

ZHODNOCENÍ METOD, POSTUPŮ A ÚČINNOSTÍ STERILAČNÍCH TECHNIK ZDRAVOTNICKÝCH MATERIÁLŮ

Bakalářská práce

Studijní program: B3944 – Biomedicínská technika
Studijní obor: 3901R032 – Biomedicínská technika

Autor práce: **Vendula Mašková**
Vedoucí práce: Ing. Lucie Křiklavová, Ph.D.





TECHNICAL UNIVERSITY OF LIBEREC
Institute of Health Studies



EVALUATION OF METHODS, PROCEDURES AND EFFECTIVENESS OF STERILIZATION TECHNIQUES OF MEDICAL MATERIAL

Bachelor thesis

Study programme: B3944 – Biomedical Technology
Study branch: 3901R032 – Biomedical Technology
Author: **Vendula Mašková**
Supervisor: Ing. Lucie Kříklavová, Ph.D.



ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Vendula Mašková**
Osobní číslo: **Z12000010**
Studijní program: **B3944 Biomedicínská technika**
Studijní obor: **Biomedicínská technika**
Název tématu: **Zhodnocení metod, postupů a účinností sterilačních technik zdravotnických materiálů**
Zadávací katedra: **Ústav zdravotnických studií**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Cíle práce:

Seznámení se s problematikou sterilačních metod a postupů (teplotou, UV zářením, filtrací, chemicky, plazmou).

Vypracování potřebné teorie a zpracování rešerše na dané téma sterilace zdravotnických materiálů.

Zpracování metodiky měření a vyhodnocení vzorků zdravotnických materiálů (obvazů, chirurgických nástrojů, hadiček apod.), které jsou sterilovány danou metodou (po různou dobu, intenzitu apod.).

Teoretická východiska (včetně výstupu z BP):

V laboratoři se budou pozorovat a vyhodnocovat laboratorní experimenty s reálnými mikroorganismy. Součástí práce bude měření fyzikálních, chemických a mikrobiologických parametrů. Obecně známými postupy je dokázáno, že pomocí určitých sterilačních metodik je docíleno daného odstranění/potlačení bakteriálních populací. V poslední době se také velice rozšiřuje pojem plazmatické sterilace. Cílem práce bude ověřit stávající, vyhodnotit nové a případně navrhnout vlastní metodiku sterilace bakteriálních populací, a to v závislosti na daném prostředí či sterilovaném materiálu. Cílem práce bude prověření hypotézy plazmové sterilace

Výzkumné předpoklady:

Hlavní výzkumnou otázkou práce je posouzení současného stavu sterilačních technik a vyhodnocení nových progresivních metod sterilace, a to při hodnocení účinků sterilace různorodého zdravotnického materiálu (obvazy, chirurgické nástroje, katetry, aj.). Dosažené výsledky, které budou samostatně v laboratoři změřeny, budou porovnány s literaturou (dle odborné literatury viz níže a dalších vhodných literárních zdrojů).

Metoda:

Kvantitativní

Technika práce, vyhodnocení dat:

Empiricky se bude pozorovat dané měření, a experiment se bude vyhodnocovat jak po stránce porovnávacích experimentů (vzorek vystavený působení sterilačních technik v porovnání s kontrolním vzorkem) a dále se provede základní statistické vyhodnocení obou experimentů.

Místo a čas realizace výzkumu:

Práce bude probíhat v laboratořích CxI (budova L), laboratoř biotechnologie/mikrobiologie, a to v měsících prosinec až březen.

Vzorek:

Hodnoceným vzorkem budou bakteriální populace (například *Escherichia Coli* a *Clostridium Perfringens*), kde dané kmeny ne/budou vystaveny působení sterilačních technik.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

50 - 70 stran

Forma zpracování bakalářské práce: tištěná/elektronická

Seznam odborné literatury:

viz příloha

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Lucie Křiklavová, Ph.D.

Ústav nových technologií a aplikované informatiky

Datum zadání bakalářské práce:

30. dubna 2014

Termín odevzdání bakalářské práce:

30. dubna 2015


prof. Dr. Ing. Zdeněk Kůs
rektor




Mgr. Marie Froňková
pověřena vedením ústavu

V Liberci dne 31. ledna 2015

Příloha zadání bakalářské práce

Seznam odborné literatury:

1. CAREY, Roberta. SCHUSTER, Mindy. MCGOWAN, Karin. Lékařská mikrobiologie v klinických případech. 1.vyd. Praha: Triton, 2011. 321 s. ISBN 978-80-7387-480-3
2. PHARMA-REPORTS. Klinicky významné bakterie. 1. Vyd. Praha: Triton, 2012. 123 s. ISBN 978-80-7387-588-6
3. RULÍK, M. a kol. Mikrobiální biofilmy. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2011. 447 s. ISBN 978-80-244-2747-8
4. ADLER, S., SCHERRER, M., & DASCHNER, F. D. (1998). Costs of low-temperature plasma sterilization compared with other sterilization methods. *Journal of Hospital Infection*, 40(2), 125-134. doi:10.1016/S0195-6701(98)90091-3
5. CHAU, T. T., KAO, K. C., BLANK, G., & MADRID, F. (1996). Microwave plasmas for low-temperature dry sterilization. *Biomaterials*, 17(13), 1273-1277. doi:10.1016/S0142-9612(96)80003-2
6. LEROUGE, S. (2012). 1 - Introduction to sterilization: definitions and challenges. In S. Lerouge & A. Simmons (Eds.), *Sterilisation of Biomaterials and Medical Devices* (pp. 1-19). Woodhead Publishing. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781845699321500015>
7. LIU, H., CHEN, J., YANG, L., & ZHOU, Y. (2008). Long-distance oxygen plasma sterilization: Effects and mechanisms. *Applied Surface Science*, 254(6), 1815-1821. doi:10.1016/j.apsusc.2007.07.152
8. MULLANEY, K. (2008). Sterilization and Disinfection in the Operating Room. *Perioperative Nursing Clinics*, 3(2), 127-135. doi:10.1016/j.cpen.2008.02.001
9. ROGERS, W. J. (2013). 4 - The effects of sterilization on medical materials and welded devices. In Y. Zhou & M. D. Breyen (Eds.), *Joining and Assembly of Medical Materials and Devices* (pp. 79-130). Woodhead Publishing. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781845695774500041>
10. RUTALA, W. A., & WEBER, D. J. (2011). Sterilization, High-Level Disinfection, and Environmental Cleaning. *Infectious Disease Clinics of North America*, 25(1), 45-76. doi:10.1016/j.idc.2010.11.009
11. SHALABY, S. W., NAGATOMI, S. D., & POWELL, E. F. (2013). 6 - Sterilization



Prohlášení

Byla jsem seznámena s tím, že na mou bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci (TUL) nezasahuje do mých autorských práv užitím mé bakalářské práce pro vnitřní potřebu TUL.

Užiji-li bakalářskou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědoma povinnosti informovat o této skutečnosti TUL; v tomto případě má TUL právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím mé bakalářské práce a konzultantem.

Současně čestně prohlašuji, že tištěná verze práce se shoduje s elektronickou verzí, vloženou do IS STAG.

Datum: 30.4.2015

Podpis: Markéta Hendllová

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala Ing. Lucii Křiklavové, Ph.D. za vedení bakalářské práce, připomínky a pomoc při zpracování dané problematiky. Dále bych chtěla poděkovat Haně Řehákové za pomoc při experimentech a přínosné rady během zpracování práce. V neposlední řadě děkuji Bc. Halině Doležalové za možnost provést jeden z experimentů na Sterilizačním centru v Krajské nemocnici Liberec, poskytnutí cenných rad a vstřícný přístup. Na závěr bych chtěla poděkovat rodině a blízkým za podporu po celou dobu mého studia na Technické univerzitě v Liberci.

Anotace v českém jazyce

Jméno a příjmení autora: Vendula Mašková

Instituce: Technická univerzita v Liberci, Ústav zdravotnických studií

Název práce: Zhodnocení metod a účinností sterilačních technik zdravotnických materiálů

Vedoucí práce: Ing. Lucie Křiklavová, Ph.D.

Počet stran: 67

Počet příloh: 1

Rok obhajoby: 2015

Souhrn: Cílem této bakalářské práce bylo ověřit a zhodnotit účinnost dostupných sterilačních metod a technik používaných ve zdravotnictví. Zkoumané metody jsme podrobily zkoušce, za účelem likvidace bakteriální populace bez použití mechanické očisty. Dalším cílem práce bylo navrhnout novou metodu sterilizace materiálů za pomoci elektromagnetického pole, a to na základě zjištění negativního působení na vybrané mikroorganismy (*Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa*). Jedním z vyhovujících typů elektromagnetického záření je mikrovlnné záření. Výsledek této bakalářské práce potvrdil možnost využití mikrovlnného záření jako vhodnou a vysoce účinnou metodu sterilizace.

Klíčová slova: Sterilizace, dezinfekce, dekontaminace, bakterie, bioindikátory, mikrovlnné záření

Anotace v anglickém jazyce

Name and surname: Vendula Mašková

Institution: Technical university of Liberec, Institute of Health Studies

Title: Evaluation of methods, procedures and effectiveness of sterilization techniques of medical materials

Supervisor: Ing. Lucie Křiklavová, Ph.D.

Pages: 67

Appendix: 1

Year: 2015

Summary: The aim of the bachelor thesis was to verify and evaluate the effectiveness of available sterilization methods and techniques used in health care. Research methods were subjected to the tests for the purpose of liquidation of bacterial population without using a mechanical cleaning. Another aim was to propose new sterilization method of material with the aid of electromagnetic field on the basis of negative effects on microorganism (*Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*) One of the complying type of electromagnetic radiation is a microwave radiation. The result of this bachelor thesis confirms a opportunity of using the microwave field as a suitable and very effective method of sterilization.

Key words: sterilization, disinfection, decontamination, bacteria, bioindicator, microwave radiation

Seznam použitých zkratek

AHEM	Acta hygienica et media
apod.	a podobně
atd.	a tak dále
BD	Bowie – Dick
BTK	Bezpečnostně technické kontroly
C ₂ H ₅ OH	Ethanol
č.	Číslo
ČSN	Česká státní norma
EN	Evropská norma
EKG	Elektrokardiogram
H ₂ O ₂	Peroxid vodíku
ISO	Označení norem převzatých od ISO (International organization of standardization)
McF	McFarland – jednotka optické hustoty
PCA	Plate count agar
SAL	Sterility assurance level
TAED	Tetraacetylethylendiamin
tj.	to je
UV	Ultrafialové záření

Obsah

1.	ÚVOD	17
	TEORETICKÁ ČÁST	18
2.	Vymezení pojmů	18
2.1	Sterilizace	18
2.2	Dezinfekce	18
2.2.1	Persteril	18
2.2.2	Chirosan plus	18
2.3	Sterilní materiál	19
2.4	Aseptická práce	19
2.5	Neaseptická práce	19
3.	Druhy sterilizace	20
3.1	Fyzikální	20
3.1.1	Parní sterilizace	20
3.1.1	Horkovzdušná sterilizace	21
3.1.2	Radiační sterilizace	22
3.1.3	UV záření	22
3.1.4	Sterilizace plazmou	22
3.1.5	Ultrazvuk	23
3.1.6	Mikrovlnné záření	23
3.2	Chemická	23
3.2.1	Sterilizace Formaldehydem	23
3.2.2	Sterilizace Etylenoxidem	24
4.	Předsterilizační příprava	25
4.1	Dekontaminace	25
4.2	Sterilizační boxy	26

4.3	Centrální sterilizace.....	26
5.	Zkoušky sterilizační účinnosti	27
5.1	Bioindikátory.....	27
5.1.1	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	27
5.1.2	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus atrophaeus</i>	28
5.1.3	Postup testování.....	28
5.2	Nebiologické/chemické testy	30
5.2.1	Dutinový test	31
5.2.2	Bowie – Dick test	31
5.3	Fyzikální testy	32
5.3.1	Vakuový test.....	32
5.3.2	Teplotní test.....	32
6.	Bezpečnostně technické kontroly	33
7.	Validace	34
7.1	Instalační kvalifikace (IQ).....	34
7.2	Provozní kvalifikace (QQ)	34
7.3	Funkční kvalifikace (PQ)	34
8.	Bakterie	35
8.1	<i>Escherichia coli</i>	35
8.2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	36
	PRAKTICKÁ ČÁST.....	38
1.	Materiály a metody	38
1.1	Materiály k testování sterilizačních postupů.....	39
1.2	Živné půdy	40
1.2.1	Soyabean Casein Digest Medium.....	40
1.2.2	Fyziologický roztok.....	41
1.2.3	Tergitol 7	41

