

P04

Dekontaminační metody

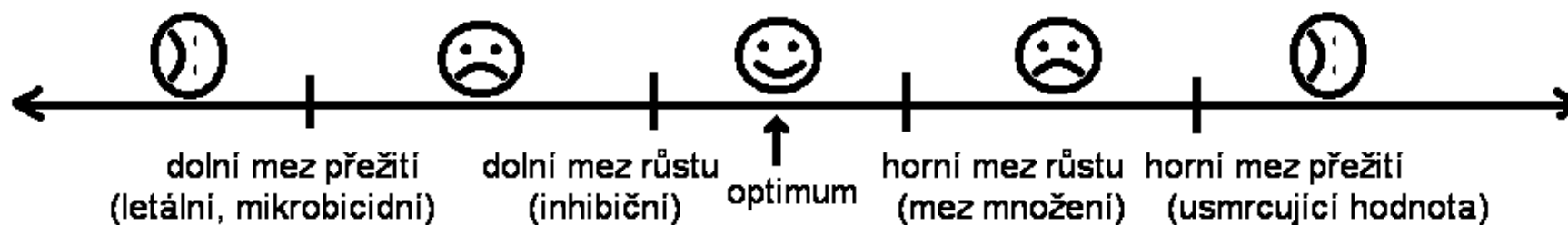
**Diagnostika enterobakterií a
bakteriálních původců
gastrointestinálních infekcí**

Osnova

- dekontaminační metody
 - desinfekce, vyšší stupeň desinfekce
 - sterilizace
 - mytí a dezinfekce rukou
- čeleď *Enterobacteriaceae*
- rod *Campylobacter*, rod *Helicobacter*
- čeleď *Vibrionaceae*
- úkoly

Bakterie a vnější prostředí

- fyzikální a chemické faktory
 - optimum
 - inhibiční mez (mez růstu)
 - baktericidní mez (mez přežití)



Dekontaminace

- **fyzikální a chemické postupy likvidace** mikrobů, hmyzu a hlodavců mimo organismus
 - likvidace hmyzu a hlodavců někdy zvlášť (asanace)
 - nezařazujeme likvidaci mikrobů v organismu (ani lokální, tzn. antiseptika)
- **baktericidní mez = kombinace intenzity** působícího faktoru (faktorů) **a času**

Přehled dekontaminačních metod

- předpis č. 306/2012 Sb.
- Vyhláška o podmínkách předcházení vzniku a šíření infekčních onemocnění a o hygienických požadavcích na provoz zdravotnických zařízení a ústavů sociální péče

Sterilizace	Zničení všech mikrobů v daném prostředí
Vyšší stupeň desinfekce	Zničení naprosté většiny mikrobů, některé formy života mohou přežívat (cysty prvoků apod.)
Dezinfekce	Zničení patogenních mikrobů (závisí na okolnostech)
<i>Dezinsekce</i>	<i>Zničení škodlivého hmyzu</i>
<i>Deratizace</i>	<i>Zničení škodlivých hlodavců</i>

Asepsy a antisepsy

- **přístup:**
 - **pasivní** → asepsy
 - **aktivní** → antisepsy
- **asepsy:**
 - předpokládá se primárně sterilní nebo patogenů prosté prostředí, bráníme kontaminaci vzorku
 - pracovní postupy, sterilní/jednorázové pomůcky, uspořádání pracovních prostor, ...
- **antisepsy:**
 - dezinfekce, sterilizace (někdy též použití antiseptik)

Zásady správné dekontaminace

- výběr vhodné metody/prostředku
- **vhodný:**
 - musí bezpečně ničit **všechny organismy (sterilizace)**
 - musí bezpečně ničit **všechny patogenní organismy (dezinfekce)**
 - **nesmí ničit** sterilizovaný/dezinfikovaný **materiál**
 - musí být **prakticky použitelný**
- použití **dostatečné intenzity a doby působení**

Kroky před a po dekontaminaci

- **před dekontaminací** je časté **mechanické očištění** (např. chirurgické nástroje) **a osušení**, postupy upravuje vyhláška
 - u rukou postupujeme obráceně (dezinfekce → mýdlo)
- **po dekontaminaci** mohou následovat oplach nebo odvětrání působící chemikálie, **uchování dekontaminovaných předmětů**
- **uchovávání** (tj. doba, jak dlouho předmět vydrží sterilní) upravuje vyhláška

Dezinfekce

- **fyzikální metody:**

- **var za atmosférického tlaku** (nejméně 30 minut)
- **var v přetlakových nádobách** (nejméně 20 minut)
- UV záření, filtrace, žíhání, spalování
- pasterizace
 - ošetření nízkou teplotou po dlouhou dobu (LTLT: Low Temperature – Long Time)
 - např. mléko při teplotě 62,5 °C po 30 minutách
 - ošetření vysokou teplotou po krátkou dobu (HTST: High Temperature – Short Time)
 - např. mléko při teplotě 72 °C za 15 sekund
 - UHT (Ultra High Temperature)
 - např. mléko a smetana na 135 – 150 °C po 1 – 2 sekundy

Dezinfekce (2)

- **chemické metody:**

- **oxidační činidla:**

- peroxidy: **peroctová kyselina** (CH_3COOOH , Persteril), působí i na spory, houby, TBC; 0,5% roztok = vyšší stupeň dezinfekce; nevýhody: agresivita, nestabilita, odbarvování textilií
 - **peroxid vodíku** (H_2O_2), podobné účinky, méně agresivní, ale také méně účinný
 - chlorové preparáty: **chlornan sodný** (NaClO , Savo), **chlornan vápenatý** ($\text{Ca}(\text{ClO})_2$, chlorové vápno), **chloramin** (chloramin T, dříve chloramin B)

Dezinfekce (3)

- **chemické metody:**
 - **oxidační činidla:**
 - jodové preparáty: jodová tinktura; **Jodonal B, Jodisol, Betadine** obsahují jód v komplexu
 - manganistan draselný (již se nevyužívá)
 - **formaldehyd** (konzervace, ve směsích), kresol
 - **ethanol** (70% roztok, ve směsích)
 - **tenzidy: Orthosan BF 12, Ajatin, Septonex**
 - **anorganické kyseliny a zásady**
 - **těžké kovy**
 - **kombinované přípravky** (Incidur)

Spektrum účinku dezinfekce

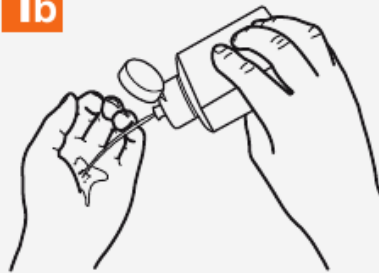
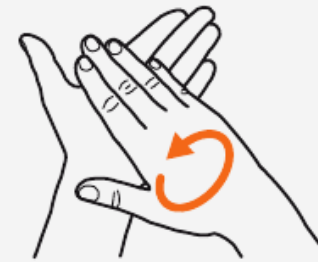
- A = baktericidní (usmrcují vegetativní formy bakterií a mikroskopické kvasinkové houby)
- B = virucidní (usmrcují viry)
- C = sporocidní (inaktivují spory bakterií)
- T = tuberculocidní (působí na původce tuberkulózy)
- M = mykobaktericidní (působí i na atypická mykobakteria)
- V = fungicidní (působí proti mikroskopickým kvasinkám i vláknitým houbám)

Umývání a dezinfekce rukou

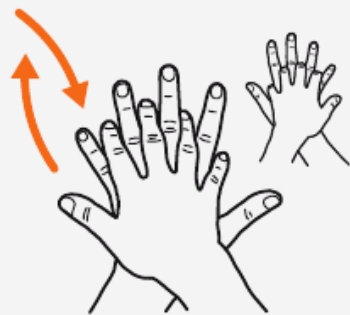
- pojmy z legislativy:
 - **Mechanické mytí rukou** (MMR) – mytí mýdlem, předchází CHDR
 - **Hygienické mytí rukou** (HMR) – mytí dezinfekčním mýdlem
 - **Hygienická dezinfekce rukou** (HDR) – dezinfekce např. alkoholovými prostředky, doporučené ve zdravotnictví
 - **Chirurgická dezinfekce rukou** (CHDR)
- umývání a dezinfekce rukou je **nezbytná i při použití rukavic**

1a

Do sevřené dlaně aplikujte prostředek v množství dostačujícím pro celý povrch rukou.

