inciduru napipetujeme 40 µl a doplníme 1,960 ml bujonu, u Sava odpipetujeme 60 µl a doplníme 1,940 ml bujonu).
- Do dalších 5ti zkumavek asepticky napipetujeme 1 ml MPB
- Z první zkumavky odpipetujeme 1 ml roztoku a napipetujeme ho do druhé zkumavky, protřepeme

- Postupujeme obdobně k předposlední zkumavce (zkumavka 5). 1 ml objemu z této zkumavky vypustíme do odpadní nádoby.
- Poslední zkumavka (č. 6) tak nebude obsahovat žádný desinfekční prostředek a bude sloužit jako kontrola růstu.
- Ostatní zkumavky teď obsahující 1 ml roztoku desinfekčního činidla (s klesající koncentrací) v MPB. Koncentrace prostředku v každé následující zkumavce je poloviční ve srovnání s předcházející zkumavkou. Do každé zkumavky naočkujeme 50 µl kultury. Inkubujeme 24 h při 37°C.
- Kontrolní zkumavka 6 – růst desinfekcí neovlivněné kultury
- Ostatní zkumavky – různá koncentrace desinfekce ovlivňuje minimální inhibiční koncentraci desinfekce podle 1) bakteriálního druhu, 2) podle typu použité desinfekce

Literatura:

**Kneiflová J.:** Hodnocení baktericidní účinnosti dezinfekčních přípravků suspenzní mikrometodou. Čs. epidemiol. 37, 1988, 2, s. 97–103.

Standardní metody pro hodnocení dezinfekční účinnosti chemických látek. AHEM, příloha č. 1, 1985, s. 1–25.

**Melicherčíková, V.:** Sterilizace a dezinfekce ve zdravotnictví. Praha, Grada Publishing 1998.