1.2.4	Plate count agar without dextrose	41
1.2.5	CN agar.....	42
1.2.6	STE Dulab 500-S.....	42
1.2.7	SUB Dulab	43
1.3	Použité bakteriální kmeny	43
1.4	Příprava inokula	44
2.	Výsledky a diskuze	45
2.1	Předsterilizační příprava.....	45
2.1.1	Příprava vzorků	45
2.1.2	Použití denaturovaného Ethanolu.....	46
2.1.3	Dezinfekce Desident [®] CaviCide	46
2.1.4	Mikrovlnné záření	46
2.1.5	Germicidní UV záření	47
2.1.6	Kultivace vzorků	47
2.1.7	Hodnocení vzorků	47
2.1.8	Zhodnocení výsledků	53
2.1.9	Sumarizace výsledků.....	54
2.2	Sterilizace	56
2.2.1	Předsterilizační dekontaminace	56
2.2.2	Testy sterilizátorů	56
2.2.3	Příprava vzorků	58
2.2.4	Kultivace vzorků	58
2.2.5	Vyhodnocení výsledků	58
2.3	Likvidace odpadu	60
3.	Závěr	61
	Seznam literatury	63

Seznam obrázků

Obrázek 1: : Křivka sytosti páry	21
Obrázek 2: Ultrazvukový přístroj na mytí nástrojů	25
Obrázek 3: Bioindikátor ve sterilizačním obalu	28
Obrázek 4: Testovací kontejner připravený ke sterilizaci.....	29
Obrázek 5: Kultivační inkubátor s testery.....	30
Obrázek 6: Typy nebiologických indikátorů	30
Obrázek 7: Testovací proužky s přípravkem pro dutinový test	31
Obrázek 8: Bakterie <i>E. coli</i>	36
Obrázek 9: Bakterie <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	37
Obrázek 10: Vyočkování vzorků <i>E. coli</i> na Tergitol 7	47
Obrázek 11: Vyočkování <i>P.aeruginosa</i> na CN agar.....	48
Obrázek 12: Vyhodnocení bioindikátoru z přístroje PS 20/A Z020.....	56
Obrázek 13: Vyhodnocení bioindikátoru z přístroje HS 62 A.....	57

Seznam tabulek a grafů

Tabulka 1: Závislost doby expozice na teplotě	21
Tabulka 2: Závislost počtu testerů na objemu sterilizační komory	28
Tabulka 3: Optická hustota Densi-la-meter II.....	44
Tabulka 4: Výsledky dekontaminace gázy <i>E. coli</i>	49
Tabulka 5: Výsledky dekontaminace skleněné tyčinky <i>E. coli</i>	49
Tabulka 6: Výsledky dekontaminace silikonové hadičky <i>E. coli</i>	50
Tabulka 7: Výsledky dekontaminace EKG elektrody <i>E. coli</i>	50
Tabulka 8: Výsledky dekontaminace gázy <i>P. aeruginosa</i>	51
Tabulka 9: Výsledky dekontaminace silikonové hadičky <i>P.aeruginosa</i>	52
Tabulka 10: Výsledky dekontaminace skleněných tyčinek <i>P. aeruginosa</i>	52
Tabulka 11: Výsledky dekontaminace EKG elektrod <i>P. aeruginosa</i>	53
Tabulka 12: Sumarizace výsledků kontaminace <i>E.coli</i>	54
Tabulka 13: Sumarizace výsledků kontaminace <i>P.aeruginosa</i>	55
Tabulka 14: Výsledky sterilizace Navažovací lžička <i>E.coli</i>	58
Tabulka 15: Výsledky sterilizace EKG elektrody <i>E.coli</i>	59
Tabulka 16: Výsledky sterilizace Navažovací lžička <i>P.aeruginosa</i>	59
Tabulka 17: Výsledky sterilizace EKG elektrody <i>P.aeruginosa</i>	59

Graf 1: Pozitivní růst <i>E.coli</i> na vzorcích.....	54
Graf 2: Pozitivní růst <i>P.aeruginosa</i> na vzorcích.....	55

1. ÚVOD

Sterilační techniky jsou nedílnou součástí v boji proti přenosným nákazám ve zdravotnictví. Především bakteriální a virová onemocnění způsobují velké problémy pacientům, které mohou ohrozit na životě. Mikroorganismy neustále mutují a vytváří si rezistenci vůči léčebným a dekontaminačním přípravkům. Proto je velmi důležitá prevence a předcházení jejich výskytu v nemocničním prostředí.

Existuje několik osvědčených typů sterilizace, které se liší typem použití, časem expozice a parametry sterilizačních médií. Mezi nejpoužívanější sterilizační média patří pára a horký vzduch. V poslední době se pro šetrnější sterilizaci termolabilních materiálů volí plazma. Funkce těchto metod je přísně kontrolována a dokumentována. Problém může nastat v uživatelské sféře. Dalšími nedostatky jsou především časová náročnost sterilizačního procesu a vysoká pořizovací cena přístrojů.

V dnešní době jsou kladeny vysoké nároky na urychlení procesů sterilizace, proto by bylo potřeba najít metodu, která je rychlá a zároveň účinná. Na základě předešlých výzkumů (na TUL i v odborné literatuře) vlivu elektromagnetického pole na mikroorganismy byly zjištěny inhibiční až devastující účinky na bakterie. Obecně se ultrafialové záření uplatňuje v dezinfekci povrchů, vysokofrekvenční ultrazvukové vlnění se využívá pro dekontaminační čištění nástrojů, existuje tedy velká pravděpodobnost, že elektromagnetické pole bude mít velký předpoklad jako vhodná, rychlá a levná nová metoda sterilizace.

Cílem práce bylo ověřit všeobecně známé a dostupné techniky sterilizace, jejich účinnost použití na různorodý materiál a zároveň navrhnout využití nových metod s využitím elektromagnetických polí.

Bakalářská práce je rozdělena na dvě části – teoretickou a praktickou. V teoretické části jsou popsány sterilizační metody a postupy sterilizace v praxi běžně používané. Bakalářská práce se též zabývá legislativní úpravou kontrol a validací sterilizačních přístrojů. Praktická část obsahuje zhodnocení účinností sterilizačních a dezinfekčních metod a návrh nové metody, která by byla všeobecně dostupná, rychlá a cenově nenáročná.

TEORETICKÁ ČÁST

2. Vymezení pojmů

2.1 Sterilizace

Sterilizace¹ je proces, který vede ke zničení všech choroboplodných zárodků (viry, bakterie, plísně, spory) v určitém prostředí. Jednorázový zdravotnický materiál se dodává již sterilní, zabalený ve speciálním obalu. Ostatní pomůcky se opakovaně sterilizují schválenými sterilizačními metodami. Sterilizace se řídí předpisem č.306/2012 Sb.[1]

2.2 Dezinfekce

Neoddělitelně patří k procesu sterilizace. Postup, při kterém se likvidují mikroorganismy na daném předmětu či prostředí. Provádí se chemickými prostředky na bázi chloru, jodu, alkoholu, sloučeniny peroxidu atd. Při dezinfekci prádla a lůžkovin se uplatňuje fyzikální dezinfekce tj. praní ve speciálních pračkách nebo parních přístrojích při teplotě vyšší než 90 °C.[1]

2.2.1 Persteril

Dezinfekční přípravek *Persteril* ® 36 je roztok kyseliny peroxyoctové, peroxidu vodíku, kyseliny octové a vody. Oxidací narušuje buněčné membrány a tím způsobuje rozpad buněk. 36 % koncentrace se ředí na 0,5 % roztok tj. 950 ml vody a 50 ml *Persterilu* ® 36. Nástroje se do roztoku ponoří po dobu 15 minut. Další ředění se používají na pokožku (0,2 %), ovzduší sálů (5 %), Textil (0,7 g/l), sterilní boxy (1,2 %).[2]

2.2.2 Chirosan plus

Dezinfekční práškový prostředek je určen k dezinfekci zdravotnických pomůcek a nástrojů. Základem je kyselina peroctová, peroxoboritan sodný, enzymy, TAED. Účinně likviduje viry, bakterie, plísně a spory.[3]

¹ Sterilizace má v lékařství další význam, dá se chápat jako cílené znemožnění reprodukce.

2.3 Sterilní materiál

Za sterilní lze pokládat materiál, který prošel nějakým druhem sterilizace a tím pádem je zbaven všech forem choroboplodných mikroorganismů. Sterilní materiál je balen do speciálních obalů, aby nedošlo k žádné kontaminaci a mohl být následně použit ve zdravotnictví k různým účelům, jako materiál bez životaschopných mikroorganismů.[9]

2.4 Aseptická práce

Komplex opatření znemožňující kontaminaci vzorků, nástrojů a ploch živými mikroorganismy v průběhu lékařských výkonů. Soubor zásad k ochraně zdraví pacientů a zdravotnických pracovníků.

Pro aseptickou práci je velmi důležité dodržovat pravidla a hygienu práce, aby byl přerušen infekční řetězec. Jedním z důvodů přenosu infekčních chorob je nedostatečná hygiena rukou zdravotnického personálu před a po manipulaci se zdravotnickým materiálem. V praxi se používají přípravky, které rychle zničí až 99,9 % mikroorganismů bez nutnosti oplachu vodou (Septoderm gel, Sterilium) [4]

2.5 Neaseptická práce

Nesprávným zacházením s dezinfikovaným materiálem může dojít k opětovné kontaminaci z prostředí. Kůže člověka obsahuje stejný počet bakterií, jako buněk v těle. Některé z nich mohou být v jistých případech patogeny. Nepoužíváním ochranných pomůcek (rukavice, rouška) se mohou tyto bakterie přenést na materiál, který se tím stane nesterilní. Při aplikaci nesterilního materiálu na pacienta může dojít např. k zanesení mikrobů do rány či vyvolání alergické reakce.

3. Druhy sterilizace

Všechny sterilizátory užívané ve zdravotnictví musí splňovat české technické normy. Pro všechny typy sterilizace platí, že Úroveň bezpečné sterility (SAL) musí být menší či rovna 10^{-6} tj. výskyt maximálně jednoho nesterilního předmětu mezi jedním milionem vysterilizovaných předmětů.[5]

3.1 Fyzikální

3.1.1 Parní sterilizace

Provádí se nasycenou vodní párou pod daným tlakem 170 – 300 kPa a rozmezí teploty 115 – 134 °C. Vlastnosti parní sterilizace musí odpovídat fyzikálním zákonům. Se zvyšující se teplotou, tlak páry nad kapalinou roste. Doba je určena charakterem použití od 4 do 60 minut. Vyhláškou č. 306/2012 Sb. je dáno, že sterilizace při teplotě 121 °C (205 kPa) musí trvat nejméně 20 minut a při 134 °C (304 kPa) 10 minut. Pro nebalené kovové nástroje k okamžitému použití lze aplikovat zkrácený sterilizační program o teplotě 134 °C po dobu 4 minut. Zde se využívá odvzdušňovacího tlaku 13 kPa. Celková expozice trvá přibližně hodinu.

Parní sterilizátory se řídí normou ČSN EN 285+A2. Validace sterilizačního procesu se provádí dle normy ČSN EN ISO 17665-1 (85251), která stanovuje požadavky na vývoj, validaci a kontrolu. Požadavky na sterilizační médium a zkoušky parních sterilizátorů biologickými indikátory jsou uvedeny v normě ČSN EN ISO 11138-3 (847111).

Výhodou sterilizace párou je dobrá schopnost pronikat do porézních materiálů. Sterilizační médium je nekarcinogenní a netoxické.

Nasycená pára může vyvolat korozi kovových materiálů. Další nevýhodou je vysoká pořizovací cena sterilizátoru, avšak náklady na jednotlivé sterilizační cykly jsou velmi nízké.[6][7][14]



Bod A – trojný bod, kapalina a sytá pára v rovnováze.

Bod K – kritický bod, vyrovnání hustot kapaliny a páry.

Sterivap 6612 v Krajské nemocnici Liberec disponuje s vlastním vyvíječem páry, který je připojen na předem upravenou vodu.

3.1.1 Horkovzdušná sterilizace

Je prováděna cirkulujícím horkým vzduchem o teplotě 160 – 180 °C. Používá se především na předměty ze skla, keramiky, kovu, porcelánu. Lze ji také použít pro účely sterilizace léků především mastí a prášků. Vyhláška ukládá přesný čas expozice pro danou teplotu.

Tabulka 1: Závislost doby expozice na teplotě

Teplota vzduchu (°C)	Čas (min)
160	60
170	30
180	20

Teplota expozice se upravuje na základě sterilizovaného materiálu. Každý materiál má odlišnou tepelnou vodivost, schopnost vést teplo a předávat ho chladnějším místům (jednotka $\text{W}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$). Čím lepší vodivost, tím rychleji se teplo dostane do celého obsahu sterilizované vsázky.