1b**2**

Třete ruce dlaní o dlaň.

3

Třete pravou dlaní o levý hřbet ruky se zaklesnutými prsty a naopak

4

Dlaní o dlaň se zaklesnutými prsty

5

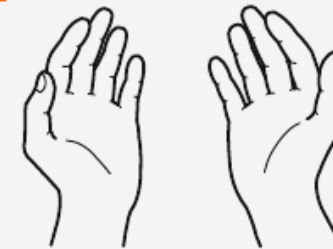
Hřbety prstů o druhou dlaň se zaklesnutými prsty

6

Rotační tření levého palce sevřeného v pravé dlaní a naopak;

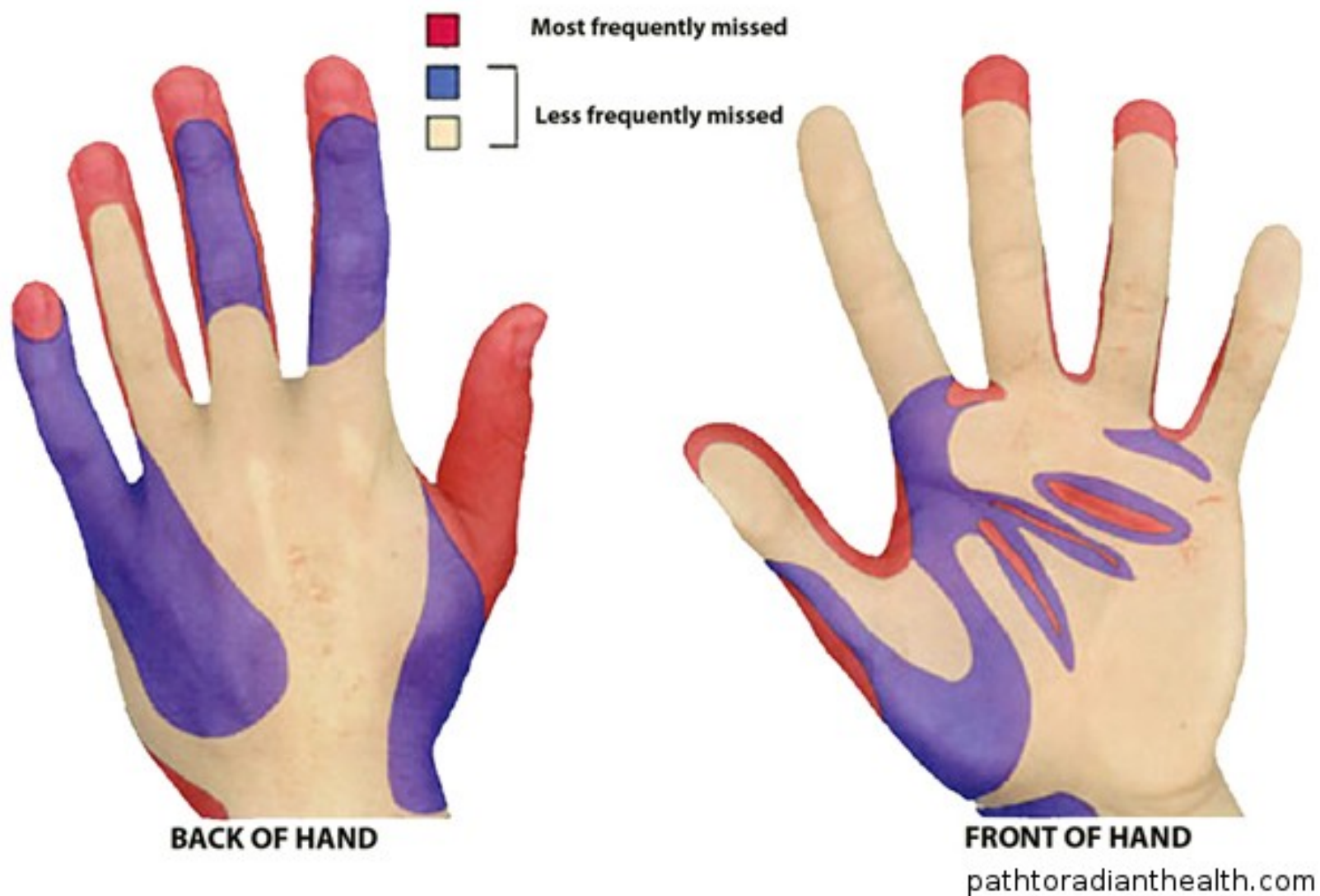
7

Rotační tření v obou směrech sevřenými prsty pravé ruky o levou dlaň a naopak;

8

Po usušení jsou Vaše ruce dezinfikovány.

Nejčastěji vynechávaná místa



Vyšší stupeň dezinfekce

- dezinfekční **přípravek se širokým spektrem účinnosti** (Persteril, glutaraldehyd, apod.)
- **nemusí ničit cysty** prvoků a **vajíčka** červů
- pro zdravotnické prostředky, které **nemohou být dostupnými metodami sterilizovány**
- používají se k výkonům a **vyšetřování** mikrobiálně fyziologicky **neosídlených tělních dutin (flexibilní endoskopy)**
- dvoustupňová dezinfekce = vyšší stupeň dezinfekce + oplach pitnou/čištěnou vodou
 - používá se k výkonům a vyšetřování mikrobiálně fyziologicky **osídlených** tělních dutin

Fyzikální sterilizace

- **vlhkým teplem** (syťou vodní parou) pod tlakem (autoklávování)
 - předměty z kovu, skla, porcelánu, keramiky, textilu, gumy, plastů, aj.
 - **121 °C + přetlak 1,05 bar / 20 minut**
 - **134 °C + přetlak 2,04 bar / 10 minut**
 - 134 °C + přetlak 2,04 bar / 60 minut (suspektní prionová nákaza; ve spojení v alkalickém mytím)
- cirkulujícím (proudícím) **horkým vzduchem**
 - předměty z kovu, skla, porcelánu, keramiky
 - **160 °C / 60 minut; 170 °C / 30 minut; 180 °C / 20 minut**

Fyzikální sterilizace (2)

- **plazmou**

- vysokofrekvenční elektromagnetické pole nebo vysokonapěťový výboj
- ve vysokém vakuu působením na páry **peroxidu vodíku**, nebo jiné chemické látky **uvolňují volné radikály kyslíku** (hydroxyl, hydroperoxyl)
- účinek je dán nízkoteplotní plazmou plynu (**peroxid vodíku**, kyselina peroctová) při teplotě do **50 °C**, čas od 30 do 75 minut (podle přístroje)
- **termolabilní nástroje a pomůcky**

Fyzikální sterilizace (3)

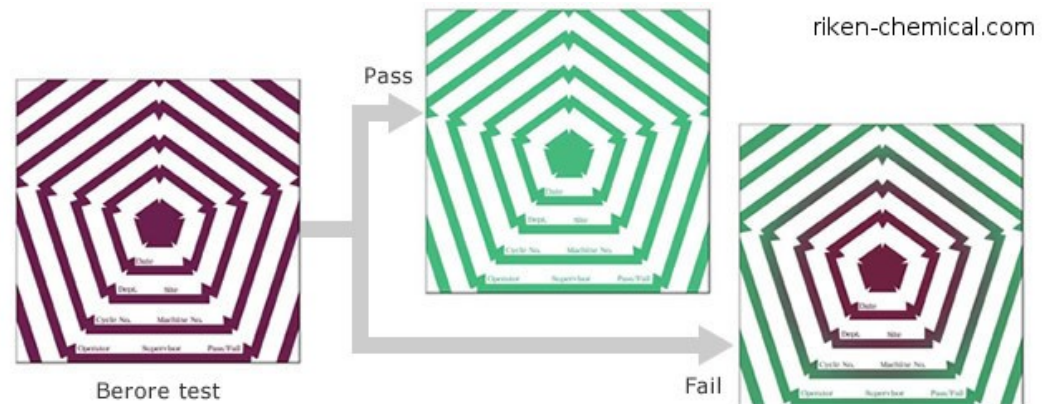
- **radiační**
 - **využití γ -záření** v dávce minimálně 25 kGy
 - používá se pro sterilizaci **nových výrobků**, hlavně lékařských předmětů pro jedno použití z plastických hmot, textilie apod.
- **ohněm** (mikrobiologické klíčky, odpady)
- tlakem (paskalizace, 6000 bar, potravinářství)
- ostatní: frakcionovaná sterilizace, filtrace, ...

Chemická sterilizace

- pro **termolabilní materiál**, který nelze sterilizovat fyzikálními způsoby sterilizace
- **sterilizačním médiem jsou plyny** předepsaného složení a koncentrace a sterilizace probíhá za stanoveného přetlaku nebo podtlaku a teplotě **do 80 °C**
- **páry formaldehydu** nebo **ethylenoxidu**

Kontrola účinnosti dekontaminace

- **orientačně** (smyslově) – charakteristický zápach
- **stanovení skutečné koncentrace** dezinfekčních prostředků (chemická analýza)
- **chemická kontrola sterilizace** (využití indikátorů; např. Bowie-Dick test – test správného odvzdušnění a průniku páry)
- **biologická kontrola – využití spor odolných kmenů** rodů *Bacillus* nebo *Geobacillus* (*B. atropheus*, *G. stearothermophilus*)



Úkol 10: Vliv různých faktorů na růst a přežití bakterií

- **úkol 10a: vliv teploty na bakterie** (posudte, které případy jsou inhibice růstu a které usmrcení bakterií)
- **úkol 10b: vliv dezinfekčního činidla na bakterie** (určete minimální baktericidní koncentraci daného dezinfekčního činidla)
- **úkol 10c: vliv času v kombinaci s teplotou** (sterilizace při dané teplotě po daný čas)

Úkol 11 a 12: Výběr vhodného dezinfekčního činidla; kontrola účinnosti dezinfekce

- úkol 11: popište různé situace a použité dezinfekční prostředky do tabulky
- úkol 12a: zkontrolujte účinnost horkovzdušného sterilizátoru a rozhodněte, zda je možné ho používat
- úkol 12b: zapište si místo stěru z prostředí a jeho (ne)sterilitu

Čeľed' *Enterobacteriaceae*

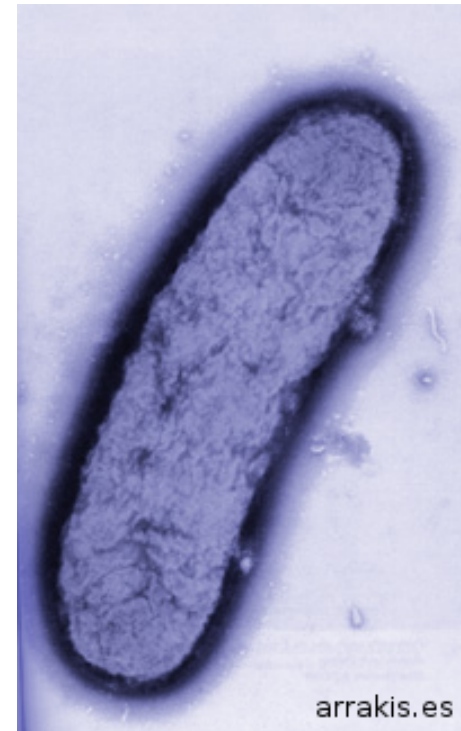
- **G- tyčky, většinou pohyblivé** (kromě shigel, klebsiel a *Y. pestis*),
- **OXI-** (KAT+), **biochemicky značně aktivní**
- komezálové, saprofyty, patogeny střevní i mimostřevní (obligátní i oportunní patogeny)
- **klinicky nejdůležitější čeľed' G- tyček**

Čeď *Enterobacteriaceae*: patogeny

- způsobující **celkové (systémové) infekce**:
 - ***Yersinia pestis*** (mor)
 - **antropopatogenní serovary salmonel** (sérovary Typhi, Paratyphi A, B a C – břišní tyfus)
- obligátní patogeny způsobující zpravidla **střevní infekce**:
 - **zoopatogenní serovary salmonel** (sérovary Enteritidis, Typhimurium – salmonelózy)
 - **shigely, *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis***
- **podmíněně patogenní** enterobakterie:
 - rody *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Serratia*, *Enterobacter*, ...

Yersinia pestis

- **původce moru**
- přenašeč: **blecha morová** (*Xenopsylla cheopsis*)
- zdroj: krysy, potkani a jiní hlodavci
- formy onemocnění:
 - **dýmějový (bubonický) mor**
 - **plicní forma**
 - **septická forma**