Negativem této metody je delší expoziční čas. Horký vzduch může poškodit některé typy materiálů např. guma, tkanina či plast.[5]

3.1.2 Radiační sterilizace

Tento druh sterilizace se používá především v průmyslové výrobě. Běžná dávka ozáření je 27 kGy, pro tento účel se užívá radioaktivní kobalt (^{60}Co). Používá se ke sterilizaci nových (případně exspirovaných) předmětů z plastické hmoty, které působením ozáření nezmění svůj vzhled ani vlastnosti. Dále pro textilie, buničinu, šicí materiál, farmaceutické výrobky, radiovaccíny a radioantigeny. [9]

3.1.3 UV záření

Složka elektromagnetického spektra o vlnové délce 400 – 4 nm a frekvenci 10^{15} – 10^{17} Hz. Ultrafialové záření se dělí na UVA (320 – 400 nm), UVB (280 – 320 nm) a UVC (méně než 280 nm).

Největší sterilizační účinek má záření UVC o vlnové délce 250 nm – záření je optimálně absorbováno nukleovými kyselinami mikroorganismů. Tím dojde k jejich narušení a následně k usmrcení. Zdrojem záření jsou germicidní lampy, které se používají ke sterilizaci vzduchu, pracovních ploch a prostor zejména operačních sálů, piteven, odběrových místností.

Primárně se tato metoda využívá ke sterilizaci pracovních ploch a prostorů, jeho účinnost klesá s čtvercem vzdálenosti od ozařovaného místa.

Výhodou jsou nízké pořizovací a provozní náklady, spolehlivost a jednoduchost použití. UV záření lze aplikovat pouze na fotostabilní materiály.

Germicidní lampy se využívají v potravinářství, lázeňství, septických systémech, laboratořích, zdravotnictví atd. [10]

3.1.4 Sterilizace plazmou

Velmi šetrná metoda, která se používá pro termolabilní materiály. Pára Peroxidu vodíku (58 % H_2O_2) se vlivem vysokofrekvenčního elektromagnetického pole rozloží na extrémně malé částice, volné radikály kyslíku – plazma (Ionizovaný plyn složený z iontů, elektronů, jenž vzniká odtržením elektronů z elektronového obalu atomu plynu). Sterilizace probíhá při teplotě přibližně 50 °C.

Hlavní nevýhoda je ve vysoké pořizovací ceně přístroje i spotřebního materiálu. Používají se speciální sterilizační obaly z polypropylenu či umělé hmoty.

Uplatňuje se při sterilizaci endoskopické optiky či katetrů. Nepoužívá se na savé a porézní materiály, jelikož u těchto výrobků je tento typ sterilizace neúčinný. [9]

3.1.5 Ultrazvuk

Principem této techniky je rozrušení buněk pomocí vysokofrekvenčního ultrazvuku a to o frekvenci 25 kHz (20 000 cyklů/s). Ultrazvukové vlivy působí na mikroorganismy několika způsoby.

Akusticko mechanické kmity pronikají do buněk, které začnou rezonovat, a tím se naruší integrita buněčné stěny. Vlivem ultrazvuku dochází k chemickým změnám ve struktuře buňky.

Ultrazvukový čistič je součástí předsterilizační přípravy. Jedná se box s vodní lázní – destilovanou vodou.[10]

3.1.6 Mikrovlnné záření

Mikrovlny o frekvenci 2,5 GHz a vlnové délce 12,25 cm mají schopnost rozkmitat molekuly, které se zahřívají a vzniklé teplo se šíří do okolního prostředí.

Elektromagnetické záření reaguje s dipóly vody, které kmitají stejnou frekvencí jako mikrovlny. Tím dochází k rezonanci molekul, zvyšuje se jejich kinetická energie a tedy i teplota.

Cytoplasma bakterií obsahuje 65 – 90 % vody. Mikrovlny pronikají přes buněčnou stěnu do buňky, kde dojde k reakci s molekulami vody a tepelnému ohřevu. Buňka vlivem vysoké teploty ztratí integritu a rozpadne se.

Mikrovlnné záření nelze aplikovat na kovové předměty. Vlny rozkmitají volné elektrony v kovu. Pohybem elektronů vznikne elektrický proud, který způsobí tepelný ohřev předmětu. Kov uvolní přebytečnou energii ve formě fotonů – zajištění. Tímto postupem se zcela zničí.[11]

3.2 Chemická

3.2.1 Sterilizace Formaldehydem

U této metody se využívá odpařování plynu formaldehydu z formalínu (40% vodný roztok formaldehydu). V první fázi se z komory odsaje vzduch. Poté se formaldehyd smísí s vodní párou při teplotě 60 – 80 °C, vlhkost v komoře stoupne na 75-100%. Velmi reaktivní molekuly formaldehydu účinně zachycují spory i buňky mikroorganismů. Sterilizace probíhá v podtlaku. Po expozici se formaldehyd odpustí a komora se pročistí vzduchem a čistou vodní párou. Tento způsob se používá u nástrojů a pomůcek, které nesnesou vysokou teplotu.

Tato metoda nese i svá rizika. Formaldehyd je silně karcinogenní. Pokud pročišťovací fáze není 100 % účinná, mohou zbytky formaldehydu ulpívat na nástrojích a tím následně velmi vážně ohrozit pacienta. Proto se ve zdravotnictví příliš neuplatňuje.

Norma ČSN EN 14180 (847110) stanovuje výkon, zkušební metody, požadavky na konstrukci a vybavení. Kontroly a validační proces jsou uvedeny v normě ČSN EN 25424 (855254) [7][12]

3.2.2 Sterilizace Etylenoxidem

Stejně jako předchozí metoda, i tato se využívá pro nástroje, které neodolají vysokým teplotám. Mísí se s dusíkem nebo oxidem uhličitým (10 % etylenoxidu, 90 % oxidu uhličitého). Doba expozice je přibližně 3 až 6 hodin. V České republice jsou pouze 3 přístroje. Uplatňují se při průmyslové sterilizaci nebo sterilizaci kovových kloubních náhrad. Validace a průběžná kontrola dle normy ČSN EN 11135-1 (855252). [7][9]

4. Předsterilizační příprava

Použití vysterilizovaných zdravotnických prostředků znamená poškození sterilního obalu a následná aplikace přímo na pacienta. Zdravotnický personál musí evidovat číslo sterilizace daného instrumentária. Vše je dohledatelné ve zdravotnické dokumentaci pacienta. Předsterilizační příprava zahrnuje dezinfekci, fyzikální očistu, sušení, setování, balení a vlastní sterilizaci. [5][13]

4.1 Dekontaminace

Kontaminovaný materiál se naskládá do připravených kovových sít a vloží se do dekontaminačního kontejneru s dezinfekčním roztokem po dobu 15 minut. Tento krok je velmi důležitý, při nesprávné dekontaminaci se snižují kvalitativní vlastnosti nástrojů. Pro efektivnější omytí od nečistot, zbytků tkáně a biologického znečištění se uplatňují velkokapacitní myčky. Ty se používají především ve velkých provozech (fakultní, všeobecné nemocnice). Na dočištění nástrojů se používají ultrazvukové přístroje (viz obrázek 2), které způsobují rozpad buněk na základě působení vysokofrekvenčních akusticko mechanických kmitů. Poté se opláchnou čistou tekoucí vodou, vysuší a připraví ke sterilizaci. [14]



Obrázek 2: Ultrazvukový přístroj na mytí nástrojů

4.2 Sterilizační boxy

Každý chirurgický výkon má daný přesný počet instrumentů. Zdravotník zkontroluje, zda nějaké nescházejí a následně se nástroje naskládají dle předepsaných norem do kovových košů. Zabalí se do netkané textilie a vloží se do sterilizačních boxů, které se opatří kontrolními štítky. Poté se odešlou do sterilizačního centra² k dalšímu zpracování.[14]

4.3 Centrální sterilizace

Nemocniční oddělení, které má za úkol konečnou fázi sterilizace. Na příjmu materiálu se zkontrolují všechny dokumenty a nástroje se vyjmou z kontejneru. Následně se každý nástroj zvlášť zataví do sterilizačního obalu. U parní sterilizace se používají obaly z papíru sloužící jako bariéra před vnějším znečištěním a kontaminací. U plazmy je tento obal nevhodný, nahrazuje se nesavým materiálem z polypropylenu. Obaly jsou polopropustné, proto mají vysterilizované nástroje určitou dobu expirace. Sterilizaci může provádět pouze proškolený zdravotnický personál.[14]

²Zde se provádí pouze sterilizace.

5. Zkoušky sterilizační účinnosti

Zkoušky se provádějí za účelem prokázání účinností sterilizačních přístrojů, řídí se metodickým návodem AHEM č.1/2014.

Proškolený pracovník provádí sterilizaci, resterilizaci, běžné provozní zkoušky biologickými a nebiologickými systémy. Pracovník vede evidenci sterilizačních cyklů a následně je vyhodnocuje. Zpravidla se testuje nepoužívanější program pomocí mikroorganismů – bioindikátorů a chemických testovacích proužků.

Použití bioindikátorů schvaluje hlavní hygienik ČR. Testují se všechny typy sterilizátorů. Každá kontrola se dokumentuje schválenými formuláři dle vyhlášky č.306/2012 Sb., archivují se po dobu 5 let. Četnost měření je dána národní legislativou ČR. [5][14]

5.1 Bioindikátory

Mikroorganismy, které jsou určitým způsobem rezistentní vůči sterilizačnímu médiu. Jeho destrukcí při sterilizačním procesu se při následném vyhodnocení prokáže účinnost sterilizace. Bioindikátor obsahuje 10^6 bakterií tvořících kolonie.

Kontrola sterilizátorů biologickými indikátory je dána č. 440/2000 Sb a ČSN EN ISO 11138-1 (847111). Její postup má přesně standardizovanou metodiku.[15][16]

5.1.1 *Geobacillus stearothermophilus*

Bioindikátor používaný pro testování účinností parních, plasmových a formaldehydových sterilizátorů. Termorezistivní sporotvorná bakterie schválená pro testování účinností sterilizátorů. Proužek potažený kulturou *B.stearothermophilus* umístěný v plastové zkumavce. Bioindikátor typu „self contained“. Zkumavka obsahuje živnou půdu s bromkresolpurpurem, po sterilizaci se proužek spojí s živnou půdou a provede se kultivace. Dle předpisů „Bioindikátor musí přežít teplotu nad 120 °C po dobu 5 minut včetně trojnásobného odvzdušnění a následného 10 minutového sušení po expozici, nesmí při stejných parametrech přežít expozici 15 minut“[1]

5.1.2 *Bacillus subtilis*, *Bacillus atrophaeus*

Tyto bakterie se uplatňují při testování horkovzdušných a etylenoxidových sterilizátorů. Předpokladem je, aby mikroorganismus přežil teplotu 160 °C po dobu 9 minut, avšak nepřežil za stejných podmínek 30 minut. Ampulka obsahuje glukózový bujon sloužící jako živná půda. Pozitivní růst se projeví prstencem, který se vytvoří na povrchu živné půdy.[1][17]

5.1.3 Postup testování

Tabulka 2: Závislost počtu testerů na objemu sterilizační komory

Objem komory (litry)	Počet testerů (proužků)
< 3	2
3 – 15	3
15 – 40	4
40 – 75	6
75 – 120	8
120 – 325	12
> 325	12 – 15

Pro sterilizátor BMT Sterivap 6612 o objemu komory 600 litrů se používá 12 testerů. Testuje se nejpoužívanější program tj. 121 °C po dobu 20 minut. Testovací média se označí číslem a vloží do jednorázového sterilizačního obalu (viz obrázek 3) a následně se umístí mezi sterilizovaný materiál.[14]



Obrázek 3: Bioindikátor ve sterilizačním obalu

Do testovaného kontejneru (viz obrázek 4) se přikládají rtuťové teploměry o rozsahu do 180 °C pro kontrolu teploty uvnitř komory. Rozmístění testerů a teploměrů se zapisuje do protokolu o provedení kontroly (vzor viz Příloha A).



Obrázek 4: Testovací kontejner připravený ke sterilizaci

Po vysterilizování se provede kultivace. Testery se vyjmou z obalů a vloží se do inkubátoru. Při vkládání praskne oblast s živnou půdou a testovací proužek se spojí s tekutinou. Inkubátor (viz obrázek 5) udržuje stálou teplotu 56 °C (*G. Stearothermophilus*) nebo 37 °C (*B. subtilis*, *B. atrophaeus*). Kultivace trvá 3 dny. Za pozitivní růst se považuje vzorek, který se zbarví dožluta. Negativní vzorky mají fialovou barvu. V každém testu je jeden bioindikátor referenční – tzv. pozitivní kontrola. [13][16]



Obrázek 5: Kultivační inkubátor s testery

5.2 Nebiologické/chemické testy

Nebiologické indikátory pro kontrolu sterilizace. Správný výsledek se projeví změnou barvy štítku např. z růžové na hnědou, z modré na žlutou (viz obr. 6). Označují se jimi jednotlivé obaly. Další se vkládají do míst, kde se předpokládá špatné pronikání sterilizačního média. Jejich počet se odvíjí od počtu sterilizovaných předmětů.[13][14]



Obrázek 6: Typy nebiologických indikátorů

1A, 1B, 1C – identifikační štítky sterilizačních boxů. Zapisují se údaje o dané vsázce, datum sterilizace; datum expirace sterilizovaných nástrojů; identifikační číslo sterilizace; název oddělení, odkud nástroje jsou.