Dýmějový (bubonický) mor



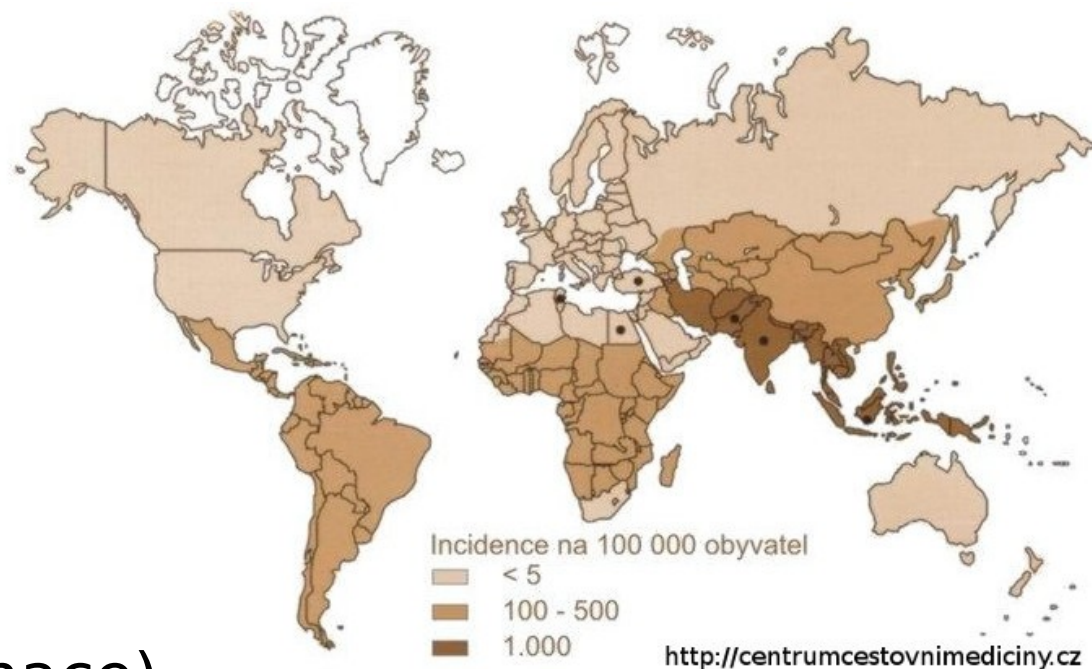
bubon (zvětšená uzlina) v podpaží



hemoragie a srážení krve →
odtud označení černá smrt

Antropopatogenní salmonely

- ***S. enterica* spp. *enterica*** sérovary **Typhi** a **Paratyphi**
- septická onemocnění **břišní tyfus/paratyfus**
- vstupní branou je trávicí trakt (kontaminovaná voda) → inkubační doba 10–14 dní → primární bakteriémie, vysoké teploty, silné bolesti hlavy
- ***S. Typhi***
 - antigeny O: **9, 12**
 - antigeny H: **d**
 - antigeny pouzdra: **Vi**
- Widalova reakce (aglutinace)



Zoopatogenní salmonely

- ***S. enterica* spp. *enterica*** sérovary **Enteritidis, Typhimurium**, aj.
- fekálně-orální přenos – kontaminované potraviny (zejména **vejce**, syrové drůbeží a vepřové maso)
- **salmonelózy (průjmy bez krve**, horečka, zvracení, u oslabených jedinců možná sepse)
- **vysoká infekční dávka** (cca 10^5 - 10^8 bakterií) = nutnost pomnožit se v nějaké potravíně
- ***S. Enteritidis***
 - **antigeny O: 1, 9, 12**
 - **antigeny H: g, m**

Rod *Shigella*

- *Shigella dysenteriae*, *S. flexneri*, ...
- fekálně-orální přenos, typická nemoc „špinavých rukou“, možný i alimentární přenos (voda, mléko, ...)
- **shigelóza = bacilární úplavice/dysenterie (průjmy s krví a hlenem, horečka, křeče v břiše, zvracení)**
- **nízká infekční dávka** (cca 10^2 bakterií)

Escherichia coli

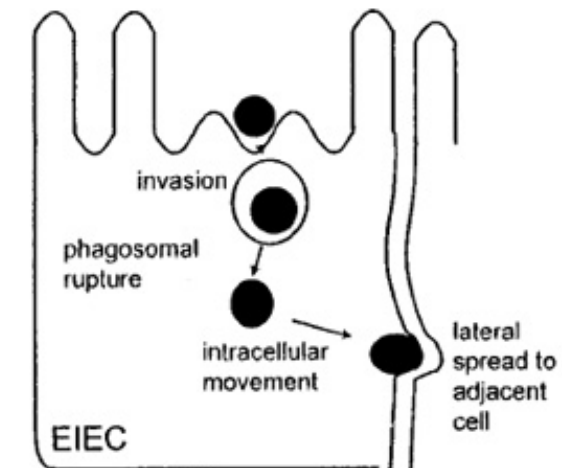
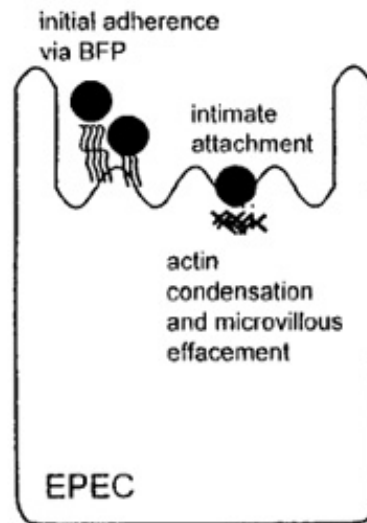
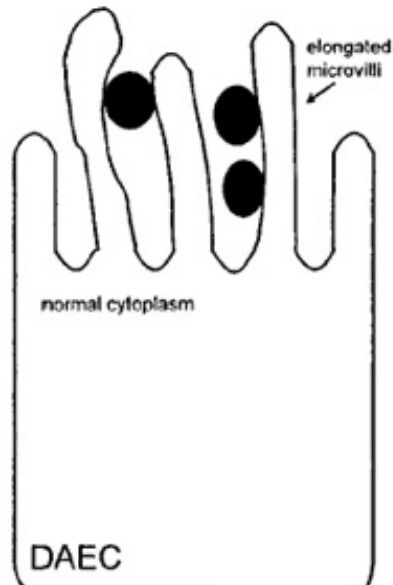
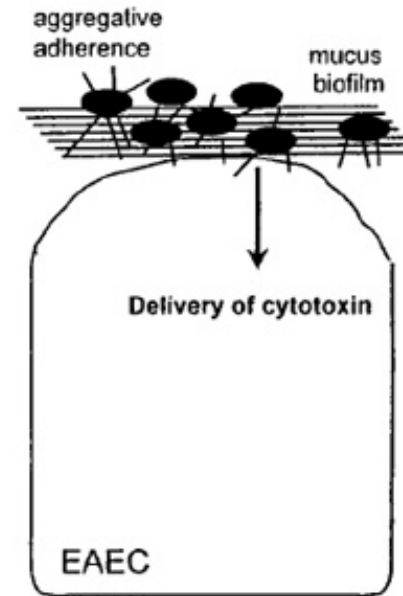
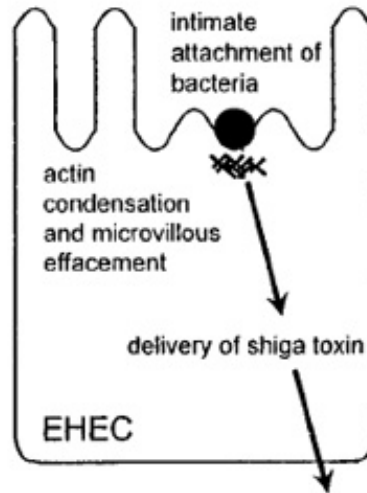
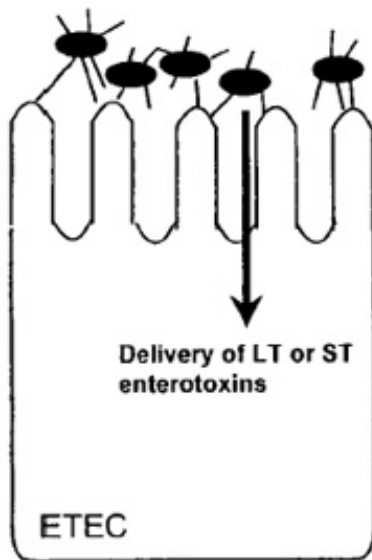
- **důležitá součást střevní mikroflóry** (produkce kolicinů a mikrocínů), omezuje kolonizaci střeva jinými bakteriemi
- **patogeny ve střevě:**
 - **EPEC** (enteropatogenní EC) – novorozenecké průjmy
 - **ETEC** (enterotoxigenní EC) – průjmy (cestovatelské)
 - **EIEC** (enteroinvazivní EC) – krvavé průjmy
 - **EHEC = STEC** (enterohemoragické, shiga-like toxigenní EC) – **hemolyticko-uremický syndrom** (průjem, zvracení, horečka, následuje anémie, petechie, ... až selhání ledvin a neurologické příznaky)
 - zejména **sérotyp O157:H7** (dále **O26**, O55, O111)
 - **nízká infekční dávka** (< 50 bakterií)

Escherichia coli (2)

- **patogeny ve střevě:**
 - **EAEC** (enteroagregativní EC) – cestovatelské průjmy
 - **DAEC** (difúzně-adherentní EC) – cestovatelské vodnaté průjmy se zvracením
- **patogeny mimo střevo:**
 - **UPEC** (uropatogenní EC)
 - kmeny způsobující respirační infekce, sepse, infekce ran, novorozenecké meningitidy...
- epidemie v Německu 2011 (EAEC **O104:H4**), která získala geny pro shiga toxin od STEC horizontálním přenosem)

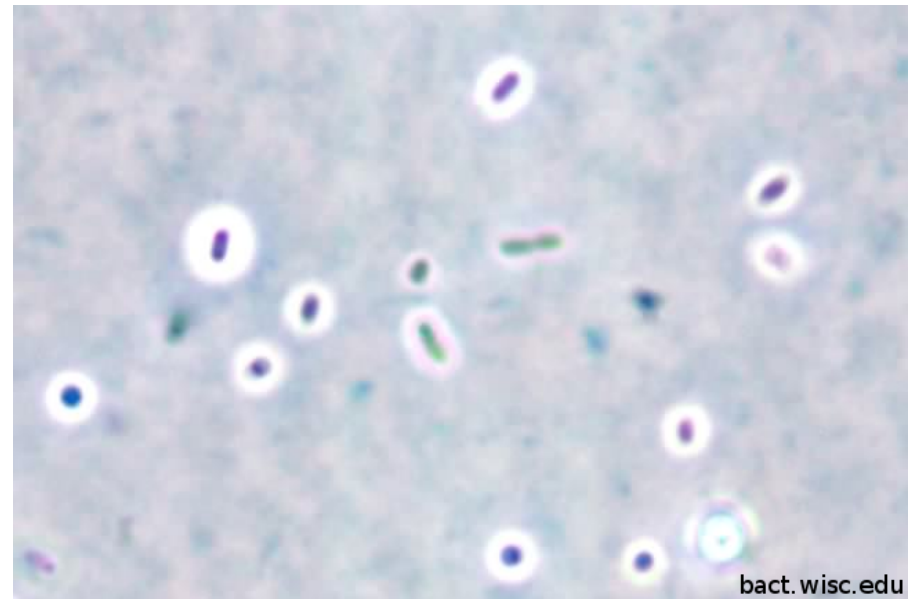
Escherichia coli (3)

microbewiki.kenyon.edu



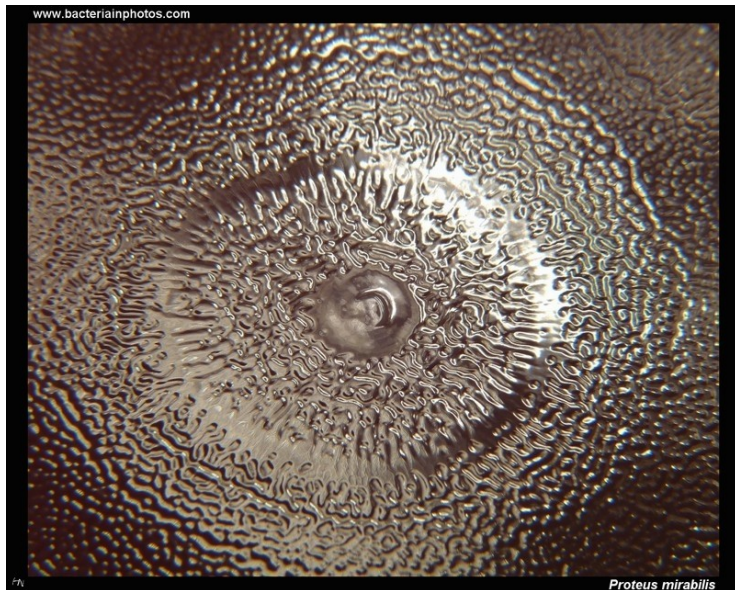
Rod *Klebsiella*

- opouzdřené bakterie
- ***Klebsiella pneumoniae***, *K. oxytoca*, *K. ozaenae*
- **nozokomiální patogeny**
 - infekce močových cest
 - pneumonie, sepse



Rod *Proteus*

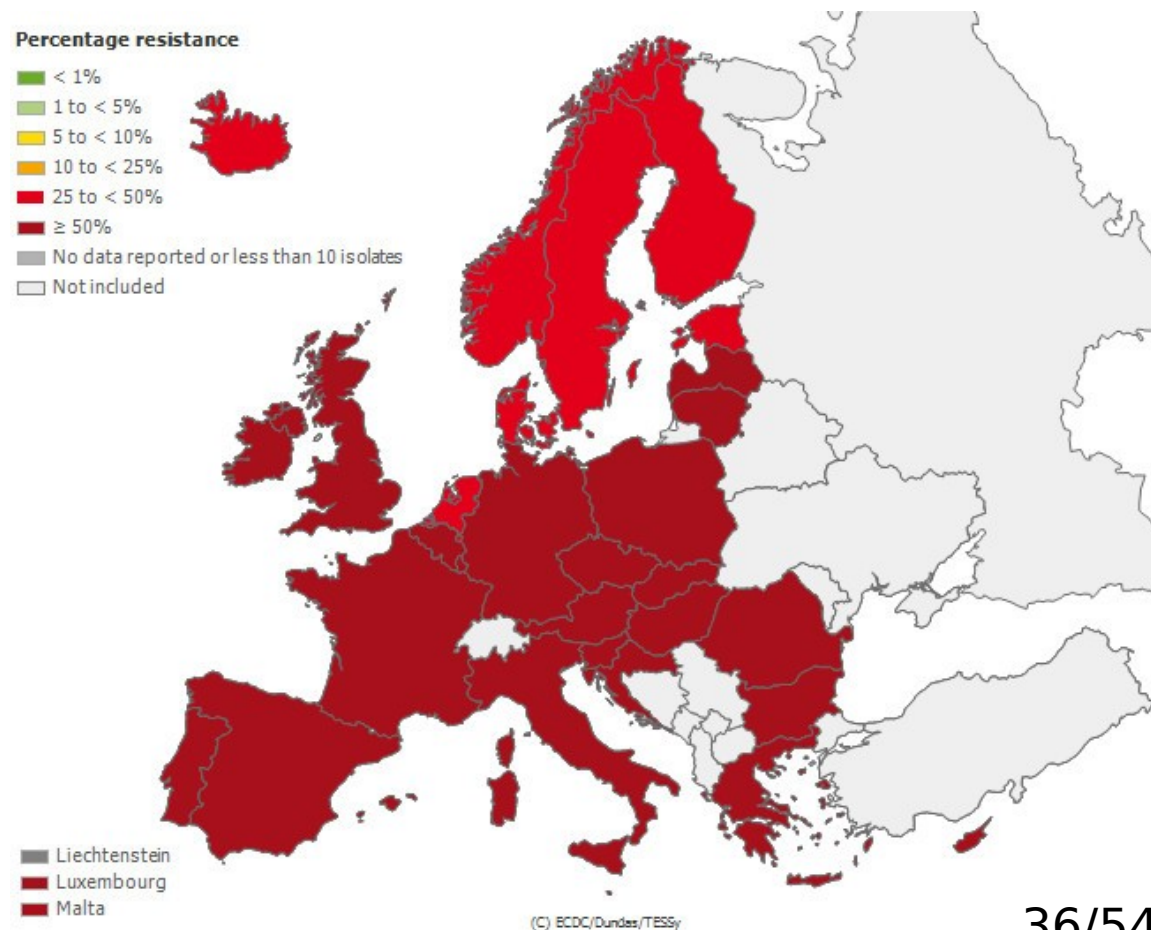
- *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*
- **původci močových infekcí**
- typický je **plazivý růst** (tj. neroste jen v místě inokulace, ale šíří se po povrchu agaru do stran), tzv. Raussův fenomén či fenomén příbojové vlny