2 – TST kontrolní štítek. Vkládá se mezi sterilizovaný materiál. Reaguje změnou barvy z modré na žlutou a to při teplotě 134°C po dobu 7 minut nebo při teplotě 121°C po dobu 20 minut. 2A je štítek před sterilizací, 2B po sterilizaci.

3 – Kontrolní štítek, kam se mohou psát dodatekové informace o nástrojích. Na pravé straně je barevný proužek, který změní barvu z růžové na hnědou.

4 – Lepicí páska pro upevnění netkané textilie uvnitř sterilizačního boxu.

5 – touto etiketou je opatřený vysterilizovaný materiál. Obsahuje údaje o šarži sterilizace, datu provedení a expiraci materiálu.

5.2.1 Dutinový test

Tento test se provádí za účelem zjištění účinnosti sterilizace u dutých předmětů (jehly, kanyly, trubičky, hadičky). Kontrolní proužek žluté barvy se vloží do speciálního přípravku simulující dutinu v předmětu. Jedná se o kovový uzavíratelný válec s víčkem, kde se upevní tester. Výsledný proužek má tmavě modrou barvu. (viz obrázek 7)



Obrázek 7: Testovací proužek s přípravkem pro dutinový test

5.2.2 Bowie – Dick test

Test má za úkol kontrolovat průnik páry do porézních materiálů a správné odvětrání sterilizační komory. Testovací papírek se vkládá do přípravku simulující sterilizovaný materiál. Patří mezi základní kontroly parní sterilizace dané vyhláškou č. 306/2012 Sb. Článek č. 17 normy EN 285+A1 obsahuje postup vykonání

BD – zkoušky. Požadavky na indikátory průniku páry jsou uvedeny v normě ČSN EN ISO 11140-3 (847121)

Provádí se každý den před začátkem sterilizačních cyklů bez vsázky. Test se následně vyhodnocuje a písemně se dokumentuje jeho výsledek.[7][14]

5.3 Fyzikální testy

Fyzikální testy doplňují zkoušky sterility. Kontrolují přesný tlak a teplotu v komoře pomocí stanovených měřidel.

5.3.1 Vakuový test

Zkoumá těsnost sterilizační komory. Provádí se před začátkem sterilizačního dne. Program je součástí sterilizátoru a trvá 10 minut. Po ukončení testování sterilizátor vyhodnotí stav sterilizační komory a posoudí, zda je přístroj způsobilý k provádění sterilizace.³

5.3.2 Teplotní test

Při této kontrole se uplatňují rtuťové teploměry s rozsahem měření do 180 °C. Stanovené měřidlo určené pro měření teploty ve sterilizační komoře v průběhu expozičního cyklu. Každý teploměr má své identifikační číslo, které se uvádí do protokolu o provedené kontrole. [14]

³ Platí pro sterilizátor od firmy BMT Sterivap 6612 používaný v SC Krajské nemocnice Liberec.

6. Bezpečnostně technické kontroly

Poskytovatel zdravotních služeb je povinen zajistit udržování zdravotnických prostředků v souladu s provozními a bezpečnostními předpisy. Nadále musí být udržovány ve stálém stavu kontrolami, seřizováním a zkouškami, které jsou prováděny v souladu s předpisy od výrobce, právními předpisy a předpisy pro provoz zdravotnických prostředků.

Kontroly se řídí dle zákona č. 346/2003 Sb., ČES 33.03.95 a ČSN EN 62353/2008. V normách jsou stanovené přípustné hodnoty, které sterilizátor musí splňovat. Pro unikající proudy do země je povolena hodnota do 1000 μA . Krytem mohou unikat proudy do 500 μA . Dále se měří přechodový odpor mezi přístrojem a přívodním kabelem, přípustná hodnota je do 0,3 Ω .

Součástí kontroly je také zhodnocení funkčních parametrů přístroje, které zahrnuje celkovou mechanickou prohlídku přístroje a funkčnost všech jeho částí tj. kontrola signalizace a ovládacího zařízení, kontrola těsnosti komory a tepelné pojistky, kontrola vnitřního teploměru a měření teploty při stanoveném programu.

Ve výstupním protokolu se uvádějí naměřené hodnoty, a zda přístroj prošel kontrolou a je vyhovující pro bezpečný provoz. Dále se zde evidují podmínky měření (teplota, síťové napětí) a použité přístroje ke kontrole s validačním a kalibračním číslem.

BTK se u nových přístrojů provádějí jednou za rok, u starších typů je vyžadována kontrola jednou za půl roku. Výstupní protokol je archivován po dobu 10 let.[7][18][19]

7. Validace

Provádí se za účelem zjištění účinnosti sterilizace a záruku, že výrobek bude splňovat kritéria sterility. Normy pro validaci jsou EN ISO 14937, což jsou obecné požadavky a EN ISO 17665-1 určená pro parní sterilizaci.

Validace potvrzuje, že přístroj trvale splňuje podmínky pro správnou účinnost sterilizace. Proto validace výrobku sestává i z průběžného monitorování a zkoušek. (viz kapitola 5 teoretické části)

7.1 Instalační kvalifikace (IQ)

Při dodání přístroje se kontrolují přiložené dokumenty, instalace, správné napájení a celková bezpečnost a funkčnost přístroje.

7.2 Provozní kvalifikace (QQ)

Prokázání vykonání definovaného sterilizačního programu dle nastavených parametrů. Měření dosahovaných parametrů se provádí tzv. naprázdno. U parních sterilizátorů se kontroluje rozložení teplot, tlak a sytost páry.

7.3 Funkční kvalifikace (PQ)

Sterilní výrobek musí vykazovat stanovenou hladinu sterilizační jistoty (SAL) 1×10^{-6} dle normy ČSN EN 556-1 (855255). Tato hodnota znamená pravděpodobnost výskytu jednoho životaschopného organismu v 1 ze 10^6 vysterilizovaných položek. K tomuto testu se používají vhodné bioindikátory (viz kapitola 4).

Další způsob kontroly je měření fyzikální parametrů, které mají splňovat vyhlášku č. 306/2012 Sb. Provádí se u fyzikální sterilizace (parní, horkovzdušná).

[7][18][19]

8. Bakterie

Pro experimenty jsem zvolila bakterie dle Českého lékopisu, rok vydání 2009.

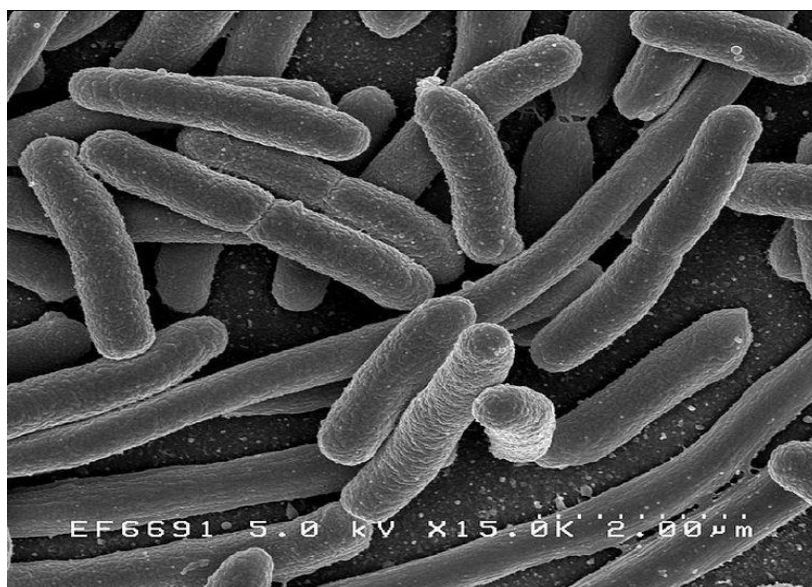
8.1 *Escherichia coli*

Její buněčný obal je tvořen vrstvou peptidoglykanu, který je překryt tenkou membránou z liposacharidů. Dokáže přežít bez přísunu kyslíku. Bakterie je však velmi citlivá na vlhkost. Pokud není prostředí, ve kterém žije, dostatečně vlhké, buňka vyschne.

Běžně se vyskytuje v trávicím aparátu teplokrevných živočichů. Patří mezi první prospěšné bakterie, se kterými se v našem životě setkáme, osidluje lidské střevo již pár hodin po porodu. Přítomnost *E.coli* je potřebná pro správný proces trávení v tlustém střevě. Produkují spoustu chemických látek např. laktát, ethanol, oxid uhličitý, vitamín K. Používají se jako indikátory pro zjištění fekálního znečištění. Jejich přemnožení nebo naopak absence v lidském organismu může vyvolat zdravotní obtíže.

Existuje několik patogenních kmenů této bakterie, které mohou vyvolat vážné zdravotní komplikace. Do lidského těla se dostanou s jídlem, a to nesprávně omytou zeleninou či špatně tepelně zpracovaným masem. Mohou způsobit zánět žaludku, infekci močových cest a pohlavního ústrojí, u novorozenců jsou původci meningitidy.

Infekcím způsobeným touto bakterií lze předejít dostatečnou hygienou. Po každém použití toalety bychom si měli umýt ruce mýdlem a teplou vodou. Ženy by měly dbát na hygienu intimních partií.[20]



Obrázek 8: Bakterie *E. coli* [23]

8.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Tuto bakterii můžeme běžně nalézt ve vodě, zemině či na lidské kůži. Jedná se o anaerobní organismus, avšak přežije i v prostředí s nízkou koncentrací kyslíku. Její kolonie osidlují přírodní i umělé povrchy. Buňky produkují barviva fluorescein (žlutozelená barva), a pyocianin (modrá barva).

Pseudomonas aeruginosa je přirozeně rezistentní na antibiotickou léčbu díky malé propustnosti gelového pouzdra buňky. Obsahuje efluxní pumpy, pomocí nich se zbavuje léků, které by narušili její strukturu. Pokud pomocí tohoto mechanismu zaznamenají látku, která by je chtěla poškodit, vytvoří si na ni rezistenci a lék se stává neúčinným. Rezistenci mohou také získat, a to mutací chromosomálních genů

Při proniknutí do těla napadá vnitřní orgány a způsobuje vážná onemocnění (infekce plic, močových cest, ran), patří mezi hlavní příčiny nosokomiálních nákaz. Tento stav může vést k sepsi. Nejčastější místo vniku je přes kůži při koupeli na veřejných koupalištích či v lázních. Při kontaminaci v nemocničním prostředí mohou vážně ohrozit pacienty s umělou plicní ventilací. Velké komplikace vyvolávají pacientům s cystickou fibrózou. Pacientům s tímto onemocněním se tvoří nadměrné množství vazkého hlenu v dýchacích cestách, což je ideální prostředí pro usídlení bakterií a jejich množení. Do těla se může dostat přes dlouho zavedené kanyly či močové katetry.[21]



Obrázek 9: Bakterie *Pseudomonas aeruginosa* [24]

PRAKTICKÁ ČÁST

1. Materiály a metody

- Densi-La-meter II – k určení zákalu roztoku (použit zákal 1 McF). Optoelektronický přístroj, který porovnává vstupní paprsek s vystupním a na základě toho určí optickou hustotu suspenze.
- Vortex MP 110 – přístroj k promíchávání vzorků pro získání homogenní suspenze.
- Flowbox Schoeller SafeFast classic – box s laminárním prouděním sloužící jako bariéra před vzdušnou kontaminací, je určený pro práci ve sterilním prostředí.
- Skleněný lihový kahan – k opalování hrdel lahví, nádob a nástrojů, které byly použity pro zpracování vzorků.
- Kovová pinzeta, délka 12 cm – k přenášení testovaného materiálu
- Kovové nůžky, délka 12 cm – použity pro rozstřihání gázy na vzorky 2×2 cm.
- Mikrovlnná trouba Electrolux Returntable compact 800W – elektromagnetické záření vyvíjené tímto přístrojem jsme použili pro sterilizaci nekovových materiálů.
- Germicidní UVC lampa, výkon 30 W, vlnová délka 254 nm (součást flow boxu), životnost 5000 hodin – slouží k dezinfekci pracovního prostoru v laminárním boxu. Lampa se zapíná před i po pracovním výkonu pro zamezení kontaminace následně zpracovaných vzorků.
- Zařízení na úpravu vody, Typ: MID 10, příkon: 0,55 kW, výrobní číslo:372/2012, Goro spol s.r.o. – vyvíječ destilované vody. Upravená voda byla použita pro přípravu živných půd a kultivačních médií.
- Ethanol C_2H_5OH – dezinfekční testovaných vzorků, v praxi se využívá k ošetření nástrojů, účinně likviduje bakterie a viry, uplatňuje se jako konzervační činidlo v kosmetice a farmacii.
- Dezinfekce Desident[®] CaviCide, SpofaDental – prostředek s baktericidním, virucidním, fungicidním a tuberculocidním účinkem.
- Sterilizační sáčky Septodont 51×241 mm

- Horkovzdušný sterilizátor HS 62 A
Výrobní číslo: 871820
Technické parametry: napětí AC 220 V, frekvence 50 Hz, el.výkon 2,1 kVA
komora o objemu 60 litrů s nucenou cirkulací vzduchu
vnitřní rozměry komory 27x53x41 cm
- Autokláv PS 20/A Z020
Výrobní číslo: 89301
Technické parametry: napětí AC 220 V, frekvence 50 Hz, tlak 0,35 MPa, el.výkon 2,1 kVA
Přístroj obsahuje ukazatel teploty a tlaku. Nastavuje se požadovaná teplota a čas
Malý stolní parní sterilizátor o objemu komory 20 litrů. K vývoji páry využívá destilovanou vodu ze zásobníku.
- Plasmový sterilizátor Laoken LK/MJG-100 – objem komory 100 litrů
Výrobní číslo: 120809080003

1.1 Materiály k testování sterilizačních postupů

- Gáza - Sterilní krytí Sterilux® ES 10 cm×10 cm, Hartmann
- Hadice transparentní silikonová 8/10 mm, délka 4 cm, teplotní stálost -60°C až +200°C, Deutsch & Neumann GmbH,
- Skleněná roztírací tyčinka o průměru 3,5 mm.
- Nesterilní EKG elektroda pěnová kulatá, 45 mm, Dahlhausen – materiál byl zvolen k experimentům na základě požadavku laboratoře CXI a prof. Ing. Aleše Richtera, CSc. z Technické univerzity v Liberci pro doporučení nejvhodnější metody dezinfekce (sterilizace) tohoto materiálu.
- Navažovací lžička Kopist 140 mm

1.2 Živné půdy

Způsob kultivace a zpracování vzorků jsem zvolila dle Českého lékopisu (rok vydání 2009), který uvádí nejvhodnější typy živných půd, optimální dobu kultivace a následné vyhodnocení výsledků.

Sterilizace médií probíhala v parním sterilizátoru – autoklávu PS 20/A Z020.

1.2.1 Soyabean Casein Digest Medium

Tekuté kultivační médium odpovídající požadavkům Českého lékopisu, které má regenerační schopnosti. Dochází k opětovné aktivaci částečně poškozených bakterií.

Složení (g/l):	Enzymatický hydrolyzát	17,0
	Sójový pepton	3,0
	Chlorid sodný	5,0
	Hydrogenfosforečnan draselný	2,5
	Dextrosa	2,5

pH při 25 °C je $7,3 \pm 0,2$

Výrobce: Bio-rad

Exspirace: 10/2016

Příprava: 9 g sójového média jsem rozmíchala ve 300 ml destilované vody a při teplotě 121 °C po dobu 15 minut sterilizovala.

Připravené nádoby, které byly předem vysterilizované parní sterilizací, jsem naplnila 50 ml sójového bujónu. Přesné množství živného roztoku jsem odměřovala ve sterilním odměrném válci a před každým přelitím jsem hrdlo ožehla plamenem, abych eliminovala možnost vzdušné či jiné kontaminace.

Do naplněných nádob jsem poté umísťovala vysterilizované či vydezinfikované vzorky materiálů

1.2.2 Fyziologický roztok

9% vodný roztok. Poměr 2,7 g NaCl přidáno do 300 ml destilované vody.

Fyziologický roztok jsem použila pro ředění bakteriálních suspenzí *E.coli* a *P.aeruginosa* o zákalu 1 McF tj. 3×10^8 bakterií v cm^3 inokula. Přesné určení zákalu jsem provedla pomocí Densi-La-meteru II a referenčního vzorku.

1.2.3 Tergitol 7

Živná půda určená pro bakterie *Escherichia coli*. Pozitivní růst se projeví změnou barvy média ze zelené na žlutou. Při množení bakterie dochází k fermentaci laktózy a hodnota pH média se snižuje.

Složení (g/l):	Masový pepton	10,00
	Kvasničný extrakt	6,00
	Masový extrakt	5,00
	Laktóza	20,00
	Tergitol 7	0,10
	Agar	16,00

pH při 25°C 6.9 ± 0.2

Výrobce: HiMedia laboratories

Exspirace: 8/2016

Příprava: 17,15 g přípravku jsem smíchala s 300 ml destilované vody a při teplotě 121 °C po dobu 15 minut vysterilizovala. Následně jsem médium ochladila na 45 °C, smísila s 2,5 ml 1 % roztoku 2,3,5-trifenyltetrazolium chloridu a nalévala do sterilních Petriho misek.

1.2.4 Plate count agar without dextrose

Standartní mikrobiologické médium využívané ke kultivaci a pomnožování mikrobiálních buněk.

Složení (g/l):	Želatinový pepton	10,0
	Chlorid sodný	5,0
	Glukóza	5,0

Agar 15,0

pH 7,2 ± 0,2

Exspirace: 30. 3. 2018

Příprava: 6,3 g PCA jsem smíchala s 300 ml destilované vody a při teplotě 121 °C po dobu 15 minut vysterilizovala. Následně jsem médium nechala zchladnout na teplotu 45 °C a nalévala do sterilních Petriho misek.

1.2.5 CN agar

Speciální živná půda pro bakterie *Pseudomonas aeruginosa*. Pozitivní růst se projeví změnou barvy média z čiré na modrou v důsledku produkce barevného pigmentu pyocianinu.

Složení (g/l):	Želatinový pepton	16,00
	Cetrimid	0,20
	Hydrolýzovaný kasein	10,00
	Kyselina nalidixová	0,015
	Bezvodný síran draselný	10,00
	Agar	13,00
	Chlorid hořečnatý	1,40

pH při 25°C 7,1 ± 0,2

Výrobce: Bio-Rad Laboratories

Exspirace: 9/2016

Příprava: 12,65 g média jsem smíchala s 250 ml destilované vody a při teplotě 121 °C po dobu 15 minut vysterilizovala. Následně jsem médium ochladila na 45 °C, smísila s 2,5 ml glycerinu a nalévala do sterilních Petriho misek.

1.2.6 STE Dulab 500-S

Tekutá půda podporující růst *B. stearothermophilus* je určena pro kontrolu funkce sterilizačního přístroje.

Složení (g/l):	Enzymatický kasein. hydrolyzát	10,00
	Glukóza ČL 97	5,00

Myo – Inositol SIGMA	0,80
Ribóza SIGMA	0,20
Fruktóza SIGMA	0,50
Bromkrezolpurpur DIFCO	0,04

pH 6,9 – 7,0

Výrobce: DULAB s.r.o

Exspirace: 10/2015

Příprava: Do kultivačního média se přidá 500 ml destilované vody, poté se 4 ml média rozplní do zkumavek a vysterylizuje v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

1.2.7 SUB Dulab

Kultivační médium určené pro bioindikátor *B.subtilis*, pomocí něhož se kontroluje správná funkce sterilizátoru. Médium je připraveno z ingrediencí dle ISO 9001:2000/EN 46001.

Složení (g/l):	Pankreaticky natrávený kasein	17,0
	Sójový pepton	3,0
	Chlorid sodný	5,0
	Hydrogenfosforečnan draselný	2,5
	Glukóza	2,5

pH 7,3 ± 0,2

Výrobce: DULAB s.r.o

Exspirace: 10/2015

Příprava: Pomnožovací půda se smísí s 1000 ml destilované vody a sterilizuje se při 121 °C po dobu 15 minut. Následně se 4 ml média sterilně rozplní do zkumavek.

1.3 Použité bakteriální kmeny

Pro experimenty byly použity kmeny dodané Masarykovou univerzitou v Brně, a to *Pseudomonas aeruginosa*, číslo šarže 0307201421821 s datem expirace 7/2016 a *Escherichia coli*, číslo šarže 2405201321193 s datem expirace 5/2015.

Kmeny jsou zakonzervovány v želatinových discích. Před jejich použitím je nutné bakteriální kmen zaktivovat vyočkováním na PCA agar a ponechat v inkubátoru při teplotě 37°C po dobu 48 hodin.

1.4 Příprava inokula

Pro účely experimentů jsem zvolila vyšší koncentraci inokula 1 McF (3×10^8 buněk/cm³), aby případný pozitivní růst byl dobře znatelný. Z vyočkových bakteriálních ploten jsem sterilní očkovací kličkou odebrala vzorek, který jsem smísila se 100 ml fyziologického roztoku. Pro získání homogenní suspenze jsem inokulum promíchala přístrojem Vortex MP 110. Optickou hustotu jsem určila pomocí Densi la meteru II. Požadovaná hodnota optické hustoty se nastaví pomocí referenčního vzorku, u něhož je zákal přesně nastaven. Poté se do přístroje vloží zkumavka se suspenzí, u které chceme změřit optickou hustotu.

Přístroj využívá princip spektrofotometrie, kdy prosvěcováním měřeného vzorku světlem o vlnové délce 525 nm porovnává vstupní intenzitu s výstupní a z toho následně určí koncentraci buněk v suspenzi.

Tabulka 3: Optická hustota Densi-la-meter II

Optická hustota dle normy [McF]	Koncentrace <i>E.coli</i> [Počet buněk/cm ³]	Teoretická optická hustota (při 525 nm)
0,5	$1,5 \times 10^8$	0,125
1,0	$3,0 \times 10^8$	0,25
2,0	$6,0 \times 10^8$	0,50
3,0	$9,0 \times 10^8$	0,75
4,0	$12,0 \times 10^8$	1,0
5,0	$15,0 \times 10^8$	1,25

2. Výsledky a diskuze

2.1 Předsterilizační příprava

V této kapitole praktické části jsem se pokusila simulovat situaci, kdy dojde ke kontaminaci materiálu mikrobiálními zárodky a následná dezinfekce není adekvátně provedena. Ověření účinnosti dezinfekce vybranými prostředky k likvidaci mikrobiálních zárodků na zkontaminovaném materiálu. Dekontaminační metody byly na testovaný materiál aplikovány bez následné mechanické očisty.

2.1.1 Příprava vzorků

Všechny vzorky byly zpracovány v předem vysterilizovaném laminárním boxu za použití sterilních médií a všech pomůcek. Box se před začátkem i po skončení práce vysvítí germicidní lampou, která je součástí vybavení přístroje, a to po dobu 30 minut.

Pro docílení sterility a znemožnění kontaminace jsem před a po použití nástrojů jejich konce (přicházející do styku se sledovaným materiálem) smočila do ethanolu a ožehla nad plamenem.

Před a po umístění sójového bujonu do kultivační nádoby se hrdlo ožehlo plamenem, aby se docílilo sterilního přelítí.

Kontrolní referenční vzorky jsem zkontaminovala a vložila do kultivačního média. Tyto vzorky slouží jako pozitivní kontrola pro každý sledovaný materiál. (tj. vyhodnocení, zda skutečně došlo ke správnému zkontaminování vzorku a také ke zhodnocení výsledné účinnosti dezinfekce a sterilizace)

Na vzorek gázy (o rozměru 2×2 cm) jsem napipetovala 3μL suspenze z důvodu zachování stejné kontaminace pro lepší porovnávání vzorků.

Silikonovou dutou hadičku, EKG elektrodu a skleněnou roztírací tyčinku jsem uchopila sterilní pinzetou a ponořila do kádinky s bakteriální suspenzí do přibližně 2 centimetrů hloubky kapaliny. Kontaminovaný materiál jsem lehce nechala okapat nad kádinkou a umístila na Petriho misku.

2.1.2 Použití Ethanolu

Gázu jsem ošetřila 1 postřikem ethanolu a nechala jsem jej působit po dobu 1 minuty. Poté jsem vzorek vložila do nádoby se sójovým bujonem.

Hadička byla ošetřena 1 postřikem z každé strany, nikoli z vnitřku. Po 1 minutě jsem trubičku umístila do živné půdy.

Skleněnou tyčinku jsem ošetřila 1 postřikem z každé strany a po 1 minutě vložila do kultivačního média.

Na EKG elektrodu jsem aplikovala 1 postřik ethanolu z obou stran, po 1 minutě působení jsem vzorek vložila do sójového média.

2.1.3 Dezinfekce Desident® CaviCide

Gázu jsem ošetřila 1 postřikem Desidentu a nechala jsme jej působit po dobu 1 minuty. Poté jsem vzorek pomocí pinzety vložila do kultivačního média.

Silikonová dutá hadička byla ošetřena 1 postřikem z obou stran, nikoli z vnitřku. Přípravek působil 1 minutu, poté byla hadička pinzetou přenesena do média.