Multirezistentní enterobakterie

- rezistence na větší množství antibiotik
- častí producenti širokospektrých betalaktamáz typu **ESBL** popř. **ampC**

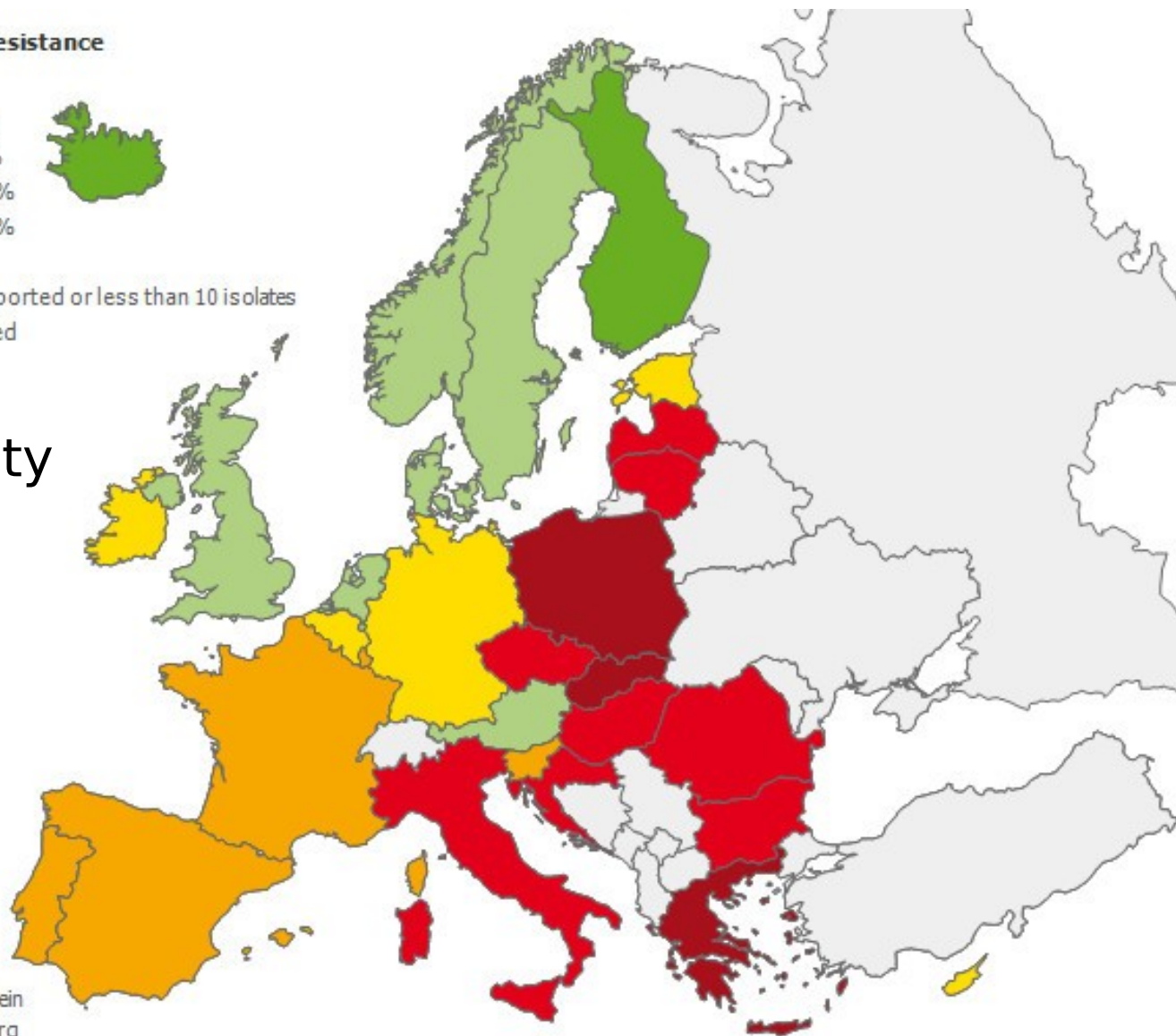
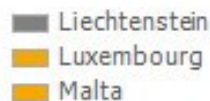
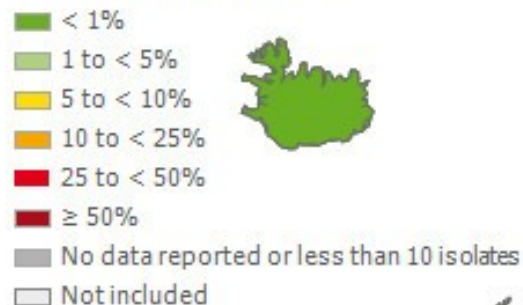
Izoláty *E. coli*
rezistentní
k aminopenicilinům,
rok 2013



Multirezistentní enterobakterie (2)

Multirezistentní izoláty *K. pneumoniae*, rezistence ke 3. gen. cefalosporinů, fluorochinolonům a aminoglykosidům, rok 2013

Percentage resistance



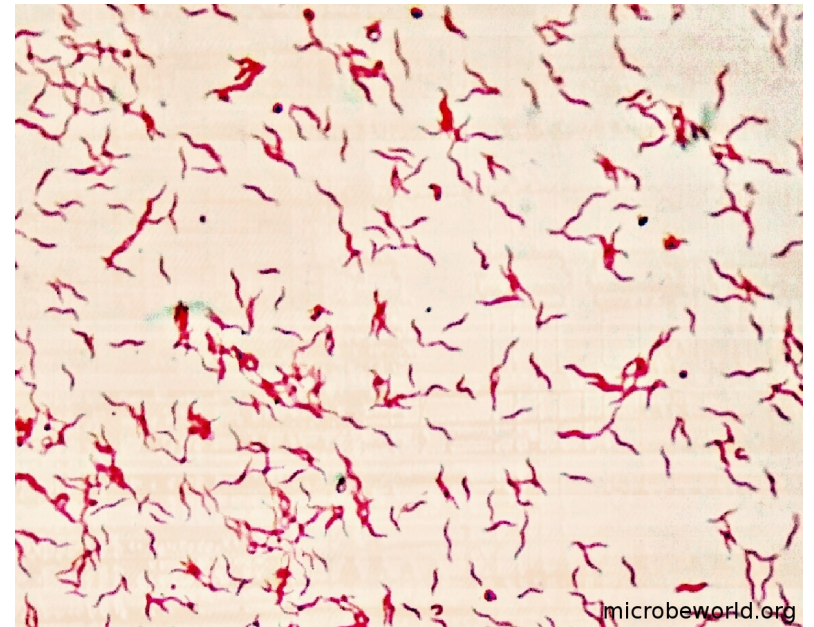
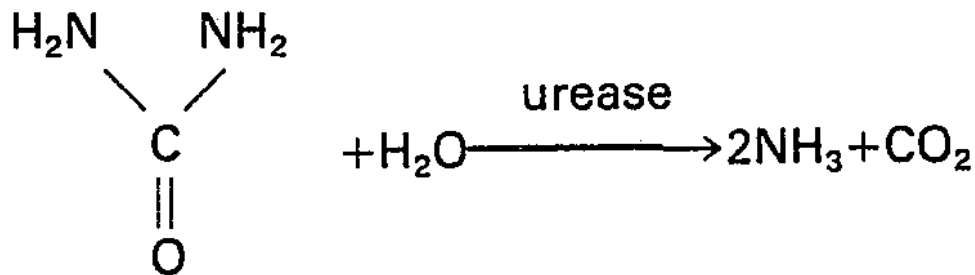
Campylobacter jejuni