Skleněnou tyčinku jsem ošetřila 1 postřikem z obou stran a po 1 minutě vložila do nádoby s živnou půdou.

Na EKG elektrodu byl aplikován 1 postřik z každé strany, po uplynutí 1 minuty od ošetření jsme elektrodu umístila do sójového bujonu.

2.1.4 Mikrovlnné záření

Pro tento pokus jsem, jako generátor mikrovlnného záření, zvolila nejdostupnější zařízení, kterým byl magnetron v mikrovlnné troubě. Mikrovlnnou troubu jsem nastavila na nejvyšší možný výkon 800W, mikrovlny jsem na vzorky nechala působit 3 minut.

Vzorky jsme umístili na skleněné Petriho misky. Po sterilizaci byly vzorky neprodleně umístěny do kultivačního média.

Tuto metodu nelze aplikovat na materiály, které obsahují kovové části tj. EKG elektrody. Mikrovlny interagují s volnými elektrony v kovu a způsobují zvyšování teploty. Po dosažení kritické hodnoty začne kov jiskřit a dojde k jeho destrukci.

2.1.5 Germicidní UV záření

Kontaminovaný materiál jsem umístila na sterilní Petriho misky a následně jsem vzorky vložila do laminárního boxu. UV světlo o vlnové délce 254 nm působilo po dobu 30 minut ve vzdálenosti 60 cm od vzorků.

2.1.6 Kultivace vzorků

Všechny zpracované vzorky se před vyhodnocením kultivovaly 7 dní při teplotě 37°C, což je ideální teplota pro růst bakterií. Dobu kultivace jsem zvolila dle Českého lékopisu. Růst *E.coli* a *P.aeruginosa* se projeví již po 48 hodinách. Pokud by ve vzorku byly přítomny další mikroorganismy např. kvasinky nebo plísně, jejich přítomnost se prokáže za 5 až 7 dní.

2.1.7 Hodnocení vzorků

Po sedmi denní inkubaci jsem vzorky zhodnotila z hlediska zákalu sójového média, z čehož lze určit, zda jsou ve vzorku přítomny nějaké mikroorganismy.

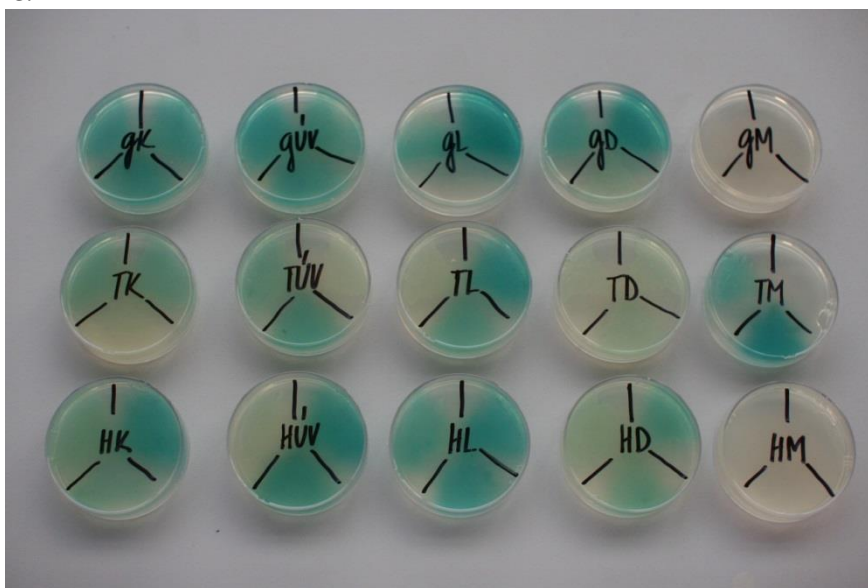
Pro vyočkování vzorků jsem zvolila živnou půdu speciálně určenou pro daný typ bakterie. Pozitivní růst buněk *E.coli* se projeví změnou barvy kultivačního média Tergitolu 7 vlivem fermentace laktózy (snížení pH), a to ze zelené na žlutou. (viz. Obrázek 10) Buňky *P.aeruginosa* obsahují fluorescenční barvivo, které způsobí obarvení CN agaru na modrou barvu. (viz Obrázek 11) Kultivace trvala 48 hodin.



Obrázek 10: Vyočkování vzorků *E. coli* na Tergitol 7

1. řádek – Gáza kontrola, mikrovlny, dezinfekce, líh, UV záření
2. řádek – Trubička (hadička) kontrola, mikrovlny, dezinfekce, líh, UV záření
3. řádek – hokejka (skleněná tyčinka) kontrola, mikrovlny, dezinfekce, líh, UV záření

P.aeruginosa produkuje modré barvivo pyocyanin. CN agar, který jsem použila pro vyočkování, podporuje produkci pyocyaninu, v tomto případě indikátoru růstu bakterie.



Obrázek 11: Vyočkování *P.aeruginosa* na CN agar

1. řádek – Gáza kontrola, mikrovlny, dezinfekce, líh, UV záření
2. řádek – Trubička (hadička) kontrola, mikrovlny, dezinfekce, líh, UV záření
3. řádek – Hokejka (skleněná tyčinka) kontrola, mikrovlnné záření, dezinfekce, líh, UV záření

Escherichia coli

Výsledky vyočkování vzorků *Escherichia coli* na Tergitol 7

 - přítomnost E.coli  - nepřítomnost E.coli

Tabulka 4: Výsledky dekontaminace gázy *E. coli*

Gáza					
	Kontrola	UV záření	Ethanol	Dezinfekce	Mikrovlnné záření
Tergitol 7					
					
					

Pro tento experiment byla použita gáza, která sestává z více vrstev. UV světlo proniklo pouze první vrstvou materiálu, tudíž tato metoda nebyla účinná.

Ethanol a dezinfekce Cavident byly aplikovány stejným způsobem (viz kapitola 2.1 Příprava vzorků v praktické části), avšak účinnost byla rozdílná. Dezinfekční prostředek účinkoval pouze u jednoho vzorku, naproti tomu ethanol byl úspěšný u dvou vzorků ze tří. Důvod neúspěchu u jednoho vzorku může být špatná dávka (nedostatečné množství) přípravku Cavident na materiál. Mikrovlny eliminovaly celou populaci mikroorganismů. Nejvhodnější metody ošetření gázy jsou mikrovlny a ethanol.

Tabulka 5: Výsledky dekontaminace skleněné tyčinky *E. coli*

Skleněná tyčinka					
	Kontrola	UV	Ethanol	Dezinfekce	Mikrovlnné záření
Tergitol 7					
					
					

Skleněná tyčinka je z neporézního hladkého a katalyticky indiferentního materiálu. Dezinfekční přípravky se na skle špatně uchytávaly a stékaly dolů, proto bylo jejich působení značně omezené.

Na základě těchto výsledků doporučuji pro sterilizaci skla mikrovlnné záření. Tato technika zlikvidovala mikrobiální buňky u všech testovaných vzorků.

Tabulka 6: Výsledky dekontaminace silikonové hadičky *E. coli*

Silikonová dutá hadička					
	Kontrola	UV	Ethanol	Dezinfekce	Mikrovlnné záření
Tergitol 7					
					
					

U tohoto materiálu hraje velkou roli průřez a tvar (dutina). Pro experimenty jsem zvolila poměrně širokou trubičku, aby byla větší pravděpodobnost účinnosti dekontaminačních prostředků.

Neúspěch metod je z důvodu špatného pronikání dezinfekčních činidel do hadičky. Mikrovlnné záření neproniklo přes vrstvu silikonu do dutiny vzorku, interagovalo pouze s bakteriemi, které byly vně hadičky nebo po obvodu dutiny.

Pro dekontaminaci dutých předmětů bych doporučila mikrovlnné záření. Záření bych však nechala působit delší dobu, aby bylo docíleno větší účinnosti.

Tabulka 7: Výsledky dekontaminace EKG elektrody *E. coli*

EKG elektroda					
	Kontrola	UV	Ethanol	Dezinfekce	Mikrovlnné záření
Tergitol 7					X
					X
					X

Při ošetření UV světlem a ethanolem došlo k porušení lepidla mezi pěnovým povrchem a folií, která chrání kovovou elektrodu. Mikrovlnné záření nelze na EKG elektrody aplikovat, protože obsahují kovové části.

Dezinfekce sice nebyla natolik účinná, aby zlikvidovala všechny bakterie na povrchu elektrody, avšak nijak materiál nepoškodila. Neúčinnost dezinfekčního

prostředku přisuzuji vysoké bakteriální kontaminaci elektrody. Navzdory tomu bych pro dezinfekci tohoto materiálu zvolila přípravek na bázi kyseliny peroxyoctové např. v mých experimentech používaná dezinfekce Cavident.

Pseudomonas aeruginosa

Vzorky, které byly zkontaminované touto bakterií, jsem vyočkovala na CN agar, speciální živnou půdu pro *P. aeruginosa*. Médium podporuje tvorbu pigmentu pyocyaninu – modrá barva.

 přítomnost *P.aeruginosa*

 přítomnost *P.aeruginosa*, slabě zelený pigment

 nepřítomnost *P. aeruginosa*

Tabulka 8: Výsledky dekontaminace gázy *P. aeruginosa*

Gáza					
	Kontrola	UV světlo	Ethanol	Dezinfekce	Mikrovlnné záření
CN agar					
					
					

Při aplikaci mikrovln se jeden vzorek vznítit. Nejspíše došlo k vyšší tepelné zátěži. *P. aeruginosa* má kolem své buňky gelové pouzdro, elektromagnetické vlnění muselo proniknout přes ochrannou bariéru bakterie. Avšak mikrovlnné záření zneškodnilo bakterie u všech vzorků.

Z výsledků lze usoudit, že mikrovlnné záření je neúčinnější metoda pro dekontaminaci tohoto materiálu.

Tabulka 9: Výsledky dekontaminace silikonové hadičky *P.aeruginosa*

Silikonová dutá hadička					
	Kontrola	UV	Ethanol	Dezinfekce	Mikrovlnné záření
CN agar					
					
					

Dezinfekční prostředky reagovaly s bakteriálními buňkami a částečně je poškodily. Po vložení do sójového bujonu se bakterie zregenovaly a začaly být znovu aktivní. To způsobilo slabé zabarvení vzorků.

Pro tento typ materiálu je vhodná dezinfekce prostředkem na bázi kyseliny peroxyoctové. Přípravek eliminuje bakteriální populaci na vzorku silikonové duté hadičky, při nižší koncentraci bakterií by zřejmě působil účinněji. Dále bych pro dekontaminaci dutých předmětů doporučila mikrovlnné záření, kde bych volila delší expoziční dobu, aby bylo docíleno větší účinnosti.

Tabulka 10: Výsledky dekontaminace skleněných tyčinek *P. aeruginosa*

Skleněná tyčinka					
	Kontrola	UV	Ethanol	Dezinfekce	Mikrovlnné záření
CN agar					
					
					

UV světlo, ethanol ani dezinfekce nebyly v tomto experimentu úspěšné. Mikrovlny zničily mikrobiální kontaminaci na skleněné tyčince ve všech případech. Lze tedy říci, že mikrovlnné záření aplikované na testované vzorky je nejvhodnější metodou sterilizace.

Tabulka 11: Výsledky dekontaminace EKG elektrod *P. aeruginosa*

EKG elektroda					
	Kontrola	UV	Ethanol	Dezinfekce	Mikrovlnné záření
CN agar					X
					X
					X

UV světlo bylo jednoznačně nejúčinnější metoda, bohužel elektromagnetické záření porušilo lepkavou vrstvu mezi pěnovým povrchem a ochrannou folii, elektroda již nelze znovu použít. Stejnou reakci vyvolal i ethanol.

Proto bych pro dezinfekci EKG elektrod volila dezinfekční prostředek na bázi kyseliny peroxyoctové, který nepoškodí povrch elektrody.

2.1.8 Zhodnocení výsledků

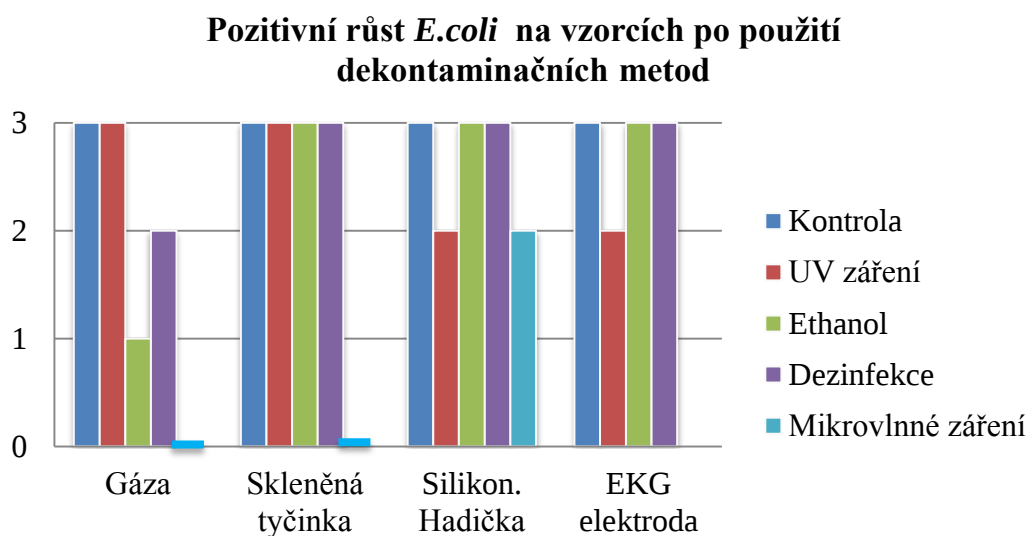
Předsterilizační příprava a dezinfekce neodmyslitelně patří mezi techniky, kterými bojujeme proti mikrobiálním nákazám. Snaha byla zlikvidovat všechny mikroorganismy nebo alespoň snížit jejich populaci na minimum, což se podařilo jen u malého počtu testovaných vzorků/metod. Neúčinnost aplikovaných metod přikládám vysoké kontaminaci materiálů a délce kultivace testovaných vzorků, mikroorganismy měly dostatečně dlouhou dobu se zregenerovat.

Hlavním důvodem neúčinnosti dezinfekčních prostředků (Cavident, ethanol) je nepoužití mechanické očisty, přípravky stékaly po povrchu a nepůsobily stejnoměrně, proto jejich úspěšnost nebyla vysoká. Pokud se dezinfekční přípravky aplikují na materiál bez následné mechanické očisty, jejich účinky se výrazně snižují. Souhra postupů je velmi důležitá. Díky mechanické očištění se přípravek lépe zapracuje do materiálu a zasáhne do všech míst na povrchu.

UV záření nepronikne překážkami, největší uplatnění má při dezinfekci povrchů. Mikrovlnné záření bylo v experimentech prokazatelně nejúčinnější. Je to způsobeno tepelným zahříváním cytoplasmy. Buňky jsou mikrovlnami zahřívány zevnitř, dochází k narušení buněčné integrity a následně destrukci buněčné stěny. Aplikace mikrovln je vhodná pro nekovové povrchy bez dutin. Zvýšená pozornost by se měla věnovat hořlavým materiálům (např. textiliím), protože vysoká teplota může způsobit jejich vznícení.

2.1.9 Sumarizace výsledků

Sumarizace výsledků je uvedena v grafu č. 1, který shrnuje působení jednotlivých metod na testovaný materiál. Na ose y je znázorněno, u kolika vzorků (tj. triplicátů) se projevil pozitivní růst bakterie *E.coli*. Hodnoty v grafu uvádějí pozitivní nález bakteriální kontaminace v testovaných vzorcích po 7 denní inkubační kontaminaci.



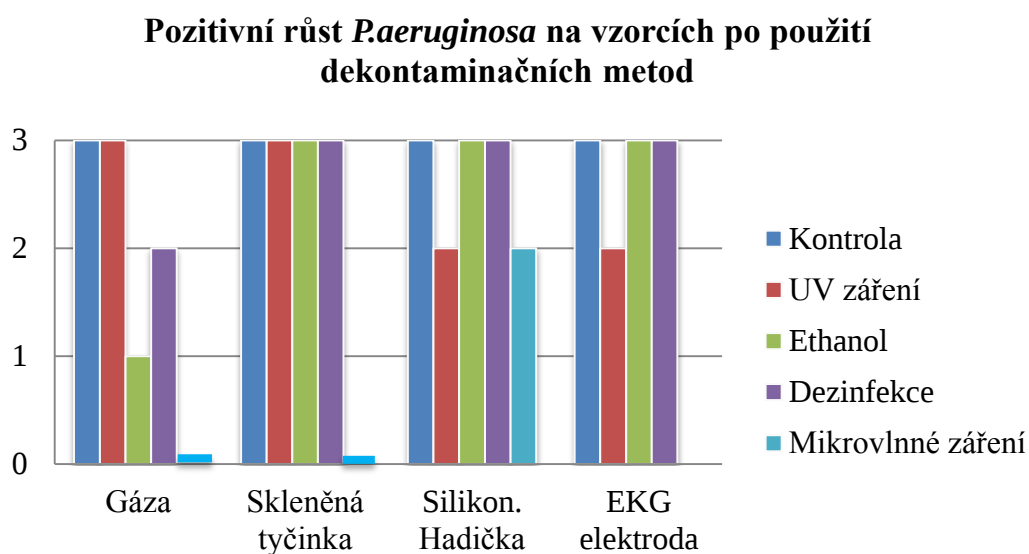
Graf 1: Pozitivní růst *E.coli* na vzorcích

Tabulka 12: Sumarizace výsledků kontaminace *E.coli*

	Kontrola	UV záření	Ethanol	Dezinfekce	Mikrovlnné záření
Gáza	3	3	1	2	0
Skleněná tyčinka	3	3	3	3	0
Silikon. Hadička	3	2	3	3	2
EKG elektroda	3	2	3	3	X

Tabulky 12 a 13 znázorňují četnosti výskytu bakteriální populace ve vzorcích, které prošly dekontaminačním procesem.

Graf 2 zobrazuje působení dekontaminačních metod na vzorky, které byly kontaminované bakterií *P.aeruginosa*. Jedná se o shrnutí hodnot z tabulek 8 – 11. Graf zobrazuje hodnoty, počet kontaminovaných vzorků ze všech testovaných vzorků (tj. triplikátů) po 7 denní inkubační době.



Graf 2: Pozitivní růst *P.aeruginosa* na vzorcích

Tabulka 13: Sumarizace výsledků kontaminace *P.aeruginosa*

	Kontrola	UV záření	Ethanol	Dezinfekce	Mikrovlnné záření
Gáza	3	3	1	2	0
Skleněná tyčinka	3	3	3	3	0
Silikon. Hadička	3	2	3	3	2
EKG elektroda	3	2	3	3	X

2.2 Sterilizace

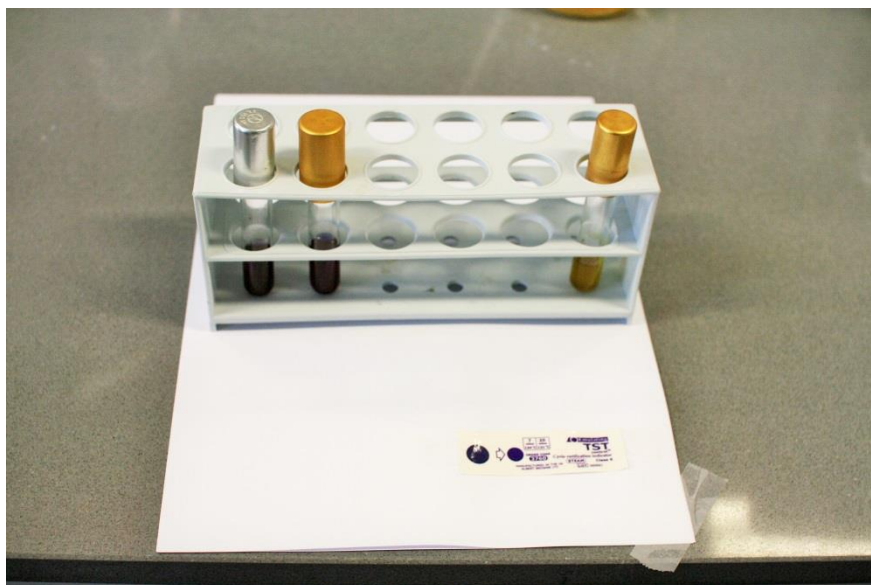
2.2.1 Předsterilizační dekontaminace

- Chirozan plus 0,5% – připraven 1% koncentrace, 1g rozpuštěn ve 100ml sterilní destilované vody, po 15 minutové aktivaci je připraven k použití.
- Detergent – prostředek na mytí nádobí Jar 500 ml.

2.2.2 Testy sterilizátorů

Sterilizační testy musí prokázat, že sterilizační proces zneškodnil 10^6 populace bakterií na testovacím proužku.

Biologické testy prokázaly správnou účinnost přístroje. Pro kontrolu přístroje PS 20/A Z020 byly použity 2 ampulky s bioidinkátorem *G. Stearothermophilus*, šarže GS 14/1B ZÚ Ústí – Plzeň, expirace 31. 3. 2015



Obrázek 12: Vyhodnocení bioindikátoru z přístroje PS 20/A Z020

Do sterilizační komory jsem umístila 2 biologické indikátory (proužky), a to do míst, kde se předpokládá obtížnější pronikání sterilizačního média vlivem netěsnosti komory. Zvolila jsem program při teplotě 121 °C po dobu 20 minut. Poté jsem vložila testovací proužky do živné půdy STE DULAB 500-S – médium určené pro kultivaci biologických indikátorů.

Bioindikátory se inkubují 48 hodin při teplotě 55 °C. Na obrázku č. 8 lze vidět vyhodnocené biologické testy. Na laboratorním stojanu jsou vlevo umístěny zkumavky s testovacími proužky, které prošly sterilizací. Napravo od těchto zkumavek je zkumavka s aktivním bioindikátorem, kde živná půda změnila barvu z fialové na žlutou z důvodu snížení pH.

Pro další kontrolu jsem do sterilizační komory vložila TST testovací štítek, který při správné sterilizaci změní barvu ze žluté na modrou vlivem působení sterilizačního média.

Pro kontrolu přístroje HS 62 A byly použity 4 ampulky s bioindikátorem *B. Atrophaeus*, šarže BA 14/2A ZÚ Ústí – Plzeň, expirace 31. 3. 2015.



Obrázek 13: Vyhodnocení bioindikátoru z přístroje HS 62 A

Testování horkovzdušného sterilizátoru probíhalo obdobně jako u parní sterilizace. Jelikož je komora přístroje větší, použila jsem 4 bioindikátory.

Pozitivní růst *B. Atrophaeus* se projeví utvoření „prstence“ na povrchu živné půdy, který je znatelný na vzorku umístěném vlevo na stojanu. Tento bioindikátor neprošel sterilizačním procesem a slouží jako kontrolní vzorek, že testovaná bakteriální populace byla aktivní (tj. živá).

2.2.3 Příprava vzorků

V tomto experimentu jsem se co nejvíce chtěla přiblížit metodice, která se používá v praxi. Testovaný materiál byl zpracován v laboratorních podmínkách, dodržovala jsem pravidla aseptické práce. Materiál jsem zkontaminovala bakteriální suspenzí a následně omyla vodou s detergentem. Poté jsem vzorky ponořila na 15 minut do Chirošanu plus. Po uplynutí této doby jsem nástroje omyla pod tekoucí vodou, osušila a vložila do obalu, které jsou určeny pro parní a horkovzdušnou sterilizaci.

- U horkovzdušného sterilizátoru jsem zvolila expoziční čas 60 minut při teplotě 160°C.
- Parní sterilizaci jsem prováděla po dobu 15 minut při teplotě 121°C.
- Sterilizace plazmou probíhala při krátkém cyklu tj. 10 minutová expozice.

Horkovzdušnou sterilizaci jsem neaplikovala na EKG elektrody, jelikož jsou tepelně nestabilní a mohlo by dojít ke vznícení.

2.2.4 Kultivace vzorků

Materiál jsem po sterilizaci umístila do kultivačního média a při teplotě 37 °C nechala kultivovat 7 dní. Dobu kultivace jsem zvolila dle Českého lékopisu. Přítomnost bakterií *E.coli* a *P.aeruginosa* je zjevná již po 48 hodinách. Výskyt dalších mikroorganismů (např. kvasinky nebo plísně) se projeví za 5 až 7 dní.

2.2.5 Vyhodnocení výsledků

Escherichia coli

Výsledky vyočkování vzorků *Escherichia coli* na Tergitol 7

 - přítomnost *E.coli*  - nepřítomnost *E.coli*

Tabulka 14: Výsledky sterilizace Navažovací lžička *E.coli*

Navažovací lžička				
	Kontrola	Parní sterilizace	Horkovzdušná sterilizace	Plazma
Tergitol 7				
				
				

Tabulka 15: Výsledky sterilizace EKG elektroda *E.coli*

EKG elektroda				
	Kontrola	Parní sterilizace	Horkovzdušná sterilizace	Plazma
Tergitol 7			X	
			X	
			X	

Pseudomonas aeruginosa

Výsledky vyočkování vzorků *P.aeruginosa* na CN agar

 přítomnost *P.aeruginosa*

 nepřítomnost *P. aeruginosa*

Tabulka 16: Výsledky sterilizace Navažovací lžička *P.aeruginosa*

Navažovací lžička				
	Kontrola	Parní sterilizace	Horkovzdušná sterilizace	Plazma
CN agar				
				
				

Tabulka 17: Výsledky sterilizace EKG elektroda *P.aeruginosa*

EKG elektroda				
	Kontrola	Parní sterilizace	Horkovzdušná sterilizace	Plazma
CN agar			X	
			X	
			X	

Všechny testované metody prokázaly stoprocentní účinnost na všech vzorcích (tj. v triplikátu) a také u obou typů bakteriální populace. Parní a horkovzdušná

sterilizace jsou samy o sobě účinné. Předsterilizační příprava je v procesu dekontaminace materiálu nutným doplňkem, aby byla zaručena nejvyšší míra spolehlivosti sterilizačního procesu.