- **G- zahnutá tyčka** (nepatří mezi enterobakterie), OXI+
- **kampylobakterióza** - průběh a závažnost onemocnění srovnatelná se salmonelózou (nebývá zvracení)
- fekálně-orální přenos – kontaminované potraviny (zejména **drůbeží maso**)
- **speciální kultivace** (viz úkol č. 7):
 - černá „půda pro kampylobaktery“ (CCDA - charcoal-cefoperazone-deoxycholate agar); neroste na KA a ENDO
 - teplota 42 °C
 - zvýšená tenze CO₂
 - prodloužená kultivace na 48 hodin



Helicobacter pylori

- **G- zahnutá (spirálovitá) tyčka** (nepatří mezi enterobakterie)
- v žaludku → mohutnou **ureázovou aktivitou** si upravuje mikroprostředí (využití pro dg.)
- podíl na vzniku **gastroduodenálních vředů**
- speciální půda (kultivace 5 dní)



Čeľad: *Vibrionaceae*

- **G- krátké zakřivené tyčky**, pohyblivé, **OXI+**
- ve vodě v teplých oblastech
- ***Vibrio cholerae* - cholera** (těžké průjmové onemocnění, zvracení), **sérotypy O1 a O139**
- **halofilní vibria:**
 - *V. parahaemolyticus*
(gastroenteritis, krvavé průjmy)
 - *V. vulnificus*
(infekce ran, sepse)



Diferenciální diagnostika

- **Gramovo barvení** pro odlišení G- tyček
- **ENDO:** z klinicky významných rostou enterobakterie, *Vibrionaceae* a G- nefermentující tyčky (GNFB; praktikum P06)
- **Hajnova půda** pro odlišení GNFB (vše negativní)
- **Oxidáza** pro odlišení vibrií (pozor, některé GNFB mohou mít také pozitivní oxidázu; rod *Plesiomonas* má také pozitivní oxidázu, ačkoliv patří do čeledi *Enterobacteriaceae*)

Rozlišení enterobakterií

- **ENDO**: možné **orientační rozlišení** obligátních patogenů (většinou L-) a potenciálních patogenů (většinou L+)
- další půdy:
 - **XLD** (**salmonely černé**, **shigely růžové**, ostatní enterobakterie žluté, G+ bakterie jsou inhibovány)
 - **MAL**, Deoxycholát-citrátový (DC) agar (obě půdy podobné XLD, určené pro enterobakterie)
 - **CIN** pro yersinie
- **biochemické testy** (Hajna, MIU, ENTEROtesty aj.)
- **antigenní analýza** (zpravidla sklíčková aglutinace)

Úkol 1: Mikroskopie kmenů

- **obarvěte podle Grama sedm kmenů** (kromě kmenu N, ten je pro Vás již obarven)
- jeden z kmenů bude G+, výsledek si poznamenejte, dále už s ním ale nebudeme pracovat

Úkol 2: Kultivace na KA a ENDO

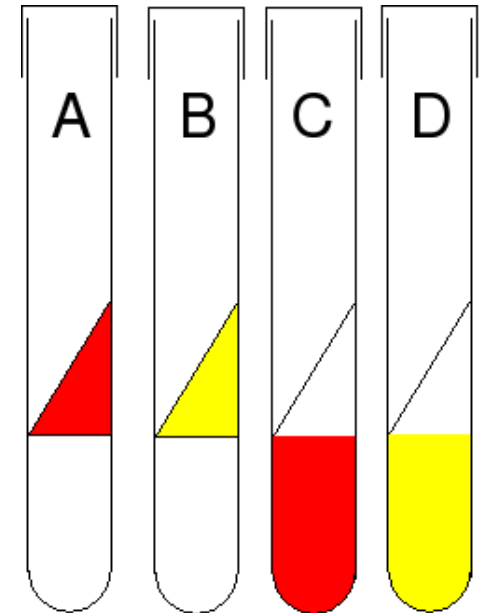
- popište **kolonie na KA a ENDO**
- na KA můžete vidět hemolýzu, není ale důležitá pro diagnostiku
- nezapomeňte že **L+ kmeny mají** nejen **červené** (též růžovočervené nebo kovový lesk) **kolonie, ale i okolní půdu** (jinak je to jen pigment)
- kmeny, které **nerostou ani na jedné z půd** a morfologicky se jeví jako **zahnuté** mohou být **kampylobakter**
 - tyčky, které nejsou zahnuté budou probírány až v dalším z praktik

Úkol 3: Skupinová dg. G- tyček rostoucích na ENDO

- **úkol 3a: Hajna** – pátráme po **GNFB, biochemicky neaktivním kmenu** (tj. **celá půda je červená**), pokud je půda žlutá, tvoří kmen fermentuje Glc nebo Lac, pokud je černá, pak kmen tvoří sirovodík
- **úkol 3b: Oxidáza** – pro odlišení **vibrií (OXI+)** a enterobakterií (OXI-), GNFB mohou být OXI+ i OXI-

Úkol 3: Skupinová dg. G- tyček rostoucích na ENDO - HAJNA

- **Hajnova půda** (Kligler's Iron Agar, KIA)
 - štěpení **laktózy** (A = NEG, B = POZ)
 - štěpení **glukózy** (C = NEG, D = POZ)
 - produkce **H₂S** (POZ = zčernání půdy)
 - tvorba **plynu** (POZ = potrhaná půda, bublinky, půda vysunutá nahoru)
- očkování vpichem a tzv. hádkem



fr.wikipedia.org



Úkol 4: Další kultivační a biochemické testy

- **úkol 4a: popište kmeny na XLD (salmonely mají bledé kolonie s černým středem) a dalších selektivních půdách**



- **úkol 4b: ENTEROtest 16 (17 reakcí: 1. je ONPG, 2. až 9. jsou v prvním řádku, 10. až 17. ve druhém řádku)**

Úkol 5: Antigenní analýza

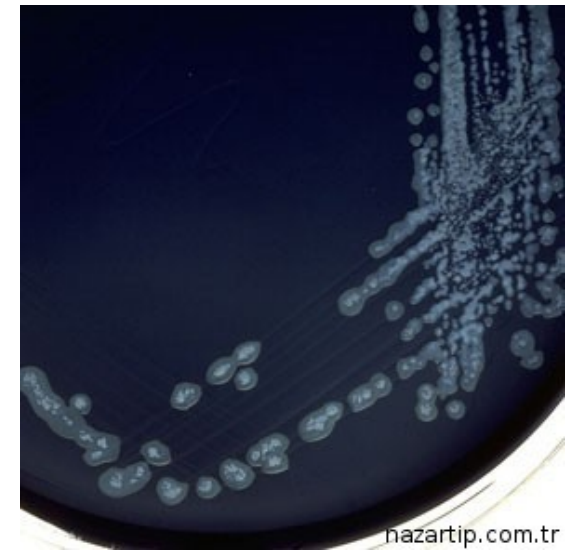
- **úkol 5a: vyloučení EPEC** (sklíčková aglutinace se dvěma polyvalentními séry)
 - pro detekci 12 serovarů EPEC **nonavalentní sérum** (I, II, III) a **trivalentní sérum** (IV)
 - pokud je jedno z nich pozitivní, pokračujeme s příslušnými trivalentními resp. monovalentními séry
 - **neužívá se vždy**, obyčejně však u obligátních patogenů (salmonely, shigely, yersinie) a u střevních izolátů *E. coli* při podezření na EPEC (děti do 3 let) nebo STEC
- **úkol 5b: určení sérovaru salmonely** (sklíčková aglutinace se dvěma séry, **obě musí být pozitivní**;
S. Enteritidis pozitivní tělový antigen 9, bičíkový g, m)

Úkol 6: test citlivosti na ATB

- antibiotická citlivost se **neurčuje u kmenů ze stolice** (u bakteriálních průjmů podání ATB prodlužuje dobu vylučování patogenů ze střeva, doporučují se probiotika)
- antibiotická citlivost se **určuje u kmenů z moče**
 - spektrum testovaných ATB zahrnuje i léky používané při léčbě močových infekcí (např. nitrofurantoin)

Úkol 7: Dg. kampylobakterů

- **speciální kultivace:**
 - **černá „půda pro kampylobaktery“** (CCDA - charcoal-cefoperazone-deoxycholate agar);
neroste na KA a ENDO
 - **teplota 42 °C**
 - **zvýšená tenze CO₂**
 - **prodloužená kultivace na 48 hod**
- **OXI+** (typicky opožděná pozitivita)



Úkol 8: Ureázový test v diagnostice helikobakterů

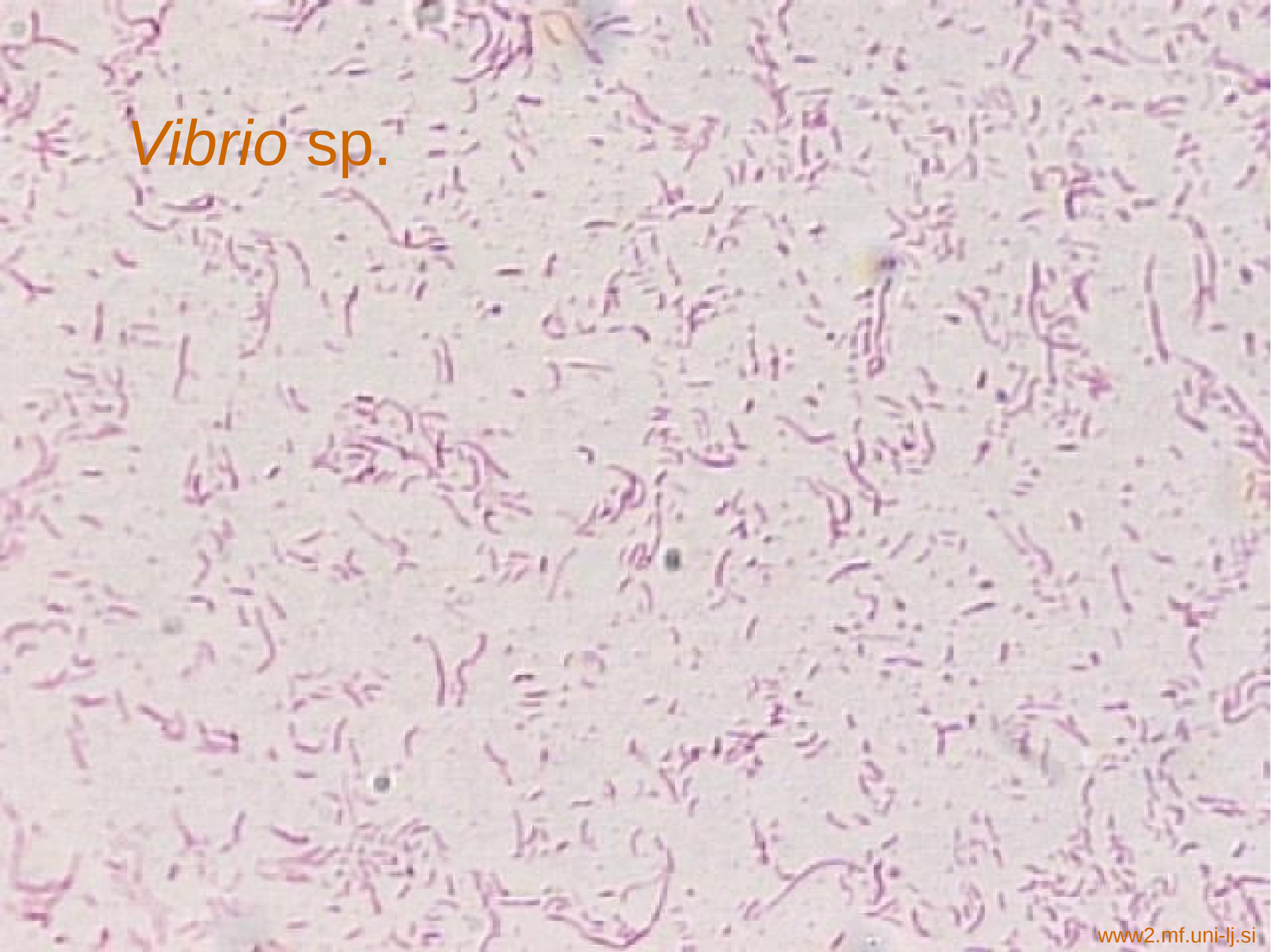
- helikobaktery nerostou na běžných půdách (mají speciální půdu, kultivace 5 dní)
- využívá se štěpení urey (ureázová aktivita je tak silná, že můžeme pracovat přímo s odebraným vzorkem (žaludeční tkáň))
- **POZ = červená**
- **NEG = žlutá**



Úkol 9: Dg. čeledi *Vibrionaceae*

- mikroskopicky zahnutá tyčka
- kultivace:
 - pomnožení v **alkalické peptonové vodě**
 - pevná půda **TCŽS** (thiosíran-citrát-žluč-sacharóza)
- pro biochemickou identifikaci můžeme použít sadu ENTEROtest 16, ale s jinou maticí
- antigenní analýza: **sérovary O1 a O139**
- další biochemické testování sérovaru O1 (**biovary Classic a El Tor**)

Vibrio sp.



Po tomto cvičení byste měli umět:

- správně použít dekontaminační metody (dezinfekce, vyšší stupeň dezinfekce, sterilizace) pro různé druhy materiálů a situací
- správně si mýt a dezinfikovat ruce
- popsat nejdůležitější zástupce čeledí *Enterobacteriaceae* a *Vibrionaceae* a rodů *Campylobacter* a *Helicobacter* vč. diagnostických postupů, které vedou k úspěšné identifikaci
- posoudit, kdy je vhodné využít antigenní analýzu
- jmenovat klinicky nejdůležitější sérovary salmonel, escherichií a vibrií