Horkovzdušná sterilizace nebyla aplikována na EKG elektrody (v tabulkách 14 a 15 označeno jako „X“) vysoká teplota by mohla způsobit tepelnou destrukci (zahoření) vzorků. Použitím parní sterilizace změnily elektrody svou strukturu, vysoká teplota poškodila jejich integritu. Sterilizace plazmou je šetrná metoda, avšak i tento proces způsobil strukturální změny na elektrodě.

Laboratorní kovové navažovací lžičky jsou vyrobeny ze stejného materiálu, jenž se používá pro lékařské nástroje. Častým působením sterilizačních médií jejich životnost klesá. Horký vzduch přispívá ke korozivní degradaci materiálu. Všechny použité metody byly srovnatelně účinné, žádná z nich nepůsobila na testovaný materiál destruktivně.

2.3 Likvidace odpadu

Práce v mikrobiologické laboratoři vyžaduje zvláštní zacházení s infekčním materiálem, a to jak pro vlastní ochranu pracovníků, tak i pro ochranu pracovního prostředí.

Likvidace mikrobiologického materiálu se provádí dle pokynů pro zacházení s biologickými látkami. Kultury mikroorganismů na pevných a tekutých médiích (Petriho miska, zkumavka, jednorázové pomůcky) se po ukončení práce soustředí do mrazicího boxu. Odpad následně likviduje specializovaná firma.

Zkontaminované nádobí a pomůcky jsem nejprve dekontaminovala Savem, autoklávovala a následně omyla v roztoku s detergentem. Poté jsem předměty opláchla vodou a destilovanou vodou. Takto připravené nádobí se sušilo při teplotě 121 °C po dobu 30 minut a dále sterilizovalo horkým vzduchem.

3. Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo ověřit sterilační techniky používané ve zdravotnictví a jejich vhodnost použití na různé typy materiálů (sklo, kov, plast, polyetylen, tkanina). Experimenty bylo ověřeno, jak důležitá je v předsterilizační přípravě mechanická očista. Účinnost dezinfekčních prostředků se vlivem nepoužití mechanické očisty výrazně snižuje. Nepoužitím mechanické očisty jsem chtěla simulovat stav, kdy může dojít ke kontaminaci pomůcek či materiálu nestandardním postupem zdravotnickým personálem. Z tohoto důvodu je dodržování předepsaných postupů dekontaminace materiálu klíčové.

Stoprocentní účinnosti sterilačních metod (parní, horkovzdušná a plazmová sterilizace) jsem docílila souborem dekontaminačních postupů, kterými jsem podpořila účinky sterilizačních médií.

Součástí práce bylo taktéž nalezení nové metody sterilizace elektromagnetickým zářením. Tento cíl byl splněn, byla nalezena nová technika sterilizace pomocí mikrovlnného záření. V experimentech bylo použito záření generované magnetronem mikrovlnné trouby (dostupný a levný spotřebič). Mikrovlnné záření způsobí desintegraci buněk vlivem tepelného zahřívání buněčné cytoplazmy.

V porovnání s ostatními metodami lze usoudit, že mikrovlnné záření má velice dobré sterilační účinky na různorodý materiál (tkanina, sklo), avšak při aplikaci na duté materiály jeho účinky klesají, do budoucna by bylo vhodné otestovat také delší expoziční časy, případně jiné varianty experimentu.

Metoda sterilizace mikrovlnným zářením je levná a rychlá, lze využít běžně dostupné generátory záření. Nevýhodou této metody je omezení použití na kovový materiál, který při interakci s mikrovlnným zářením jiskří. Zvýšená opatrnost by se měla věnovat hořlavým materiálům, vysoká teplota by mohla způsobit vznícení sterilizovaného materiálu.

Při experimentech bylo použito mikrovlnné záření o frekvenci 2,45 GHz a vlnové délce 0,122 m, expozice trvala 3 minuty. Zvolená intenzita pole byla účinná na mikroorganismy, které byly umístěny na tkanině a skle, a to ze 100%. Záření přitom nepoškodilo testovaný materiál. Nižší účinnost (pouze 30%) byla zaznamenána na dutém materiálu, proto by bylo vhodné upravit dobu expozice či vlnovou délku záření, aby se docílilo vyšší účinnosti i pro tyto typy materiálů (duté předměty apod.).

Kdybychom na vzorky aplikovali pole s vyšší intenzitou, mohlo by, vlivem vysoké teploty nebo dlouhé doby expozice, dojít k poškození materiálu.

Další návrhy na rozšíření práce jsou například výzkum vlivu mikrovlnného záření na bakteriální biofilm, který je obecně mnohem více rezistentní než samotné bakterie nebo také vliv na jiné druhy organismů (další druhy bakterií, rostlinné buňky, tkáňové buňky, kostní buňky). V další práci bych se chtěla zaměřit na výzkum působení mikrovlnného záření na bakterie, a detailněji identifikovat za jakých podmínek je sterilizace nejúčinnější.

Seznam literatury

- [1] MELICHERČÍKOVÁ, Věra, *Sterilizace a dezinfekce ve zdravotnictví*, Grada, 1998., 232 s., ISBN 8071694428
- [2] ChiroSan plus, *Bochemie* [online] [cit. 2015-03-25] Dostupné z: <http://www.bochemie.cz/cs-CZ/rucni-dekontaminace-26/37>
- [3] Persteril, *Eurošarm* [online] [2015-01-29] Dostupné z: http://www.eurosarm.cz/web/structure/persteril44.html?lang=cz/persteril_letak_final_zdravotnictvi.pdf
- [4] Aseptic technique, *Nuffield Foundation* [online] [cit. 2015-04-21] Dostupné z: <http://www.nuffieldfoundation.org/practical-biology/aseptic-techniques>
- [5] Vyhláška 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* [online] [cit. 2014-12-15] Dostupné z: <http://www.zakonyprolidi.cz/cs/2012-306>
- [6] Velké parní sterilizátory, *BMT Medical Technology s.r.o.* [online] [cit. 2014-12-15] Dostupné z: <http://www.bmt.cz/velke-parni-sterilizatory-bmt>
- [7] *České státní normy* [online] [cit. 2015-02-12] Dostupné z: <http://www.technicke-normy-csn.cz>
- [8] Sytá pára, *Fyzika MEF* [online] [cit. 2015-01-18] Dostupné z: <http://fyzika.jreichl.com/main.article/view/654-syta-para>
- [9] SANDLE, Tim. *Sterility, sterilisation and sterility assurance for pharmaceuticals: technology, validation and current regulations*. Woodhead Publishing, 2013, pages cm. ISBN 978-190-7568-381. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/book/9781907568381>

- [10] UV záření, *H2O CZ* [online] [cit. 2015-03-16] Dostupné z: <http://www.h2o-logic.cz/technicke-aspekty/uv-zareni.html>
- [11] Microwave ovens and resonance in molecules, *Schoolphysics* [online] [cit. 2015-03-16] Dostupné z: http://www.schoolphysics.co.uk/age16-19/Wave%2520properties/Wave%20properties/text/Microwave_ovens/index.html
- [12] Formaldehyde: More than meets the eye : Low Temp Sterilization, *Sterilization & infection control blog* [online] [cit. 2014-12-15] Dostupné z: <http://www.tuttnauer.com/blog/formaldehyde-low-temperature-sterilization>
- [13] Testy a indikátory, *Vistex Medical s.r.o.* [online] [cit. 2014-12-15] Dostupné z: <http://sterilizace.eu/setup/testy.pdf>
- [14] Konzultace s Bc. Halinou Doležalovou, Sterilizační centrum Krajské nemocnice Liberec
- [15] *Standardní metodika, Biologické indikátory pro kontrolu účinnosti sterilizačních přístrojů (příloha č. 2/1994 k AHEM)* [online] [cit. 2015-02-12] Dostupné z: http://www.bmt.cz/Data/files/legislativa/stand_metodika.pdf
- [16] Bioindikátory, *Dulab* [online] [cit. 2014-12-15] Dostupné z: <http://www.dulab.cz/?7.-bioindikatory,34>
- [17] *Metodický návod k provádění kontroly účinnosti sterilizačních přístrojů AHEM č.1/2014* [online] [cit. 2015-03-15] Dostupné z: http://www.szu.cz/uploads/documents/knihovna_SVI/pdf/2014/AHEM_1_2014.pdf
- [18] Konzultace na oddělení zdravotnické techniky v Krajské nemocnici Liberec

- [19] Zákon č. 346/2003 Sb.: *Úplné znění zákona č. 123/2000 Sb. o zdravotnických prostředcích.*, Medicton [online] [cit. 2015-02-12] Dostupné z:
http://www.medicton.com/346_2003.pdf

- [20] PHARMA-REPORTS. *Klinicky významné bakterie*. 1. Vyd. Praha: Triton, 2012. 123 s. ISBN 978-80-7387-588-6

- [21] 3D Inner Structure of E. coli Resolved via Advanced Microscopy, *Softpedia – Free downloads encyclopedia* [online] [cit.2015-4-13] Dostupné z:
http://news.softpedia.com/news/3D-Inner-Structure-of-E-coli-Resolved-via-Advanced-Microscopy-278474.shtml#sgal_0

- [22] *Pseudomonas aeruginosa: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium*, *Wiley online library* [online] [cit. 2015-02-20] Dostupné z:
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-0691.2007.01681.x/full>

- [23] TODAR, Kenneth. *Pseudomonas*, *Online Textbook of Bacteriology* [online][cit. 2015-04-18]
Dostupné z:http://textbookofbacteriology.net/pseudomonas_3.html

- [24] HOCHÉL I., DEMNEROVÁ K., *Antimikrobiální látky*, Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko – technologická v Praze, [online] [cit. 2015-02-12] Dostupné z:
http://biomikro.vscht.cz/vyuka/fm/L9_Antimikrobialni_latky.pdf

- [25] MINISTERSTVO ZDRAVOTNICTVÍ ČR, *Český lékopis 2009*, Praha: Grada, 2009, 3968 s., CD-ROM, ISBN 978-80-247-2994-7

- [26] Konzultace s Hanou Řehákovou, Oddělení nanomateriálů v přírodních vědách, Ústav pro nanomateriály pokročilé technologie a inovace, TUL

- [27] CAREY, Roberta. SCHUSTER, Mindy. MCGOWAN, Karin. *Lékařská mikrobiologie v klinických případech*. 1.vyd. Praha: Triton, 2011. 321 s. ISBN 978-80-7387-480-3

- [28] ADLER, S., SCHERRER, M., & DASCHNER, F. D. (1998). *Costs of low-temperature plasma sterilization compared with other sterilization methods*. Journal of Hospital Infection, 40(2), 125-134. doi:10.1016/S0195-6701(98)90091-3

Přílohy

Příloha A – Protokol o zkoušce účinnosti sterilizátorů bioindikátory



Krajská nemocnice Liberec, a.s.
nemocnice Liberec nemocnice Turnov

ZKOUŠKA ÚČINNOSTI STERILIZÁTORU POMOCÍ BIOLOGICKÝCH TESTŮ

Liberec, Husova 10

oddělení a místnost

Použité biologické testy

Výrobce: počet:
Expirace testů:

Použité chemické testy

Výrobce: počet:
Expirace testů:
Test po sterilizaci
vyhovuje: ano ne

Druh přístroje:

Výrobce:

Typ:

Výrobní číslo:

Druh zkoušky: Po instalaci
Periodická
Mimořádná
Po opravě

Vsázka: 1/4 1/2 3/4 1/1

Objem komory:

výpis číslo šarže:

Spuštění sterilizátoru čas:
Program sterilizace:

dosažené parametry (teplota, tlak, podtlak):

Kontrolu provedla dne :

jméno a podpis:

Výsledky biologických testů:

zakreslení umístění testů a teploměrů v komoře:

Výsledek kontrolního testu:

Závěr :

Přístroj zkoušce bioindikátory **VYHOVUJE** a **MŮŽE** být používán

Přístroj zkoušce **NEVYHOVUJE** a **NESMÍ BÝT POUŽÍVÁN** do další zkoušky

Navržená opatření při nevyhovující zkoušce:

Vyhodnocení provedla dne:

jméno a podpis: