

**MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ
AGRONOMICKÁ FAKULTA**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

BRNO 2016

Bc. Markéta Novobilská

Mendelova univerzita v Brně
Agronomická fakulta
Ústav zemědělské, potravinářské a environmentální techniky



**Zpracování odpadů pocházejících z transfuzní stanice z hlediska
mikrobiálních rizik**

Diplomová práce

Vedoucí práce:

Ing. Jaroslav Záhora, CSc

Vypracoval:

Bc. Markéta Novobilská

Brno 2016

MÍSTO PRO ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem práci: **Zpracování odpadů pocházejících z transfuzní stanice z hlediska mikrobiálních rizik** vypracoval/a samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědom/a, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne:

.....

podpis

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat panu Ing. Jaroslavu Záhorovi, CSc za vedení diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat prim. MUDr. Zenonu Lasotovi a paní Mgr. Miroslavě Vaňkové za odborné konzultace, cenné rady a získání údajů, díky kterým byla tato práce zkompletována.

ABSTRAKT

Na transfuzním oddělení v nemocnici Nový Jičín je denně produkováno velké množství komunálního i nebezpečného odpadu. Manipulací s tímto odpadem může dojít k poranění či kontaminaci zdravotnického i ostatního personálu, dárců, pacientů, ale také k znečištění nebo poškození životního prostředí. Při poranění osoby se postupuje dle směrnic nemocnice a vyhlášky Ministerstva zdravotnictví, kdy jsou prováděny testy na onemocnění virového původu (hepatitida typu B,C, HIV) a jaterní testy.

Tato práce popisuje možné mikrobiální nebezpečí, které je spojeno s nebezpečným odpadem pocházejícím ze zdravotnictví, s jeho tvorbou, ale také s následnou manipulací. Pomocí mikrobiálních testů bylo na modelovém experimentu stanoveno nejpravděpodobnější ohnisko možné nákazy. Na základě dosažených výsledků byla stanovena míra vyhodnocení mikrobiálních rizik. Tyto výsledky se staly podkladem pro možná doporučení, která jsou shrnuta závěrem.

Klíčová slova: transfuzní oddělení, nebezpečný odpad, komunální odpad, mikrobiální rizika

ABSTRACT

The transfusion department at the hospital in Nový Jičín is producing daily a large number of municipal and hazardous waste. Handling with such waste can cause injury or contamination of medical and other staff, donors and patients, but it can also cause unintentional pollution or environmental damage. In the case of any personal injury it is necessary to follow the guidelines prepared by the hospital and health ministry. The suspected injury are there tested on the viral infections (hepatitis B, C, or HIV) and/or the liver tests are provided.

The aim of this diploma thesis is to describe the possible microbial hazards that are associated with hazardous medical waste, its production, but also with the subsequent handling. On a model experiment by using microbial tests was estimated the most likely focal point of possible infection. Evaluating of microbial risk assessment was determined from the results. These results formed the basis for possible recommendations, which are summarized in conclusion.

Keywords: transfusion department, hazardous waste, municipal waste, microbial risk

ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ.....	4
ÚVOD.....	10
CÍL PRÁCE.....	12
1 LEGISLATIVA.....	13
1.1 CHARAKTERISTIKA ODPADŮ	13
1.2 ODPADOVÉHO HOSPODÁŘSTVÍ	13
1.2.1 <i>Zákon o odpadech č. 185/2001 v aktuálním znění.....</i>	<i>13</i>
1.2.2 <i>Prováděcí předpisy k zákonu o odpadech.....</i>	<i>13</i>
1.2.3 <i>Metodické doporučení a směrnice EU.....</i>	<i>14</i>
1.3 PROVOZ ZDRAVOTNICKÉHO ZAŘÍZENÍ.....	15
1.3.1 <i>Zákon č. 258/2000 Sb., o ochraně veřejného zdraví v aktuálním znění</i>	<i>15</i>
1.3.2 <i>Další předpisy související s provozem zdravotnických zařízení</i>	<i>15</i>
2 NEMOCNIČNÍ ODPAD	16
2.1 SPECIFICKÉ ODPADY	18
2.1.1 <i>Ostré předměty.....</i>	<i>18</i>
2.1.2 <i>Patologicko-anatomický odpad</i>	<i>18</i>
2.1.3 <i>Infekční odpad.....</i>	<i>18</i>
2.1.4 <i>Farmaceutický odpad</i>	<i>18</i>
2.1.5 <i>Chemické odpady.....</i>	<i>19</i>
2.1.6 <i>Radioaktivní odpady</i>	<i>19</i>
2.2 NESPECIFICKÉ ODPADY	19
2.3 RIZIKA PŘI NAKLÁDÁNÍ S NEMOCNIČNÍMI ODPADY	20
3 DRUHY NEMOCNIČNÍCH NÁKAZ	22
3.1 NOZOKOMIÁLNÍ NÁKAZY	22
3.1.1 <i>Dělení NN na specifické a nespecifické</i>	<i>22</i>
3.1.2 <i>Dělení NN dle zdroje.....</i>	<i>23</i>
3.2 PROFESIONÁLNÍ ONEMOCNĚNÍ U ZDRAVOTNICKÉHO A JINÉHO PERSONÁLU.....	23
4 MONITOROVÁNÍ MIKROBIOLOGICKÉ ČISTOTY PROSTŘEDÍ.....	25
4.1 OBECNÉ DĚLENÍ MIKROBIOLOGICKÝCH METOD.....	25
4.1.1 <i>Přímé metody.....</i>	<i>25</i>

4.1.2	<i>Nepřímé metody</i>	25
4.2	ZÍSKÁNÍ VZORKU	25
4.2.1	<i>Otisky povrchů</i>	26
4.2.2	<i>Stěry povrchů</i>	26
4.3	ŽIVNÁ MEDIA	26
4.4	OČKOVÁNÍ MIKROORGANISMŮ NA ŽIVNÁ MEDIA	27
4.5	KULTIVACE MIKROORGANISMŮ	28
4.6	VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ	28
5	NEJVÝZNAMĚJŠÍ PŮVODCI NEMOCNIČNÍCH NÁKAZ	29
5.1	RIZIKO VZNIKU REZISTENCÍ VŮČI ANTIBIOTIKŮM V BIOFILMU	29
5.1.1	<i>Vznik biofilmu</i>	29
5.1.2	<i>Rezistence vůči antibiotikům</i>	29
5.1.3	<i>Mechanismy rezistence buněk</i>	29
5.2	BAKTERIÁLNÍ NÁKAZY	30
5.2.1	<i>Gram pozitivní bakterie</i>	30
5.2.2	<i>Gram negativní bakterie</i>	32
5.3	VIROVÉ NÁKAZY	32
6	FAKTORY NAPOMÁHAJÍCÍ VZNIKU A ŠÍŘENÍ NÁKAZ	33
6.1	OBRANA ČLOVĚKA PROTI INFEKCI	33
6.2	HYGIENICKÉ A PROVOZNÍ NEDOSTATKY NA PRACOVIŠTI	34
6.2.1	<i>Prevence</i>	34
6.2.2	<i>Hygiena provozu</i>	34
6.2.2	<i>Dezinfekce a sterilace</i>	35
6.2.3	<i>Hygiena rukou</i>	35
7	NAKLÁDÁNÍ S ODPADY VE ZDRAVOTNICTVÍ	37
7.1	INSTRUKCE PRO NAKLÁDÁNÍ S ODPADY ZE ZDRAVOTNICTVÍ	37
7.2	SBĚR ODPADŮ ZE ZDRAVOTNICKÝCH ZAŘÍZENÍ A JEHO TŘÍDĚNÍ	38
7.2.1	<i>Třídění odpadů</i>	38
7.2.2	<i>Míšení nebezpečných odpadů</i>	39
7.2.3	<i>Shromažďování odpadů</i>	39
7.2.4	<i>Manipulace s nebezpečnými odpady</i>	41

7.2.5	<i>Sklady a skladovací prostředky</i>	41
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST		43
8	MATERIÁL A METODY	43
8.1	PRACOVNÍ POSTUP	43
8.1.1	<i>Odběr vzorků</i>	43
8.1.2	<i>Příprava živných půd</i>	45
8.1.3	<i>Detekce přítomnosti mikroorganismů</i>	46
8.1.4	<i>Mikroskopie</i>	47
8.1.5	<i>Vyočkování mikroorganismů</i>	47
8.1.6	<i>Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF</i>	49
8.1.7	<i>Stanovení citlivosti patogenních mikroorganismů k antibiotikům metodou EUCAST</i>	51
9	VYHODNOCENÍ STĚRŮ	53
9.3	DISKUSE	61
10	ZÁVĚR	64
LITERÁRNÍ PŘEHLED		65
SEZNAM OBRÁZKŮ		70
SEZNAM TABULEK		71
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK		72

ÚVOD

Základním dějem umožňujícím pohyb živin, odpadních produktů a chemických signálů mezi buňkami je difúze. Zatímco difúze probíhá rychle pouze na malé vzdálenosti, mnohobuněčné organismy, mezi něž patříme i my, potřebují pro dopravu látek k buňkám a opačným směrem zvláštní transportní systém. Odpovědí evoluce na tento problém byl vývoj kardiovaskulárního systému, který rozvádí transportní medium- krev ke všem buňkám (WARD a kol., 2010). Lidská krev je velice vzácná životadárná tekutina. Jejím darování může každý z nás zachránit život. K odběru a zpracování lidské plné krve slouží specializovaná pracoviště tzv. transfuzní oddělení. Transfuzní oddělení v Novém Jičíně zprostředkovává odběr plné krve a jejích složek (plazma, erytrocyty z aferézy deleukotizované - EAD, lidské sérum) od dobrovolných dárců, bez finanční kompenzace.

Odběry krev a krevních složek a jejich zpracování je také spojeno s produkcí množství odpadů. Nebezpečný odpad může představovat zdravotní riziko, které nesouvisí pouze s poraněním, ale může způsobit i závažné infekce. Odpady ze zdravotnictví se hodnotí jako zvlášť nebezpečný materiál (MÜLLEROVÁ a kol., 2014). Zahrnují komponenty různého chemického, fyzikálního a převážně biologického materiálu, vyžadující speciální nakládání. Velmi důležité je také zneškodnění vzhledem k jejich zvláštnímu zdravotnímu riziku (KRŇOULOVÁ, 2012). Ohrožují zdravotnický personál, dárce i pacienty, manipulační pracovníky. Vzhledem k možnostem nákazy a také účinné likvidaci odpadů je velice důležité dbát na správnost třídění odpadů a jeho značení na všech úsecích oddělení. Při správné manipulaci s odpady, dodržováním platné legislativy se snižuje riziko nozokomiální nákazy a profesionálního onemocnění. Nejvyšší riziko má souvislost vždy s nakládáním a ukládáním vysoce infekčních odpadů a ostrých předmětů a vyplývají především z potenciálního přenosu infekčních chorob náhodným poraněním nebo stykem s infikovaným odpadem (STÁTNÍ ZDRAVOTNÍ ÚSTAV, 2009).

Mikrobiální riziko a možnost infekce je vzhledem k povaze odpadu velkou hrozbou a to nejen pro transfuzní oddělení. Prevence tvorby odpadů a zacházení s ním, může člověka od nežádoucí nákazy ochránit. Z hlediska mikrobiologického je důležitá tzv. exogenní nozokomiální nákaza, kterou může zavinit také nedodržení hygienických

předpisů (manipulace s odpadem bez ochranných pomůcek, nedostatečná sanitace povrchů).

Tato studie se zabývá druhem a typem odpadů, který vzniká na transfuzním oddělení (TO) a možným nebezpečím, které hrozí při nevhodné manipulaci s biologickým materiálem. Biologický materiál ve zdravotnictví je jakýkoliv materiál obsahující genetickou informaci a je schopný samoreprodukce či reprodukce v biologickém systému. Tento materiál je vždy infekční. Závěrem jsou shrnuty výsledky praktické části práce a vyhodnocení možných doporučení.

Transfuzní oddělení v Novém Jičíně podléhá kontrolám hygienických kontrolních orgánů nemocnice. Pracovník ochrany veřejného zdraví provádí pravidelné měsíční mikrobiologické kontroly pracovních ploch. Tedy dodržování hygieny a sanitace na pracovišti. Neexistují však žádné kontroly, které by byly zaměřeny na pravidelnou monitoraci možného mikrobiálního agens při manipulaci či nedodržování sanitace u nebezpečného odpadu. Na našem oddělení se jedná hlavně o krev a krevní složky, které jsou součástí použitých odběrových jehel i jednorázových odběrových setů, a tedy i sběrných nádob.

Hlavním cílem diplomové práce je zjistit míru rizika na konkrétním transfuzním oddělení z pohledu přítomnosti nebezpečného biologického materiálu, zejména rizikových mikroorganismů ve zdravotnickém odpadu.

CÍL PRÁCE

Hlavní cíl: zjištění rizikovosti pracoviště transfuzního oddělení;

Dílčí cíle:

- pomocí modelového experimentu zjistit výskyt a typ mikroflóry, která se vyskytuje na odpadkových koších a použitém materiálu
- stanovit možná mikrobiální rizika, která vznikají při manipulaci s nebezpečným i komunálním odpadem na Transfuzním oddělení;
- návrh snížení, eliminace těchto rizik;

Hypotézy:

- a) Nejvyšší četnost výskytu a možnost přenosu mikrobiálních infekcí se předpokládá na místech, kde jsou vhodné podmínky pro perzistenci těchto MO, které po kontaktu s živou tkání mohou vyvolat různá onemocnění (sběrné nádoby na nebezpečný popřípadě ostrý odpad na TO).
- b) Vzhledem k množství biologického materiálu, který je na TO denně produkován, tedy k možnému mikrobiálnímu agens, které u tohoto typu materiálu hrozí, můžeme teoreticky seřadit testované oblasti dle míry rizika: nádoby na nebezpečný ostrý odpad – okraj pro vhození > pytel na nebezpečný odpad > víko sběrných nádob na nebezpečný odpad > vnější stěny těchto nádob.
- c) Vzhledem k tvrzení, že nejvýznamnějším patogenem v nemocnicích je *metilcilin rezistentní Staphylococcus aureus*, je předpokládán jeho výskyt u sběrných nádob na nebezpečný ostrý odpad i na styčných plochách ostatních sběrných nádob.

1 LEGISLATIVA

1.1 Charakteristika odpadů

Odpady provázejí lidstvo od pradávna. Odpad je jakákoliv movitá věc, která se pro člověka stává nepotřebnou a má úmysl či povinnost se jí zbavit. Odpad vzniká při všech lidských činnostech, ale také v běžném životě.

Různé lidské činnosti mají za následek vznik různých druhů odpadů. Některé jsou biologicky odbouratelné, jiné mohou vážně poškodit zdraví lidí, zvířat či nezvratně zničit životní prostředí. Kvůli vlastnostem, které jsou velice specifické a možnostem různého rizika ohrožení životního prostředí, je s každým druhem odpadu nakládáno dle jeho specifických vlastností (zák. 185/2001 sb.).

1.2 Odpadového hospodářství

1.2.1 Zákon o odpadech č. 185/2001 v aktuálním znění

Tento zákon udává příslušné předpisy Evropské unie, kterými reguluje pravidla, která mají vést k předcházení vzniku odpadů. Dále zpracovává pravidla pro nakládání s odpady, tak aby byla dodržena ochrana životního prostředí i ochrana lidského zdraví. Udržet trvale udržitelný rozvoj a využívat přírodní zdroje tak, aby bylo omezováno vlivu nepříznivých dopadů a vylepšovat účinnost tohoto využívání. Jsou zde určeny také práva a povinnosti osob a působnost orgánů veřejné správy v odpadovém hospodářství.

1.2.2 Prováděcí předpisy k zákonu o odpadech

- Nařízení vlády č.352/2014 Sb., kterým je stanoven Plán odpadového hospodářství ČR
- Hodnocení nebezpečných vlastností odpadů je stanoveno ve vyhlášce 94/2016 sb. MŽP a MZ
- Podrobnosti nakládání s odpady jsou dány vyhláškou 83/2016 MŽP
- Katalog odpadů je stanoven vyhláškou 93/2016 MŽP

- Zákon č. 258/2000 Sb. o ochraně veřejného zdraví,
- Vyhláška č. 306/2012 Sb. o podmínkách zamezení vzniku a roznášení infekčních onemocnění a o hygienických požadavcích na provoz zdravotnických zařízení a ústavů sociální péče,
- Vyhláška č. 432/2003 Sb., kterou se stanoví podmínky, které platí pro zařazení prací do kategorií, mezní hodnoty, které jsou významným ukazatelem expozičních biologických testů, dále jsou zde stanoveny podmínky pro odběr biologického materiálu, které jsou zapotřebí pro provedení biologických expozičních testů a patřičnosti hlášení při práci s azbestem nebo biologickými činiteli,
- Nařízení vlády č. 361/2007 Sb., tímto nařízením jsou stanoveny podmínky pro ochranu zdraví při práci

1.2.3 Metodické doporučení a směrnice EU

- **Metodické doporučení k nakládání se zdravotnickými**

Tento pokyn shrnuje podrobnosti a postupy při nakládání se zdravotnickými odpady, vychází z platných právních předpisů, které spadají do oblasti zdravotnictví a odpadového hospodářství. Zároveň obsahuje i odborná doporučení vycházející ze Světové zdravotnické organizace (dále jen WHO), Technických podkladů Basilejské konvence apod.

- **Směrnice EU**

V této směrnici evropského parlamentu a rady 2006/12/ES o odpadech, jsou vymezeny základní pojmy a pravidla pro nakládání a především pro odstraňování odpadů.

- **Basilejská smlouva (BS)**

Mezinárodní dokument o odpadech, o kontrole pohybu nebezpečných odpadů, které putují přes hranice státu i jejich následné zneškodňování. Odpady, které dle BS vyžadují zvláštní zacházení, jsou uvedeny v katalogu odpadů (JANÍČKOVÁ, 2012).

1.3 Provoz zdravotnického zařízení

1.3.1 Zákon č. 258/2000 Sb., o ochraně veřejného zdraví v aktuálním znění

Ukládá práva a povinnosti fyzických a právnických osob v oblasti ochrany a podpory veřejného zdraví. Stanovuje soustavu orgánů ochrany veřejného zdraví, jejich působnost a pravomoc.

1.3.2 Další předpisy související s provozem zdravotnických zařízení

- **Vyhláška č. 537/2006 Sb.**, o očkování proti infekčním nemocem, ve znění pozdějších předpisů
- **Vyhláška č. 473/2008 Sb.**, o systému epidemiologické bdělosti pro vybrané infekce, ve znění pozdějších předpisů
- **Zákon č. 372/2011 Sb.**, o zdravotních službách a podmínkách jejich poskytování (zákon o zdravotních službách)
- **Vyhláška č. 252/2004 Sb.**, kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody, ve znění pozdějších předpisů
- **Vyhláška č. 306/2012 Sb.**, o podmínkách předcházení vzniku a šíření infekčních onemocnění a o hygienických požadavcích na provoz zdravotnických zařízení a ústavů sociální péče.

2 NEMOCNIČNÍ ODPAD

Jedná se o odpady, které pocházejí ze zdravotnických zařízení, tedy z nemocnic či jiných zařízení, které jsou jim podobné. Jedná se o odpad kapalný i pevný odpad, vznikající při léčbě nebo při jiných obdobných odborných činnostech (ZIMOVÁ a kol, 2002). Nakládání se zdravotnickým odpadem ze státních i nestátních zdravotnických zařízení se v ČR řídí platnou legislativou (ŠRÁMOVÁ a kol., 2001). Oprávněná osoba a původci odpadů odpady zařazují pod šestimístná katalogová čísla druhů odpadů uvedená v **Katalogu odpadů**, stanoveném ve vyhlášce č. 93/2016 Sb. První dvě čísla označují skupinu odpadů, druhé dvě čísla značí podskupinu odpadů a třetím dvojčíslím je označen druh odpadu (zák. 93/2016 sb.).

Zdravotnické odpady jsou zařazovány v Katalogu odpadů do skupiny 18, podskupiny 18 01 a dále se rozdělují do jednotlivých druhů podle adekvátních vlastností odpadů, odvíjejících se od použité technologie a místě vzniku odpadů (FRIBERTOVÁ, 2008). Skupina **č. 18** charakterizuje Odpady ze zdravotnictví a veterinární péče a/nebo z výzkumu s nimi souvisejícího (s výjimkou kuchyňských odpadů a odpadů ze stravovacích zařízení, která se zdravotnictvím bezprostředně nesouvisí). Pod podskupinu **č. 18 01** jsou zařazeny Odpady z porodnické péče, z diagnostiky, z léčení nebo prevence nemocí lidí (zák. č. 185/2001 sb.).

V katalogu odpadů jsou odpady ze zdravotnických zařízení děleny a označovány podle čísel a názvů uvedených v tabulce č. 1.

Tabulka č.1 Dělení zdravotnického odpadu

Číslo katalogu	Název odpadu
18 01 00	specifické odpady ze zdravotnictví
18 01 01	ostré předměty
18 01 02	části těla a orgány krevních vaků a krevních konzerv
18 01 03	odpady, na jejichž sběr a odstraňování jsou kladeny zvláštní požadavky s ohledem na prevenci infekce
18 01 04	odpady, na jejichž sběr a odstraňování nejsou kladeny zvláštní požadavky s ohledem na prevenci infekce
18 01 06	chemikálie, které jsou nebo obsahují nebezpečné látky
18 01 07	chemikálie neuvedené pod číslem 18 01 06
18 01 08	nepoužitelná cytostatika
18 01 09	jiná nepoužitelná léčiva neuvedená pod č. 18 01 08
18 01 10	odpadní amalgám ze stomatologické péče
18 01 99	odpad druhotně blíže neurčený nebo výše neuvedený

Odpad ze zdravotnictví může být také obecně rozdělen na odpad specifický pro zdravotnická zařízení a odpad nespecifický pro zdravotnická zařízení (MÜLLEROVÁ, 2014).

Specifický (nebezpečný) odpad

Odpad nebezpečný, znečištěný škodlivinami, u kterého jsou z hlediska ochrany zdraví kladeny vyšší požadavky na kvalitu třídění i na jeho shromažďování (ŠRÁMOVÁ a kol., 2001). Do tohoto odpadu jsou zařazeny složky různého chemického, fyzikálního a biologického materiálu, který potřebuje specifické nakládání včetně jeho odstranění vzhledem ke zvláštnímu zdravotnímu riziku, které představuje (KHS, 2013). Patří sem odpad patologicko-anatomický, infekční, ostrý, chemický, farmaceutický a radioaktivní (BOŽEK a kol., 2003).

Nespecifický odpad

Odpad neznečištěný škodlivinami, tj. odpad ostatní, který je srovnatelný s běžným typem tuhého komunálního odpadu, prokazatelně bez nebezpečných vlastností

a nepředstavující další nebezpečí pro člověka (ŠRÁMOVÁ a kol., 2001). Jde o odpad neznečištěný potenciální infekcí, pocházející z neinfekčních oddělení. Tento odpad se velice podobá odpadu komunálnímu (FEČKO, 1997).

2.1 Specifické odpady

2.1.1 Ostré předměty

V těchto odpadech jsou zařazeny všechny ostré předměty, které jsou schopny poranit pokožku, jako jsou například jehly, injekční stříkačky s jehlou, kanyly, bodce, ampule, pipety, skalpely, skleněné střepy, prázdné lékovky, zkumavky (MÜLLEROVÁ, 2014).

2.1.2 Patologicko-anatomický odpad

Do tohoto odpadu patří všechny lidské tkáně (infekční i neinfekční), což jsou ostatky, plody, mrtvá těla orgány, krev nebo jiné lidské tekutiny, tkáně z laboratoří, kontaminovaný materiál a zbytky, které vznikají po úklidu těchto prostor (MÜLLEROVÁ, 2014).

2.1.3 Infekční odpad

Tyto odpady z nemocnic obsahují (bakterie, viry, paraziti, nebo houby) ve vysokých koncentracích patogeny a u náchylných hostitelů mohou způsobit onemocnění (CARVALHO a kol., 2006). Infekční odpady obsahuje i veškeré použité odpady z laboratoří, chirurgické materiály, materiály z dialyzačních zařízení, dále je zde zařazen odpad biologicky kontaminovaný, materiál obvazový, biologicky kontaminované plastové pomůcky a materiály a osobní ochranné pomůcky personálu (ŠRÁMOVÁ a kol., 2001).

2.1.4 Farmaceutický odpad

Do těchto odpadů jsou řazeny odpady z farmaceutických výrobků, chemikálie nebo léky, které jeví známky poškození, byly kontaminovány nebo jim prošla záruční lhůta.

2.1.5 Chemické odpady

Do této skupiny patří tuhé, kapalné a plynné chemické látky, které jsou zbytky a odpady z chemických laboratoří nebo vznikající při diagnostických vyšetřeních nebo které jsou zbytky po lékařských vyšetřeních po úklidech a desinfekci. Chemické odpady jsou rozdělovány do dvou skupin na nebezpečné (toxické, karcinogenní, dráždivé, vysoce reaktivní) a ostatní odpady (MÜLLEROVÁ, 2014).

2.1.6 Radioaktivní odpady

Tento odpad je rozdělen podle zdrojů radioaktivního záření do dvou skupin. Podle zdroje ze kterého vycházejí, se rozdělují na otevřené a uzavřené. Tyto odpady pocházejí z radiodiagnostických a radioterapeutických pracovišť oddělení nukleární medicíny, radiologických oddělení, popř. z výzkumných pracovišť (MÜLLEROVÁ, 2014).

2.2 Nespecifické odpady

Jedná se o odpady, které neobsahují škodlivé látky a jsou srovnatelné s běžným odpadem komunálního typu. Pocházejí výhradně z neinfekčních oddělení a nejsou nebezpečné ani pro obyvatelstvo, ani pro životní prostředí (MÜLLEROVÁ, 2014).

Podílejí se na něm z největší části kuchyňské odpady (zbytky jídel, čisticí prostředky, obaly), kancelářský odpad (papír, kovy, obsahy odpadkových košů), textilní odpady a málo nebezpečný chemický odpad.

V České republice se produkuje odhadem přes 23 tisíc tun odpadu ze zdravotnických zařízení ročně. Nakládání s odpady spadá do kompetence resortu životního prostředí, avšak hodnocení zdravotních rizik pro populaci posuzují orgány Ministerstva zdravotnictví (MÜLLEROVÁ, 2014).

2.3 Rizika při nakládání s nemocničními odpady

Zdravotní riziko z nemocničních odpadů je často podceňováno. Na rozdíl od zdravotnických pracovníků, kteří jsou povinni dodržovat předpisy při nakládání s rizikovým materiálem, jako je odpad, pracovníci v odpadovém hospodářství jsou o možném riziku nedostatečně informováni a podobné pokyny pro ně neexistují (ŠRÁ-MOVÁ a kol., 2001).

Nakládání či manipulace s nebezpečným odpadem, pocházejícím ze zdravotnictví může zapříčinit vznik onemocnění nebo poranění. Toto riziko vyplývá z nebezpečných vlastností odpadu (KRŇOULOVÁ, 2012). Infekční odpady z nemocnic obsahují (bakterie, viry, paraziti, nebo houby) ve vysokých koncentracích patogeny a u náchylných hostitelů mohou způsobit vážná onemocnění (CARVALHO a kol., 2006). Nebezpečný tedy infekční odpad může obsahovat širokou škálu patogenních mikroorganismů. V dnešní době jsou známy tisíce bakterií, parazitů, hub i virů, které jsou pro člověka velkým rizikem a mohou mu ohrozit i jeho zdraví. Tyto patogeny, které mohou být součástí odpadů, jsou schopny nakazit lidské tělo různými cestami:

- prasklinou pokožky, řeznou nebo bodnou ranou pomocí absorpce
- požitím (alimentárně).
- absorpcí pomocí mukózní membránou
- vdechnutím

Kontaminované ostré předměty (hlavně injekční stříkačky) v odpadu, které jsou zamořeny choroboplodnými zárodky ve vysoké koncentraci, jsou s největší pravděpodobností ty části odpadu, které tvoří pro člověka to největší riziko. Toto riziko je tedy velmi aktuální. Množství patogenních mikroorganismů v odpadech, které mohou aktuálně odpad kontaminovat, je v porovnání s celkovým množstvím odpadů ze zdravotnictví, jen velmi malé. Množství kontaminující mikroflóry se za určitých podmínek může zvýšit, k tomuto jevu dochází třeba při nevhodném shromažďování nebo skladování těchto odpadů. Množící se patogenní mikroorganismy nacházející se na odpadech je rozhodující pro přítomnost infekčního agens a celý postup nakládání s odpady musí zaručit, účinné snížení rizika infekčního onemocnění na minimum (LIPJAKOVÁ, 2010).

Hrozba infekce z tohoto odpadu plyne z možných nebezpečných vlastností odpadu. Riziko nelze posuzovat obecně, vždy je nutné vystupovat z charakteristických podmínek daného zdravotnického zařízení. Největší hrozba je spojena s nakládáním s infekčními, toxickými odpady a ostrými předměty. Největší zdravotní riziko je spojeno s manipulací s odpady obsahujícími krev, tady s infekčním onemocněním, které krev může přenášet (KRŇOULOVÁ, 2012).

Mezi nedostatky, které doposud v oblasti práce s odpady přetrvávají, patří zejména ne zcela bezpečná následná manipulace s těmito odpady při jejich konečné likvidaci v odpadovém hospodářství. Ve zdravotnických zařízeních platí z hlediska ochrany zdraví před nebezpečnými látkami a odpady řada hygienických směrnic a předpisů. Ve vnitřních prostorách nemocnice musí být provedeno prostorové (nebo ve výjimečných případech jen časové) oddělení čistého a nečistého provozu (MÜLLEROVÁ, 2014).

Problematika nemocničních nákaz je velice významná, může ohrozit dárce, pacienty, ale také veškerý personál, který s dárce či pacienty nebo zdravotnickým odpadem přichází do styku. Další kapitola nemocniční nákazy specifikuje blíže.

3 DRUHY NEMOCNIČNÍCH NÁKAZ

3.1 Nozokomiální nákazy

Podle Světové zdravotnické organizace se nozokomiální nákazou rozumí nákaza exogenního i endogenního původu, která vznikla v příčinné souvislosti s pobytem osob ve zdravotnickém zařízení, a to jak v ústavní tak i ambulantní části (KOPECKÝ, 2007). Nozokomiální nákazy (dále jen NN) jsou průvodním nežádoucím jevem ústavní zdravotní péče i na počátku 21. Století (MAĎAR a kol., 2006).

Původci NN jsou bakterie, rickettsie, chlamydie, viry, prvoci, houby. Původci nozokomiálních nákaz se z těla nemocného člověka mohou vylučovat tělními sekrety a exkreta. Mezi jinými k nim patří také krev a sliny. Těmito vehikuly se nozokomiální nemoci přímo či nepřímo šíří (ŠRÁMOVÁ a kol., 2001).

Neméně významné jsou také nebezpečí spojená s alimentární nákazou, která má význam jak u nevhodně skladovaných potravin tak i u čerstvého ovoce a zeleniny. Jak uvádí JAMES 2006, je riziko alimentárních nákaz z čerstvých potravin vysoké, ke kontaminaci však často dochází už v místě primární produkce.

3.1.1 Dělení NN na specifické a nespecifické

Nespecifické NN jsou infekce, které se běžně vyskytují i mimo zdravotnické zařízení, do kterého byly přenesené. Jejich výskyt v zdravotnickém zařízení bývá tedy odrazem epidemiologické situace v příslušném regionu. Příkladem zde může být chřipka nebo salmonelózy (KOPECKÝ, 2007).

Specifické NN vznikají jako důsledek diagnostických a terapeutických lékařských výkonů u hospitalizovaných pacientů. Jsou vázány na zdravotnická zařízení, která jediná splňují podmínky jejich vzniku. Tyto nákazy mají specifickou epidemiologii, prevenci a terapii. Jejich výskyt ovlivňuje úroveň asepse, sterilizace a dezinfekce, úroveň dodržování zásad protiepidemického režimu, úroveň provozu zařízení, tj. materiální a personální vybavení s jeho odborností (PETRŽELKOVÁ, 2009).

3.1.2 Dělení NN dle zdroje

Endogenní NN je onemocnění, které vznikne u pacienta působením vlastní mikrofóry běžné i kolonizované (KOPECKÝ, 2007). Uplatňují se zejména při oslabení imunity a jsou tzv. oportunními, příležitostnými patogeny (MAĎAR a kol., 2006).

Exogenní NN (vnějších) je možností prevence mnohem víc, přičemž základem je dodržování hygienicko-epidemiologického režimu a bariérové ošetrovací techniky. Přísné dodržování preventivních opatření je povinností všech složek zdravotnického personálu i jiných zaměstnanců zdravotnických zařízení (MAĎAR a kol., 2006).

3.2 Profesionální onemocnění u zdravotnického a jiného personálu

Pojem profesionální nákaza (infekce) znamená z epidemiologického hlediska onemocnění, které postihuje určité profesní skupiny ve větší míře než ostatní populaci. Při posuzování je třeba dokázat, že postižený přišel s infekcí do styku při výkonu zaměstnání, a že riziko infekčního onemocnění při práci bylo prokazatelně vyšší než v běžném životě (GÖPFERTO VÁ, 2005).

Zdravotnický pracovník tedy může při svém povolání v procesu šíření nález sám onemocnět. Profesionální nákazou (infekcí) se může stát každé infekční onemocnění (MARTINCOVÁ, 2008). Profesionální infekční onemocnění vznikají v důsledku expozice biologických činitelů. Jsou následkem kontaktu se zdrojem nález. Profesionální infekční nemocí rozumíme onemocnění, jehož původce je přenosný na člověka a které vznikne u zdravotnického personálu při výkonu povolání. (ŠRÁMOVÁ, 2002)

Mezi nejzávažnější poranění u zdravotníků patří bodnutí, píchnutí a říznutí kontaminovaným ostrým předmětem. Riziko poranění ostrým předmětem závisí na druhu vykonávané práce, nejčastěji dochází k poranění při použití a znehodnocení ostrého předmětu. Nejvyšší riziko představuje jednorázově použitá injekční jehla atd.. Kromě místního postižení, kterým jsou hnisavé procesy vyvolané stafylokoky, streptokoky a anaerobními klostridii, může dojít k onemocnění celého organismu, které je způsobeno nejen bakteriemi, ale i parazity a viry (ŠRÁMOVÁ, 2002).

Velice často a do značné míry oprávněně se tvrdí, že všichni pracovníci ve zdravotnictví jsou vystaveni riziku infekce (ŠÍBLOVÁ, 2008).

4 MONITOROVÁNÍ MIKROBIOLOGICKÉ ČISTOTY PROSTŘEDÍ

4.1 Obecné dělení mikrobiologických metod

4.1.1 Přímé metody

Prokazují živého či mrtvého mikrobiálního původce, jeho části, povrchových struktur, charakteristických látek jako jsou nukleové kyseliny, enzymy, toxiny a eventuálně produkty metabolismu. Mezi tyto metody se řadí metody mikroskopické, kultivační, imunochemické, genetické a chemické.

4.1.2 Nepřímé metody

Ve většině případů se jedná o stanovení protilátek různých tříd. K tomuto účelu se používá široká škála metod od prosté aglutinace, aglutinace na nosičích, komplementfixační reakce až po imunochemické metody, z nichž jsou nejrozšířenější metody ELISA (KOZÁKOVÁ a kol., 2005).

4.2 Získání vzorku

Jedním ze základních pilířů oboru mikrobiologie je správný odběr materiálu k mikrobiologickému vyšetření. V mikrobiologické praxi se používá nepřilíš rozsáhlé spektrum postupů průkazu a stanovení počtu vybraných skupin mikroorganismů nebo určitého konkrétního druhu (SPURNÁ, 2009).

Při odběru vzorků je důležité, aby laboratoř obdržela vzorek, který je skutečně reprezentativní (podíly jednotlivých sledovaných složek materiálu a rozdělení hodnot sledovaného znaku odpovídají poměrům ve vzorkovaném celku) a který nebyl během přepravy a uchovávání poškozen nebo změněn. Vzorky smí odebírat pouze osoba k tomu pověřená a způsobilá.

Horizontální metody specifikující techniky vzorkování se provádějí dle ČSN a ISInorem nebo dle návodu výrobce. Z povrchů jsou vzorky odebírány pomocí kontaktních

ploten a stěrů. Postup vzorkování a pomůcky k tomu lze získat v ústavu, který bude provádět analýzy.

4.2.1 Otisky povrchů

Otiskem povrchů můžeme detekovat povrchovou mikrobiální kontaminaci. Ta může mít původ buď v sedimentaci aerosolových částic (kontaminace spadem) nebo v přenosu z předmětů (kontaminace kontaktem). Vzorkování se provádí pomocí kontaktních ploten, které mají definované rozměry destičky (BĚHAL, 2011).

4.2.2 Stěry povrchů

Stěry povrchů mohou být použity jak pro kvalitativní analýzu kontaminace povrchů, tak pro do jisté míry kvantitativní analýzu. V tom případě se musí zajistit konstantní velikost vzorku, nejčastěji pomocí šablony s otvorem o určité ploše. V úvahu je ale třeba brát skutečnost, že velmi záleží na konkrétní technice a materiálech použitých ke stírání, což brání univerzálnímu srovnávání výsledků. Stěry jsou vhodné pro nepravidelné povrchy nebo místa nepřístupná pro otiskovou metodu (BĚHAL, 2011). Pomocí sterilních tamponů se provede stěr z daného místa či předmětu a následně se vloží do kultivačního média, které se kultivuje po dobu 7 až 10 dní. Při pozitivním růstu je provedeno dourčení mikroorganismů do druhu. V případě patologických nálezů je možno provést vyšetření citlivosti daného mikroorganismu k antibiotikům. Tato metoda se používá ke zjištění stupně mikrobiálního znečištění a složení mikroflóry pracovních ploch, provozních zařízení, nádobí a náčiní, obalů, stěn, podlah, nábytku a výrobních zařízení, přepravných a skladovacích prostorů atd. (KOZÁKOVÁ a kol., 2005).

4.3 Živná media

Kultivace mikroorganismů je prováděna na živných půdách (médiiích), jejichž složení musí vyhovovat požadavkům stanovovaných mikroorganismů. Živná média lze rozdělit na syntetická a přirozená. Složení syntetických medií je přesně definováno,

přirozená živná prostředí jsou na bázi přírodních organických látek (např. kasein, maso, droždí) po působení enzymů.

Z hlediska růstu mikroorganismů se živná média dělí na univerzální, selektivní a selektivně diagnostická. Univerzální půdy vyhovují požadavkům širokého spektra mikroorganismů (např. masopeptonový agar), selektivní půdy zvýhodňují růst jednoho druhu nebo skupiny mikroorganismů, růst ostatní mikroflóry je potlačen a selektivně diagnostické půdy umožňují odlišení hledané skupiny mikroorganismů na základě určité charakteristické biochemické reakce. Při výběru vhodných diagnostik musí být přihlíženo na dva základní aspekty a to na specifitu a citlivost stanovovaného MO (CASSELS, 1997). Podle skupenství dělíme média na kapalná a ztužená.

Většina živných půd je dodávána v požadovaném složení v práškové, nebo v granulované podobě. Při jejich přípravě je nutné dodržet pokyny výrobce. Obvykle se jedná o rozpuštění navážky média ve vodě, úpravu pH a sterilizaci. Půdy se sterilně rozlévají do Petriho misek, po ztuhnutí jsou používány ke kultivaci (MLEJNKOVÁ a kol., 2014).

4.4 Očkování mikroorganismů na živná media

Prvním krokem každé kultivace (pomnožování) mikroorganismů je jejich přenesení z uchovávacího média nebo přímo z odebraného vzorku do čerstvého živného prostředí, tomuto přenesení říkáme očkování. Provádí se různými metodami, vždy je nezbytné zachovat všechna pravidla sterilní práce, tak aby se do čerstvého média dostal pouze sledovaný mikroorganismus, nikoliv kontaminace ze vzduchu, rukou, dýchacích cest nebo pracovní plochy (JANDOVÁ a kol., 1996). Existuje více postupů očkování, např. z tuhých médií kličkou na misky, šikmý agar nebo do tekutého média nebo z tekutého média do tekutého media nebo na tuhé médium. Sterilní, vyžíhanou a vychladlou kličkou nebo jehlou je mikroorganismus přenesen do nového prostředí, tj. naočkován na povrch tuhé půdy nebo do tekutého média. Tekutá média jsou očkována pipetou (MLEJNKOVÁ a kol., 2014).

4.5 Kultivace mikroorganismů

Inkubace všech mikroorganismů je třeba provádět za podmínek optimálních pro jejich růst (pokud je známe). Volba teploty, doby kultivace, přístupu kyslíku a dalších podmínek je proto značně proměnlivá dle charakteru vzorku a mikroorganismů v něm hledaných. Používáme-li pevná živná média v Petriho miskách, při kultivaci je obvykle umístíme dnem nahoru, aby nedocházelo během inkubace k vytváření kondensní vody na spodní straně víček (JANDOVÁ a kol., 1996).

4.6 Vyhodnocení výsledků

Obecně se hodnotí celkový počet mikroorganismů nebo barevné změny kultivačního media. Negativní výsledek nebo počet kolonií nepatogenní mikroflóry je nález vyhovující. V případě nálezu většího počtu kolonií než je standard nebo jakéhokoliv počtu podmíněně patogenních bakterií je nález nevhovující.

5 NEJVÝZNAMĚJŠÍ PŮVODCI NEMOCNIČNÍCH NÁKAZ

5.1 Riziko vzniku rezistencí vůči antibiotikům v biofilmu

Dle nejnovějších poznatků bylo prokázáno, že jednou z vlastností bakterií je schopnost přilnout k různým povrchům a vytvořit biofilm. K tvorbě biofilmu dochází ve většině prostředí, tedy všude tam, kde jsou přítomny MO. V mnohých případech je tvorba biofilmu nežádoucí, vzniklý povlak může způsobit korozi materiálu, ale také infekční onemocnění.

5.1.1 Vznik biofilmu

Zachycení buňky závisí na prostředí, buňka se svými adheziny zachycuje v prostředí, které jí nabízí dostatek živin. Pokud jsou v prostředí přítomny živiny, je buňka schopna přilnout jak k živým, tak i k inertním povrchům. Po adhezi buňka zvětší objem a je tvořen lepkavý polysacharid, dochází k tvorbě mikrokolonií, které jsou propojeny proteinovými nanovláknami.

5.1.2 Rezistence vůči antibiotikům

V biofilmu jsou buňky odolnější k působení antimikrobiálních látek, tento fakt je zapříčiněn nízkou difúzí látek, sorpcí antibiotik na hlenovou vrstvu a nízkým metabolismem buněk. Ke zvýšení odolnosti či rezistenci může dojít také v období, kdy dochází k vyčerpání živin z prostředí, je obecně známo, že v tomto období jsou MO mnohem méně citliví na většinu antimikrobiálních agens.

5.1.3 Mechanismy rezistence buněk

Nejběžnější obranou MO proti antibiotikům je jejich enzymatická inaktivace. Stávající buněčný enzym je upraven tak, aby reagoval s antibiotikem tak, že toto již nebude mít vliv na vlastní mikroorganismus. Existují také alternativní strategie, které mnohé bakterie využívají, příkladem může být konjugace. Konjugace je přímý kontakt mezi dvěma příbuznými buňkami bakterií, kdy dochází k přenosu malých fragmentů DNA. Další metody jsou transformace nebo transdukce.

5.2 Bakteriální nákazy

5.2.1 Gram pozitivní bakterie

5.2.1.1 rod *Staphylococcus*

Stafylokoky jsou gram pozitivní koky ve shlucích o průměru asi 1 μm. Bylo jich popsáno asi padesát druhů a asi třicet z toho bylo izolováno i od lidí. Dělíme je podle schopnosti koagulovat plazmu, na koaguláza negativní a koaguláza pozitivní (CHVÁTALOVÁ, 2012).

Stafylokoky jsou běžné bakteriální kolonizátoři kůže a sliznic člověka a jiných savců (OTTO, 2009). Mezi základní vlastnosti stafylokoků patří schopnost dlouhou dobu setrávat v zevním prostředí v prachu nebo na předmětech. Pro nemocniční kmeny je pak typická polyrezistence a odolnost vůči antibiotikům i dezinfekčním prostředkům (VAŽÁNOVÁ, 2014). Z hlediska patogenity mají pro člověka největší význam koaguláza-pozitivní druh *S.aureus* a koaguláza-negativní druhy *S.epidermidis* a *S.saprophyticus* (VOBROVÁ, 2008).

Mezi nejvýznamnější zástupce stafylokoků patří *methicilin rezistentní Staphylococcus aureus* neboli MRSA, který představuje velký problém z globálního hlediska (ŠRÁMOVÁ, 2001).

- **Metilicilin- rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA)**

Jsou koaguláza pozitivní koky o průměru 1 μm, pravidelného kruhovitého tvaru uspořádaných ve shlucích, barvitelné gramem. Jeho název je odvozen od zlatavé barvy jeho kolonií (CHVÁTALOVÁ, 2012). Rezistentní *Staphylococcus aureus* (dále jen MRSA) je hlavní příčinou nemocničních infekcí, protože rozvíjejí svou odolnost vůči všem současným třídám antibiotik (ENRIGHT a kol., 2002).

S. aureus způsobuje hnisavé procesy ran, kůže, infekce dýchacích cest, stafylokokový syndrom opařené kůže, syndrom toxického šoku, stafylokokovou enterokolitidu po léčbě antibiotiky. Způsobují také enterokokovou toxikózu (otavu z potravy), což je intoxikace způsobená kmeny s produkcí enterotoxinů (CHVÁTALOVÁ, 2012).

- **Staphylococcus epidermidis**

Zatímco dříve byl považován za neškodný komenzální mikroorganismu na lidské pokožce, *Staphylococcus epidermidis* je v současné době považován za významný patogen.. Zejména *S. epidermidis* představuje nejčastějším zdrojem infekce na zdravotnických prostředcích (OTTO, 2009).

5.2.1.2 rod *Streptococcus*

Zahrnuje jak obligátní patogeny, tak součásti běžné mikroflóry sliznic. Tyto gram-pozitivní katalasanegativní koky jsou upořádány do dvojic či řetízků (CHVÁTALOVÁ, 2012). Podle typu hemolýzy na krevním agaru se dělí na alfa, beta a gama hemolytické. Beta hemolýza vede k úplnému projasnění okolí kolonie na krevním agaru. Alfa hemolýza neboli viridace. (CHVÁTALOVÁ, 2012).

❖ .Beta – hemolytické streptokoky

Streptococcus pyogenes

Je zodpovědný za pestrou škálu klinických projevů, od mírných kožních infekcí, infekcí měkkých tkání a zánět hltanu po vážnější onemocnění, jako je například bakteriémie, celulitidy, puerperální sepse, meningitida, zápal plic, a nekrotizující fasciitis (LAMAGNI a kol., 2008).

Streptococcus agalactiae

Streptokok ze skupiny B je nejlépe známý jako příčina poporodní infekce a jako nejčastější příčina neonatální sepse. Tento organismus také způsobuje infekce u netěhotných dospělých (SCHINDLER, 2010).

❖ Alfa- hemolytické streptokoky

Streptococcus pneumoniae

Jedná se důležitý patogen způsobující invazivní onemocnění, jako je sepse, meningitida a pneumonie. Léčba pneumokokových infekcí je komplikován, z důvodu celosvětového rozšíření pneumokoků a jejich rezistenci na penicilin a jiná antibiotika (BOGAERT, 2004).

5.2.1.3 rod *Clostridium*

- **Clostridium tetani**

Toxigenní kmeny produkují neurotoxin tetanospazim. *Cl. Tetani* nebo jeho spory se do těla dostanou při poranění, někdy zcela bezvýznamnou oděrkou, a zůstávají na místě znečištěné rány. Vegetativní buňky začnou produkovat toxin, který difunduje a šíří se po motorických vláknech do míchy. Krevním oběhem je zanesen k dalším nervovým motorickým centřům, nejdříve hlavy a šíje (SCHINDLER, 2010).

- **Clostridium perfringens**

Cl. Perfringens je nejčastější příčinou anaerobní myonekrózy či anaerobní traumatózy (nesprávně hovorově „plynatá sněd“). Bývá také původcem alimentárních intoxikací z působení enterotoxinu, charakterizované profuzními průjmy a kolikovými bolestmi (SCHINDLER, 2010).

5.2.2 Gram negativní bakterie

Čeď Enterobacteraceae

V současné době se podílí na vzniku více než 60% NN po celém světě. Do čeledi *Enterobacteraceae* řadíme mnoho střevních tyček, které se fyziologicky vyskytují v gastrointestinálním traktu. Tyto mikroorganismy v suchém prostředí přežívají velmi krátce, naopak ve vlhku a v roztocích (i dezinfekčních) přežívají dlouhodobě a dokonce se v nich i množí (TRUNDOVÁ, 2012). Nejvýznamnějšími zástupci jsou rody *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*.

5.3 Virové nákazy

V této skupině jsou nemoci, které patří k nejzávažnějším. Nesou stejné epidemiologické rysy přenosu nákazy. Jsou to zejména hepatitida typu B a C a AIDS. U těchto nákaz je nejrizikovějším vehikulem krev a tělní tekutiny. Sestry s nimi často přichází do styku, a jsou enormně vystaveny jejich riziku (ŠRÁMOVÁ, 2001).

6 FAKTORY NAPOMÁHAJÍCÍ VZNIKU A ŠÍŘENÍ NÁKAZ

6.1 Obrana člověka proti infekci

Vnímavost člověka vůči různým infekčním agens se pohybuje v širokém rozmezí mezi dvěma krajními možnostmi - absolutní vnímavostí a absolutní odolností. Odolnost je ovlivněna druhovou a individuální odlišností jedince. Druhová odolnost je dána příslušností jedince k určitému živočišnému druhu (lidé, zvířata). U individuální odolnosti se uplatňují tři mechanismy - nespecifická rezistence (je dána vrozenými obrannými faktory hostitele - fyzikální, biochemické, genetické, hormonální a buněčné), nespecifická imunita (je zprostředkována životně důležitými funkcemi imunitního systému, jako je fagocytóza, komplementový systém, lysozym apod.), specifická imunita (je podmíněna předchozím stykem organismu s antigenem, pak je její rychlost a účinnost větší než u nespecifické imunity). Celková vnímavost jedince vůči potenciálnímu infekčnímu agens je ovlivněna mnoha faktory:

- infekční dávka,
- věk v době infekce,
- imunitní odpověď,
- genetické faktory,
- virulence infekčního agens,
- psychologické faktory,
- léková terapie (antibiotika, kortikoidy, imunosupresiva, antikoagulancia aj.),
- výživový stav hostitele,
- základní onemocnění.

Na základě přítomnosti těchto faktorů nemusí vždy po expozici infekčního agens dojít k rozvinutí infekce (ČERVINKOVÁ, 2010). Základním problémem při otázkách mikrobiální kontaminace, včetně kontaminace patogeny je pravděpodobně nemožnost potvrzení jejich celkové produkce (CASSELS. 1997).

6.2 Hygienické a provozní nedostatky na pracovišti

6.2.1 Prevence

Základní složkou prevence jsou hygienicko-epidemiologická opatření, kam řadíme hygienu rukou, používání ochranných pomůcek, hygienické provozní řády, dezinfekci, sterilizaci a úklid. Neméně významnou složkou je klinická prevence, která zahrnuje bariérový systém ošetřování, dodržování standardních ošetřovatelských postupů a profylaktické a léčebné podávání antibiotik. Třetí složku tvoří technická prevence, pod kterou spadá používání bezpečných zdravotnických prostředků, bezpečné odpadové hospodářství a bezpečné ovzduší a voda (MUSILOVÁ, 2014).

6.2.1.1 Obecné zásady protiepidemiologického opatření

- manipulace s biologickým materiálem
- monitorování rezistence mikroorganismů na antibiotikum
- aktivní vyhledávání zdrojů nákazy (nosiči, kontakty)
- provoz kuchyně, zacházení se stravou
- zabránění křížení čistých a nečistých cest a prostředků (strava, prádlo, předměty, pacienti)
- organizace práce z hlediska režimových opatření
- dezinfekční a sterilizační opatření (MÜLLEROVÁ, 2014).

6.2.2 Hygiena provozu

- zdravotní filtr
- hygienické filtry, šatny personálu
- ochranné oblečení, výměna rukavic
- převlékání po opuštění pracoviště
- zákaz jídla, pití, kouření
- mytí a dezinfekce rukou předepsaným postupem
- dodržování zásad osobní hygieny
- pravidelné školení a aplikace nových léčebných postupů

6.2.2 Dezinfekce a sterilace

U dezinfekce se jedná o soubor opatření ke zneškodňování vegetativních forem infekčních agens. K tomuto účelu se podle znalostí cest a mechanismů přenosu infekce používají fyzikální, chemické a kombinované postupy. Tyto postupy mají za úkol ukončit cestu nákazy od zdroje k citlivé osobě (ČERVINKOVÁ, 2010). Významný vliv na účinnou desinfekce má tvorba vrstvy desinfekčního filmu, která na povrchu zůstává i po zaschnutí desinfekčního prostředku, čímž se zvyšuje účinnost likvidace MO. Účinnost chemické dezinfekce bývá odvislá od počtu i druhů mikroorganismů, typu desinfekčního prostředku, použité účinné látky, koncentrace iontů, stability dezinfekčních prvků (KLOUDA a kol., 2010).

Sterilace je proces, kdy jsou odstraněny všechny mikroorganismy z předmětů a prostředí (ČERVINKOVÁ, 2010).

6.2.3 Hygiena rukou

Hygiena rukou je základním opatřením v prevenci infekcí. Jde možná o velmi prostou činnost, ale nedostatky v jejím dodržování u poskytovatelů zdravotní péče jsou celosvětovým problémem. Na základě výzkumu činitelů ovlivňujících dodržování hygieny rukou a strategií podporujících její prosazování byla prokázána účinnost některých nových přístupů. Byla navržena řada strategií na prosazování a zlepšování hygieny rukou a Světová zdravotnická organizace v rámci první globální výzvy ke zvýšení bezpečnosti pacientu „Čistá péče je bezpečnější“ zaměřuje část své pozornosti na zlepšování standardu praxe hygieny rukou při poskytování zdravotní péče a současně na zavádění úspěšných přístupů (SMĚRNICE WHO, 2012).

Dezinfekci rukou je nutné provádět před kontaktem s pacientem, před aseptickými činnostmi, po kontaktu s tělními tekutinami, po kontaktu s pacientem a po kontaktu s okolím pacienta. Dezinfekci rukou je nutné provádět nejméně po dobu 30 sekund s použitím nejméně 3 ml dezinfekčního prostředku. Zdravotnický personál nesmí mít žádné šperky, prsteny, hodinky na ruku, nehty musí být krátce střižené, nenalakované, nejsou povoleny umělé nehty. Rukavice je nutné použít při kontaktu s biologickým materiálem (HANZLÍKOVÁ, 2011). Hygiena rukou pracovníků je velmi ovlivněna do-

stupností k možnosti mytí rukou. Problémem bývá také přítomnost nemocných pracovníků na pracovištích (JAMES, 2006).

7 NAKLÁDÁNÍ S ODPADY VE ZDRAVOTNICTVÍ

Základním cílem, který musí být při nakládání s odpady ze zdravotnictví splněn je zajištění bezpečnosti a ochrany zdraví pracovníků během celého procesu nakládání se zdravotnickými odpady, počínaje vznikem zdravotnického odpadu až po jeho bezpečné odstranění (MILKOVÁ a kol., 2015).

Důležitý je správný systém nakládání se zdravotnickým odpadem, tento systém musí být založen na důkladném třídění odpadů a musí vést ke snížení celkového množství odpadů a to především odpadů charakterizovaných jako nebezpečné. Pro to, aby byla zajištěna ochrana veřejného zdraví, a v neposlední řadě také ochrana životního prostředí je nezbytné, aby nakládání s tímto odpadem bylo bezpečné. V celém cyklu během nakládání až po odstranění zdravotnických odpadů musí být dodržována pravidla, která vedou k ochraně lidského zdraví i životního prostředí, bez ohledu na technologie použité k úpravě a odstranění odpadů.

Dodržování provozního řádu (instrukcí) je základní podmínkou, pro bezpečné nakládání s odpady ze zdravotnických zařízení i jejich konečné zpracování.

7.1 Instrukce pro nakládání s odpady ze zdravotnictví

Součástí provozního řádu pro nakládání se zdravotnickými odpady jsou jednotlivé postupy od nakládání s odpady v místě jejich vzniku až po jejich konečné zpracování či likvidaci, instrukce platí pro celé zdravotnické zařízení i pro všechna oddělení. Provozní řád obsahuje veškeré informace a poznávací údaje včetně identifikačního čísla, telefonního čísla, adresy původce odpadů, adresy příslušných úřadů obcí či krajského úřadu, dále jsou součástí důležitá telefonní čísla (hasičského záchranného sboru, záchranné služby, policie, aj.). Součástí každého provozního řádu musí být pokyny pro manipulaci, shromažďování odpadů, přesně stanovené místa pro ukládání odpadů a základní údaje o osobě, která provádí odvoz odpadů, pokyny pro řešení vzniklé havárie, nápravná opatření a další. Jsou zde uvedeny také:

- a) seznamy zařazení vzniklého odpadu dle Katalogu odpadů
- b) charakteristiky odpadů vznikajících u původce
- c) rozdělení jednotlivých druhů odpadů do kategorií

d) umístění bezpečnostních listů odpadů

Kroky a) – c) spadají do činností a povinností původce odpadů a provádí se přímo v místě jejich vzniku. Veškeré povinnosti původce odpadů i náležitosti provozního řádu zdravotnického nařízení jsou k dispozici na stránkách Státního zdravotního ústavu, který je pod záštitou Ministerstva životního prostředí pod odkazem <http://www.szu.cz/uploads/documents/chzp/puda/priloha4Z.pdf>.

Zdravotnická zařízení musí mít v provozním řádu obsaženo, jak má být nakládáno s mrtvými i mrtvě narozenými těly, včetně jejich částí, kam se řadí i amputované končetiny nebo orgány. Veškeré nakládání s tímto nebezpečným biologickým odpadem musí probíhat v souladu s platnou legislativou (MŽP, 2009).

7.2 Sběr odpadů ze zdravotnických zařízení a jeho třídění

Dle platné legislativy České republiky je každý původce odpadů povinen odpady třídit už v místě vzniku odpadů. Oddělený sběr odpadů nebo také shromažďování odpadů probíhá na každém pracovišti, tedy v každé části nemocnic a zdravotnických zařízení. Na transfuzním oddělení se jedná o všechny odběrové sály, evidenci dárců až po samotné šokové mražení aferetické plazmy.

Pro třídění odpadu jsou využívány oddělené sběrné nádoby. Každý sběrný prostředek musí svou strukturou odpovídat danému shromažďovanému odpadu, hlavně jeho povaze (např. plastové pytle musí být vyrobeny z pevného materiálu, nádoby na ostrý odpad musí být rovněž dostatečně pevné). Prostředky na nebezpečný odpad musí mít schopnost pevného uzavření a následného označení. Neoddělený sběr a skladování odpadů je možný pouze po udělení výjimky k netřídění příslušným státním orgánem, dle platné legislativy.

7.2.1 Třídění odpadů

Za dodržování třídění odpadů v místě jejich vzniku odpovídají na odděleních vrchní/staniční sestry, vedoucí laboranti nebo jimi pověřený zaměstnanec. Tito pověření pracovníci odpovídají za vhodnost umístění shromažďovacích nádob a vyhovující četnost svozu, za vyhovující technický stav shromažďovacích nádob, do jedné nádoby bu-

de ukládán odpad jen se stejným katalogovým číslem odpadu (MILKOVÁ a kol., 2015). Jednotlivé druhy odpadů jsou vytríděny ve shromažďovacích prostředcích k tomu určených (řádně označených) v závislosti na povaze odpadů. V nemocnicích a ostatních zařízeních je důležité oddělené třídění odpadů, třídění je závislé na jeho následném odstranění, proto jsou odpady umisťovány v oddělených nádobách k tomu určených (MŽP, 2009). Nádoby pro sběr odpadů jsou označovány katalogovým číslem, dle rozdělení jednotlivých odpadů podle Katalogu odpadů na druhy, jak je uvedeno v *tabulce č. 1* viz výše, krom nebezpečného odpadu jsou ve zdravotnických střediscích označeny také např. nádoby na sklo, plasty nebo komunální odpad.

7.2.2 Míšení nebezpečných odpadů

Vzájemné smíšení zdravotnických odpadů není dovoleno. Nebezpečné odpady se nesmí mísit vzájemně a ani s odpady ostatními, při nedodržení tohoto pravidla daného vyhláškou, může dojít k ohrožení zdraví lidí. U odpadů vzniklých ve zdravotnických zařízeních je z hledisky snížení možného rizika nákazy, nutné přísně dodržovat oddělené shromažďování odpadů a to zejména u nebezpečných ostrých odpadů a ostatních infekčních odpadů či léčiv a to až do jejich úpravy nebo konečného zneškodnění.

7.2.3 Shromažďování odpadů

Odpady se shromažďují na určených shromažďovacích místech (MILKOVÁ a kol., 2015). Ve zdravotnických zařízeních jsou prostředky pro sběr odpadů vyklizeny denně. U pracovišť, jako je transfuzní oddělení se odvoz odpadu provádí každý den po ukončení směny, nepřetržitý provoz má pak údržbu sběrných nádob s odpadem zajištěnou nejpozději každých 24 hodin (MŽP, 2009).

– Požadované vlastnosti shromažďovacích prostředků ve zdravotnictví

Kvalita i pevnost shromažďovacího prostředku odpovídá vlastnostem shromažďovaného nebezpečného materiálu. Sběrné prostředky, tedy nádoby, pytle musí mít odpovídající pevnost, která zabrání ztrátě odpadu během manipulace, popřípadě poranění personálu. Přesně je také stanoven maximální objem plastových pytlů i jejich minimální tloušťka (nebezpečný odpad 0,1 mm, infekční odpad 0,2 mm). Mezi další stanovené parametry patří maximální objem naplnění. Požadavek u pevných nádoby je nepropíchn-

nutelnost, jelikož se tyto nádoby používají převážně pro ostrý odpad, a možnost pevného uzavření po ukončení sběru. Přesné požadavky na shromažďovací prostředky pro nebezpečný odpad jsou stanoveny ve vyhlášce 383/2001. Dle dohod ADR a RID jsou brány jako nevhodné shromažďovací obaly, obaly vyrobené z papíru, ty neodpovídají požadavkům na bezpečnost zdravotnických odpadů, jsou snadno propíchnutelné a dají se lehce poškodit.

Z vyhlášky 83/2016 vyjímám část, týkající se vymezených pravidel pro shromažďovací prostředky: „Jako shromažďovací prostředky nebezpečných odpadů mohou sloužit zejména speciální nádoby, kontejnery, obaly, jímky a nádrže, které splňují dále zmíněné technické požadavky“:

- a) rozlišení shromažďovacích prostředků odpadů je dáno tvarem, barevným odlišením nebo popisem od prostředků, které nejsou pro používány pro nakládání s odpady, odlišení se týká také jednotlivých druhů odpadů,
- b) shromažďovací prostředky musí zajistit ochranu odpadů před povětrnostními podmínkami, v případě, že jsou umístěny mimo chráněnou budovu,
- c) nádoby musí být odolné vůči chemickým látkám, pro jejichž shromažďování jsou určeny,
- d) Pokud jsou shromažďovací prostředky používány i pro přepravu, podléhají zvláštním právním požadavkům pro přepravu nebezpečných materiálů,
- e) technickým normám musí podléhat také shromažďovací prostředky, určené pro komunální odpad,
- f) shromažďovací prostředky musí zabezpečit ochranu okolí před prašností svým provedením nebo v kombinaci s technickým provedením, to se týká hlavně spaloven
- g) musí zajistit zabezpečení odpadů, před znehodnocením, zneužitím, krádeží, nežádoucím míšením s jinými druhy, popřípadě jeho úniku do prostředí,
- h) po vyprázdnění musí nádoby umožnit svou konstrukcí obsluhu spojenou s desinfekcí a čištěním.

Ve vyhlášce 83/2016 je uvedena také významná část, týkající volby sběrného místa, tato část vyhlášky zde bude citována: Při volbě shromažďovacího místa nebo umístění

shromažďovacího prostředku musí být zohledněny otázky bezpečnosti při jeho obsluze, požární bezpečnosti, jeho dostupnosti a možnosti obsluhy mechanizačními a dopravními prostředky.

V blízkosti shromažďovacího prostředku nebezpečného odpadu nebo shromažďovacího místa nebezpečného odpadu nebo na nich musí být umístěn identifikační list shromažďovaného odpadu.

Na shromažďovacím prostředku nebezpečného odpadu musí být uvedeno katalogové číslo a název shromažďovaného nebezpečného odpadu a jméno a příjmení osoby odpovědné za obsluhu a údržbu shromažďovacího prostředku“.

– **Značení shromažďovacích prostředků nebezpečného odpadu**

Prostředky, které slouží k shromažďování odpadů, musí být řádně označeny identifikačním listem pro nebezpečný odpad. Značení musí být umístěno také na viditelném místě u každé sběrné nádoby. Každý prostředek musí mít na identifikačním štítku zařazení odpadu, dle Katalogu odpadů, zodpovědnou osobu za nebezpečný odpad, grafický symbol a další. Jako označení odpadů se využívá také barevného rozlišení, jednotlivé barvy, pak značí způsob likvidace odpadů, přesné údaje značení jsou stanoveny platnou legislativou České republiky. Značení nebezpečných odpadů je uvedeno ve vyhlášce 83/2016.

7.2.4 Manipulace s nebezpečnými odpady

Při manipulaci s nebezpečnými odpady je nutno zajistit, aby každý zaměstnanec ve vlastním zájmu dbal na bezpečnost a ochranu zdraví při práci a snažil se tak zabránit pracovním úrazům nebo nemocem z povolání. Zároveň musí být zabráněno ohrožení životního prostředí (MILKOVÁ a kol., 2015).

7.2.5 Sklady a skladovací prostředky

U zdravotnických zařízení jsou sklady pro zdravotnický odpad umístovány v objektu zařízení. Odpady ze zdravotnictví jsou skladovány v oddělených místnostech či budovách v kontejnerech nebo v pytlích. Skladovací prostory musí svými parametry

odpovídat objemu produkovaného odpadu a jeho denní kumulaci. Ve vyhlášce jsou stanoveny technické požadavky, kterým musí podléhat sklady i skladovací prostředky.

U skladů pro skladování nebezpečných prostředků platí, že tyto prostory musí být před zahájením provozu schváleny a zkolaudovány danými úřady, dále zde musí být umístěny identifikační listy u nebezpečných odpadů. Velký důraz je kladen na skladování nebezpečných odpadů, které mají aspoň jednu nebezpečnou vlastnost, uvedenou v zákoně o odpadech nebo mají vlastnosti chemických látek.

Veškeré skladovací prostory musí být lehce přístupné pro vyčištění, které má být prováděno vždy po vyprázdnění skladu. Sklady také podléhají provoznímu řádu dle vyhlášky (MŽP, 2009).

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

8 MATERIÁL A METODY

Modelový experiment byl založen na odběru třech sérií po 18 vzorcích, které byly odebrány v pravidelných měsíčních intervalech v období od 21. 10. – 18. 12. 2015 na sběrných nádobách pro nebezpečný odpad. Tyto nádoby jsou umístěny na všech odběrových sálech na transfuzním oddělení v Novém Jičíně. V každé sběrné nádobě je umístěn pytel, který je každý den měněn.

Pro odběr vzorku byla zvolena stěrová metoda, která byla provedena pomocí suchého sterilního tamponu umístěného ve zkumavce. Odběr vzorků probíhal za plného provozu TO. Denní množství dárců na našem oddělení se pohybuje okolo 70 dárců, množství dárců odpovídá také produkci odpadu, kdy pro každého dárce je nachystán jednorázový odběrový set.

Kultivace a vyhodnocení vzorků proběhlo v mikrobiologické laboratoři pomocí přístroje s detekcí změny zbarvení živných půd, které se projeví po mikrobiální činnosti, tedy po uvolnění CO₂ ze substrátu. Další vyhodnocování pak bylo provedeno pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF. U možné patogenní mikroflóry byla vyhodnocena také citlivost k antibiotikům diskovou difuzní metodou European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - EUCAST.

Vzhledem k finanční náročnosti metodických postupů bylo bohužel znemožněno získání dostatečného množství souborů dat, které by se staly podkladem pro statistické vyhodnocení. Celková statistika výsledků tedy v této práci nebyla provedena

8.1 Pracovní postup

8.1.1 Odběr vzorků

Vzorky byly odebírány ze shromažďovacích prostředků na nebezpečný odpad, které jsou zařazeny pod katalogové číslo podle Katalogu odpadů 18 01 03 a 18 01 01. Tedy odpady, na jejichž sběr a odstraňování jsou vznášeny zvláštní požadavky s ohle-

dem na předcházení infekce a odpady ostré. Tyto odpady jsou shromažďovány v nášlapných shromažďovacích nádobách a klinik boxech (ostrý odpad), které podléhají přísným pravidlům značení i manipulace. Veškeré odběry proběhly v plném provozu oddělení na všech třech odběrových sálech vždy na dvou nášlapných shromažďovacích nádobách a na jednom klinik boxu.

Odběr vzorků z těchto nádob byl proveden stěrovou metodou. Vzorky byly odebrány pomocí suchého bavlněného tamponu, tedy špejle s vatovým smotkem v dlouhé plastové zkumavce, ze sběrných nádob vždy na ploše 20 cm², která byla vyznačena pomocí sterilní šablony. Povrch, ze kterého byl odebírán vzorek, byl setřen desetkrát odshora dolů.

Vždy byly provedeny stěry z vnitřní části víka a vnitřku vloženého pytle na nášlapných nádobách a stěry vnější stěny a okraje otvoru klinik boxu. Stěry byly provedeny vždy až po naplnění sběrné nádoby pro přesnost vyhodnocení. Přehled provedených odběrů vzorků je uveden v tabulce č. 2. Ihned po stěru byl tampon vrácen do sterilní zkumavky, řádně označen a dopraven do laboratoře.

Tabulka č. 2 *Přehled odebraných vzorků*

Odběrový sál č.	Vzorek	Datum 2015		
1	Sběrná nádoba nášlapná – víko uvnitř	21.10.	26.11.	18.12.
1	Sběrná nádoba nášlapná – sběrný pytel	21.10.	26.11.	18.12.
1	Sběrná nádoba nášlapná - víko uvnitř	21.10.	26.11.	18.12.
1	Sběrná nádoba nášlapná - sběrný pytel	21.10.	26.11.	18.12.
1	Klinik box – okraj otvoru	21.10.	26.11.	18.12.
1	Klinik box – vnější stěny	21.10.	26.11.	18.12.
2	Sběrná nádoba nášlapná – víko uvnitř	21.10.	26.11.	18.12.
2	Sběrná nádoba nášlapná – sběrný pytel	21.10.	26.11.	18.12.
2	Sběrná nádoba nášlapná - víko uvnitř	21.10.	26.11.	18.12.
2	Sběrná nádoba nášlapná - sběrný pytel	21.10.	26.11.	18.12.
2	Klinik box – okraj otvoru	21.10.	26.11.	18.12.
2	Klinik box – vnější stěny	21.10.	26.11.	18.12.
3	Sběrná nádoba nášlapná – víko uvnitř	21.10.	26.11.	18.12.
3	Sběrná nádoba nášlapná – sběrný pytel	21.10.	26.11.	18.12.
3	Sběrná nádoba nášlapná - víko uvnitř	21.10.	26.11.	18.12.
3	Sběrná nádoba nášlapná - sběrný pytel	21.10.	26.11.	18.12.
3	Klinik box – okraj otvoru	21.10.	26.11.	18.12.
3	Klinik box – vnější stěny	21.10.	26.11.	18.12.

8.1.2 Příprava živných pŮd

MacConkey agar

Pro přípravu MacConkey agaru jsme použili 51,5 g základu, který obsahuje ve stanoveném poměru pankreatickou natráveninu želatiny, pankreatickou natráveninu kaseinu, peptické natráveniny zvířecí tkáně, laktózu, žlučové soli, chlorid sodný, neutrální červeň, krystalovou violet a agar. Tento základ jsme rozpustili v 1000 ml destilované vody, baňky byla uzavřena vatovou zátkou, která byla obalena alobalem. Baňku jsme zahřívali do úplného rozpuštění a sterilizovali 15 minut v autoklávu při 121 °C.

Krevní agar (KA)

Při přípravě Columbia KA jsme rozpustili 44 g základu, který je vyroben z přírodního polysacharidu agaru s příměsí krve, v 1000 ml destilované vody a sterilizovali 15 minut v autoklávu při 121 °C. Po ochlazení na 50 - 60 °C jsme přidali 7 % defibrinované beraní krve.

Mueller-Hinton agar (MH)

Po homogenizaci prášku v lahvi jsme navážili 35g agaru, který byl rozpuštěn v 1000 ml čerstvě destilované vody. Obsah jsme zahřáli k varu až do úplného rozpuštění prášku a sterilizovali při 120 °C po dobu 15 minut

8.1.3 Detekce přítomnosti mikroorganismů

V laboratoři byly stěry vloženy a kultivovány v kultivační lahvi s glukózovým bujónem, který se používá pro kultivaci široké škály mikroorganismů včetně náročnějších druhů. Tato půda je připravena z kaseinového peptonu 10,0 g/l, hovězího extraktu 10,0 g/l, chloridu sodného 5, 0 g/l a glukózy v množství 10,0, g/l. Výsledné pH se pohybuje okolo $7,5 \pm 0,2$. V této tekuté pomnožovací živné půdě byly mikroorganismy kultivovány při 37°C přístroji BacT/ALERT po dobu 9 dnů.

BacT/ALERT

Jedná se o zcela automatizovaný testovací systém schopný inkubovat, míchat a průběžně sledovat za aerobních i anaerobních podmínek činnost mikroorganismů. Po umístění kultivačních lahví do zařízení již není nutné se vzorkem nijak manipulovat. Vzorky jsou označeny čárovými kódy, které si BacT/ALERT automaticky načítá.

Jsou-li v testovaném vzorku přítomny mikroorganismy, je kultivační substrát metabolickými procesy mikroorganismů rozkládán na oxid uhličitý (CO₂). Při růstu mikroorganismů je zvyšována produkce CO₂ a dochází ke změně barvy kultivačního média. Změna barvy je detekována kolorimetricky, tato metoda je založena na porovnání intenzity zabarveného roztoku vzorku s čistým vzorkem kultivačního média. Odražené světlo se měří pomocí polovodičového fotodetektoru. Čím větší je generace CO₂, tím je zvýšen také odraz světla. Barevné odchylky jsou měřeny každých 10 minut pro včasnou detekci MO.

V případě, že je počáteční obsah CO₂ vysoký nebo je produkce CO₂ ve vzorku neobvykle rychlý či trvalý, systém vzorek vyhodnotí jako pozitivní. Ihned po zjištění pozitivního výsledku je toto indikováno na displeji přístroje a pozitivita je také oznámena zvukovým pípnutím. Po vytažení vzorků z BacT/ALERTU, bylo pozitivitu možno hodnotit vizuálně, kultivační médium bylo zakalené v tomto případě, byl vzorek vyočkován na pevná kultivační média.

Pokud se hladina CO₂ po nastavenou dobu významně nemění, vzorek je vyhodnocen jako negativní. Veškeré výsledky jsou automaticky přenášeny do informačního systému laboratoře. Vzorky jsou ze zařízení vytahovány individuálně.

8.1.4 Mikroskopie

Mikroskopická pozorování preparátů byla prováděna po obarvení suspenze dle Grama. Na základě tohoto barvení lze odlišit mikroorganismy na grampozitivní a gramnegativní v závislosti na chemickém složení buněčné stěny obou skupin bakterií.

Barvení podle Grama

Na podložní skličko připravíme nátěr testované bakteriální kultury a dokonale vysušíme nad plamenem – fixace. Převrstvíme krystalovou violetí, kterou necháme působit po 30 sekund, barvivo slijeme a krátce opláchneme destilovanou vodou. Převrstvíme Lugolovým roztokem opět na dobu 30 sekund, barvivo slijeme a krátce opláchneme destilovanou vodou. Preparát odbarvujeme etanolem nebo acetonem – 20-30 sekund, opláchneme destilovanou vodou. Dobarvíme zředěným karbolfuchsinem nebo safraninem, barvivo slijeme a opláchneme destilovanou vodou. Preparát osušíme a pozorujeme s využitím olejové imerzeobjektivem zvětšujícím 100 x.

Hodnocení: grampozitivní mikroorganismy jsou zbarveny tmavě fialově až modročerně, gramnegativní bakterie jsou zbarveny červeně nebo růžově.

8.1.5 Vyočkování mikroorganismů

Po vyhodnocení kultivace v pomnožovacím médiu (glukózový bujón), byly pozitivní vzorky vyočkovány na pevnou živnou půdu s MacConkey agarem a na krevní agar.

- **MacConkey agar**

Jedná se o selektivně - diagnostické médium pro izolaci a rozlišení druhů *Enterobacteriaceae* a dalších gramnegativních tyček ze vzorků. Na litr tohoto agaru je potřeba pankreatickou natráveninu želatiny 17,0 g, pankreatickou natráveninu kaseinu 1,5, peptické natráveniny zvířecí tkáně 1,5, laktózu 10,0, žlučové soli 1,5, chlorid sodný 5,0, neutrální červeň 0,03, krystalovou violet 0,00, agar 13,5. Výsledné pH by se mělo pohybovat v rozmezí $7,1 \pm 0,2$. Pokud tomu tak není, pH se upraví pufrý.

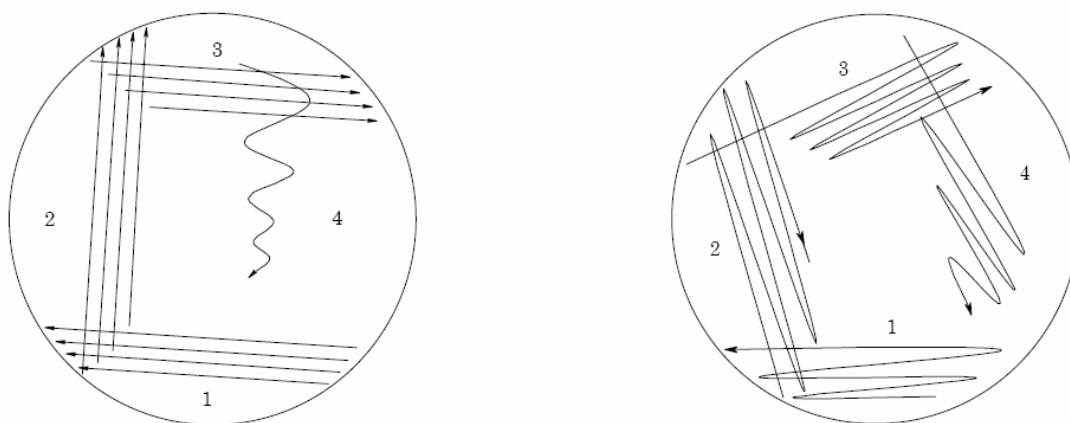
Výživnou složkou pro MO je směs několika druhů peptonů. Naopak jako selektivní složka zde funguje krystalická violet, která inhibuje růst doprovodné grampozitivní bakteriální flóry ze vzorku. Dalším selektivní a zároveň podpůrnou složkou jsou žlučové kyseliny, které inhibují růst doprovodné mikroflóry a zároveň podporují růst čeledi *Enterobacteriaceae*.

- **Krevní agar**

Krevní agar je jedna z nejpoužívanějších kultivačních půd, je vhodná pro kultivaci většiny běžných MO. Slouží k diagnostice patogenních bakterií, které rozlišujeme dle jejich hemolytických vlastností. Krevní agar je vyráběn přidávkem 5–10% krve (beraní erythrocyty) k chladnoucemu Columbia agar.

Očkování půdy a kultivace

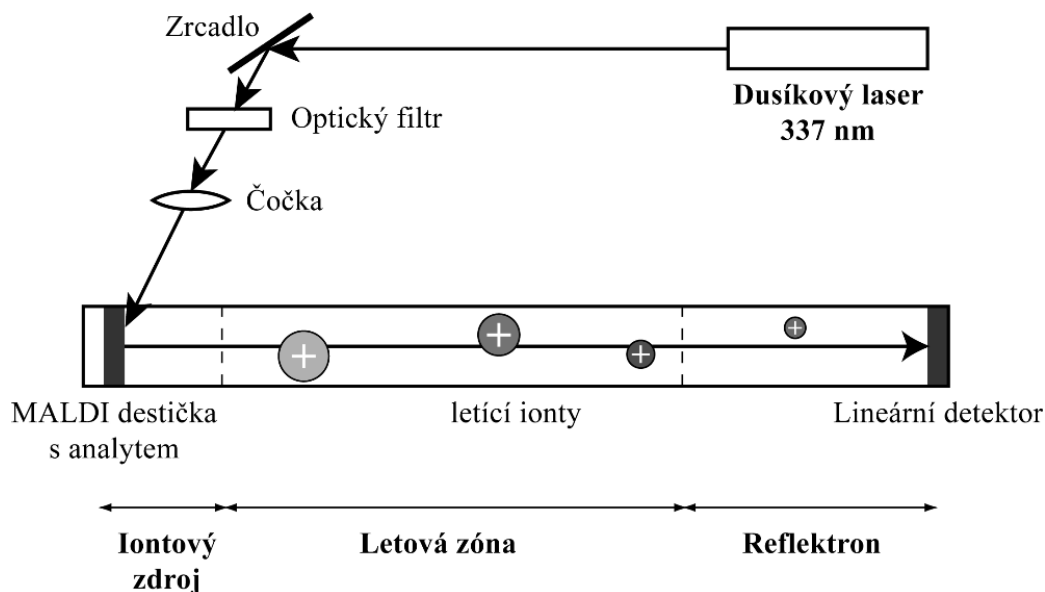
Na ztuhlé kultivační médium v Petriho misce byla pomocí vyžíhané očkovací kličky nanášena suspenze ze vzorku křížovým roztěrem tak, aby byly po kultivaci získány izolované dobře odlišitelné kolonie (viz Obr. č. 1). Kultivace probíhala 24 hod při 37 °C v termostatu. Po uplynutí této doby byl hodnocen růst kolonií, u některých vzorků došlo k nárůstu bakterií ve směsi, tyto vzorky byly izolovány na krevní agar pro získání čisté kultury a opět byly kultivovány při teplotě 37°C na 24 hodin. Po skončení kultivace byla provedena makroskopická identifikace. Byla hodnocena velikost a tvar kolonií, přítomnost hemolýzy, případně tvorba pigmentu. Misky byly ponechány do druhého dne při pokojové teplotě pro další kontrolu tvorby hemolýzy. Vzrostlé kolonie bakterií byly identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF MS.



Obr. č. 1 Křížový roztěr

8.1.6 Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF

Identifikace mikroorganismů pomocí metody MALDI-TOF MS je vysoce přesná, rychlá a aplikovatelná pro široké spektrum mikroorganismů a mnohem rychlejší ve srovnání s tradičními metodami (KOMÍNKOVÁ a kol., 2014). Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF patří mezi *chemotaxonomické metody*. Proces identifikace je založen na analýze ribosomálních a dalších proteinů v buňce. Ribosomální proteiny představují asi 20 % veškerých buněčných bílkovin a asi 3 % celkové hmoty. Tyto makromolekuly jsou specifické pro jednotlivé bakteriální druhy a díky tomu mohou být považovány za vhodné biomarkery (BURSOVÁ a kol., 2014).



Obr. č. 2 Schéma přístroje MALDI-TOF MS

Pro každý kmen je vytvořeno *hmotnostní spektrum*, neboli profil jeho proteomu. Toto hmotnostní spektrum je zobrazením četnosti ionizovaných částic buněčného proteomu. Profily proteinů jsou pro daný druh mikroorganismu vysoce charakteristické. Vlastní identifikace mikroorganismů následně spočívá ve srovnávání proteinového spektra izolátu se spektry referenčních kmenů v *datábázi* MALDI Biotyper. Z matice podobnosti spekter se provádí klastrová (shluková) analýza. Shluky podobnosti se zobrazují jako *dendrogram* (druh diagramu). Na základě získaného dendrogramu je založena klasifikace v rámci rodu, druhu, a v některých případech i poddruhu či typizace kmene. Výsledek je možné získat během několika minut (BURSOVÁ a kol., 2014).

Pracovní postup

U vykultivovaných vzorků mikroorganismů byla nejprve provedena extrakce pomocí chemického rozpouštědla acetonitrilu, aby došlo k rozrušení buněčných proteinů v buněčné stěně. Čisté 24 hodinové bakteriální kultury byly resuspendovány a inaktivovány v 75% ethanolu. Po centrifugaci a důkladném odstranění supernatantu byla k buňkám přidána *matrice* (derivát kyseliny benzoové) v poměru 1:10⁴. Směs byla nanášena na speciální destičku z nerezové oceli, která je inertní vůči matici a rozpouštědlům. Na této kovové destičce se může analyzovat až 384 izolátů. Po vysušení vzorků při pokojové teplotě je destička umístěna do hlubokého vakua (10⁻⁴ Pa) v iontovém zdroji hmotnostního spektrometru a proběhne analýza MALDI-TOF MS.

Touto metodou byl zjištěn výskyt patogenní bakterie *Staphylococcus aureus*, který byl ve všech případech k metilcilinu senzitivní a dále byl u jednoho vzorku zjištěn výskyt bakterie *Pantotea septica*. U kolonií těchto bakterií byla dále stanovena citlivost vůči antibiotikům.

8.1.7 Stanovení citlivosti patogenních mikroorganismů k antibiotikům metodou EUCAST

Citlivost k antibiotikům je stanovena v případě, že jsou ve vzorcích detekovány patogenní mikroorganismy. K určení citlivosti MO k antibiotikům byla použita disková difuzní metoda, která je jednou z nejpoužívanějších metod v klinických laboratořích. Pro stanovení citlivosti bakterií k antibiotikům byla použita půda Mueller-Hinton agar.

- **Mueller-Hinton agar**

MH agar se používá k testování nenáročných mikrobů diskovou metodou. Jeden litr tohoto MH agaru je složen z peptonů 3g/l, kaseinového hydrolyzátu 17,5 g/l, agaru 15g/l, Ca²⁺ 20-25 mg/l, Mg²⁺ 10-12,5 mg/l. Konečné pH je v rozmezí 7,4 ± 0,2. Výška agaru byla 4 mm.

Příprava inokula

Pomocí fyziologického roztoku byly kolonie extrahovány z bavlněného tamponu tak, aby homogenní, viditelný zákal odpovídal McFarlandovu standardu 0,5.

Očkování půdy a kultivace

Při inokulaci ploten byl nový bavlněný tampon ponořen do suspenze a přebytečná tekutina byla odstraněna rotací tamponu po vnitřní stěně zkumavky. Při očkování musí mít plotny pokojovou teplotu. Inokulum bylo roztíráno tamponem ve třech směrech tak, aby byl naočkován celý povrch plotny. Na plotny byly po inokulaci aplikovány disky s antibiotiky, vše bylo provedeno do 15 minut od inokulace ploten. Pro každý vzorek byly použity dvě Petriho misky se ztuhlým agarem. Na každou misku byly umístěny čtyři disky s antibiotiky v dostatečné vzdálenosti, aby bylo zabráněno překrývání inhibičních zón. Tím bylo zajištěno spolehlivé měření průměrů zón. Po aplikaci disků byly plotny obráceny víčkem dolů a daly se kultivovat při 35°C/16 -20 hodin.

Odečítání zón

Po kultivace byly plotny odečítány ze spodní strany proti tmavému pozadí v odraženém světle pomocí posuvného měřítka.

9 VYHODNOCENÍ STĚRŮ

Přítomnost bakterií ve stěrech odebraných z provozních ploch, tedy sběrných nádob na nebezpečný odpad byla zkoumána nárůstem kolonií na specifických půdách, dále byla stanovována citlivost některých patogenních mikroorganismů na antibiotika. Bylo sledováno mikrobiální zastoupení jednotlivých rodů mikroorganismů a jejich případný negativní vliv na lidské zdraví.

V první sérii byly sledovány převážně bakterie, které jsou běžnými kolonizátory kůže a sliznice člověka, vyskytují se také na předmětech a v prostředí a jsou označovány jako „všudypřítomné“. Jednalo se hlavně o zástupce rodu *Staphylococcus*., kteří byli vykultivováni v 10 odebraných vzorcích. U všech těchto vzorků byly tyto bakterie prokázány jako koaguláza negativní, což znamená, že neprodukují enzym, který je schopen koagulovat plazmu. Takže tyto bakterie nejsou patogeny. Dalším běžným zástupcem je rod *Bacillus sp.*, který je rovněž všudypřítomný a z hlediska možné nákazy je nevýznamný. Oba tyto rody byly vykultivovány u všech následujících odběrů a byly zastoupeny v největších počtech. Jedinou patogenní bakterií v této sérii stěrů byl *Staphylococcus aureus*, který je významným patogenem. Na krevním agaru byly pozorovány typické zlatožluté kolonie s β - hemolýzou. Po kultivaci metodou EUCAST bylo zjištěno, že se jedná o druh, který je k antibiotikům senzitivní. Tedy nešlo o významnějšího zástupce MRSA.

Na klasických sběrných nádobách byl pozorován největší výskyt bakterií na vnitřní straně víka, které je při naplnění koše nejčastěji v kontaktu s biologickým materiálem. V těchto vzorcích byly opět sledovány pouze bakterie, které se běžně vyskytují v prostředí i na lidské kůži jako běžná mikroflóra. Jednalo se o rody *Bacillus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus* - koaguláza neg., ojediněle kvasinky.

Následující tabulka shrnuje množství zastoupení MO ve stěrech odebraných 21. 10. 2015.

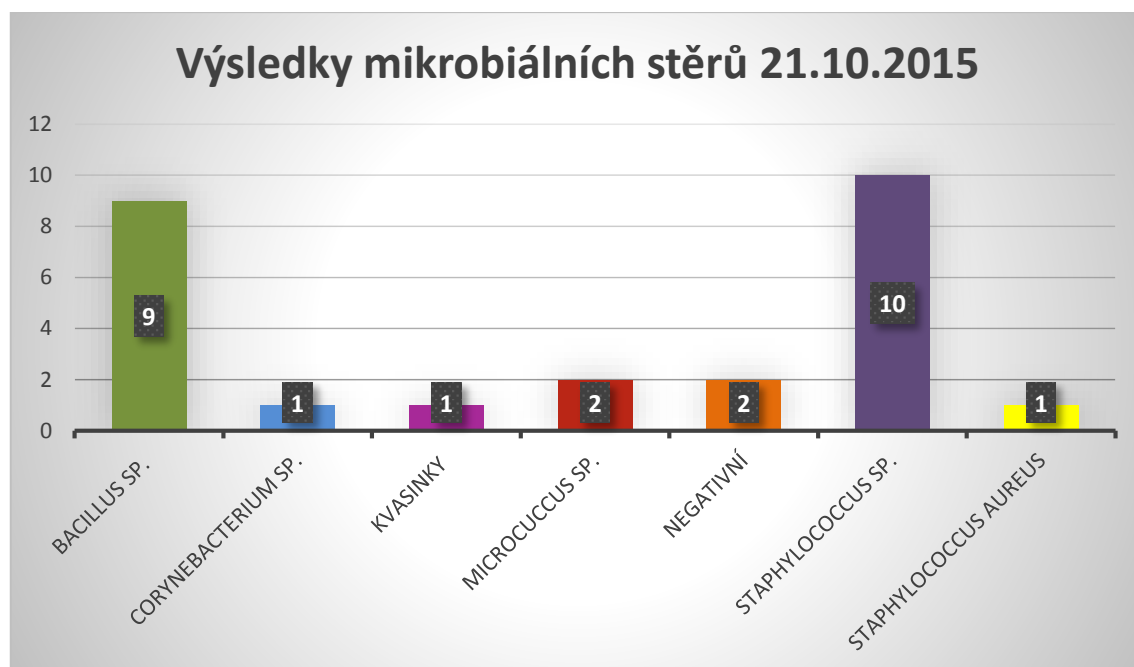
Tabulka č. 3 Výsledky stěrů 21. 10. 2015

Datum odběru vzorů 21. 10. 2015		
Sál	Vzorek	Nález
sál č. 1	Sběrná nádoba nášlapná – víko uvnitř	Bacillus sp., Micrococcus sp., Staphylococcus sp. - koaguláza neg., Ojedinele kvasinky
sál č. 1	Sběrná nádoba nášlapná – sběrný pytel	Negativní
sál č. 1	Sběrná nádoba nášlapná - víko uvnitř	Bacillus sp. Staphylococcus sp. – koaguláza neg.
sál č. 1	Sběrná nádoba nášlapná - sběrný pytel	Bacillus sp.
sál č. 1	Klinik box – okraj otvoru	Staphylococcus sp. – koaguláza neg.
sál č. 1	Klinik box – vnější stěny	Bacillus sp.
sál č. 2	Sběrná nádoba nášlapná – víko uvnitř	Staphylococcus sp. – koaguláza neg.
sál č. 2	Sběrná nádoba nášlapná – sběrný pytel	Staphylococcus sp. – koaguláza neg.
sál č. 2	Sběrná nádoba nášlapná - víko uvnitř	Bacillus sp.
sál č. 2	Sběrná nádoba nášlapná - sběrný pytel	Staphylococcus sp. – koaguláza neg.
sál č. 2	Klinik box – okraj otvoru	Bacillus sp.
sál č. 2	Klinik box – vnější stěny	Bacillus sp.
sál č. 3	Sběrná nádoba nášlapná – víko uvnitř	Bacillus sp., Micrococcus sp., Corynebacterium sp.
sál č. 3	Sběrná nádoba nášlapná – sběrný pytel	Staphylococcus sp. – koaguláza neg.
sál č. 3	Sběrná nádoba nášlapná - víko uvnitř	Staphylococcus sp. – koaguláza neg.
sál č. 3	Sběrná nádoba nášlapná - sběrný pytel	Negativní
sál č. 3	Klinik box – okraj otvoru	Staphylococcus sp. – koaguláza neg. Bacillus sp.
sál č. 3	Klinik box – vnější stěny	Staphylococcus sp. – koaguláza neg. Staphylococcus aureus OXA+ ERY+ CLI+ COT+ VAN+

U některých vzorků bylo z jednoho místa stanoveno i několik různých rodů. Z hlediska patogenity nejvýznamnější *Staphylococcus aureus* česky známý také jako „zlatý stafylokok“ byl vykultivován na malé sběrné nádobě na nebezpečný ostrý odpad, která slouží pro ukládání použitých odběrových kanyl. *S. aureus* přirozeně osidluje kůži a oblast nosohltanu lidí a zvířat. Při oslabení imunitního systému hostitele je schopen vyvolat různá onemocnění – kožní záněty, alimentární onemocnění, pneumonie, osteomyelitidy, syndrom toxického šoku, syndrom opařené kůže, abscesy, bakteriální endokarditidy a sepse.

Sběrné nádoby – klinik boxy mohou být na pracovišti před jejich přenesením do sběrného místa, odkud jsou pak převezeny k likvidaci, otevřeny 24 hodin od prvního vhození ostrého odpadu. Údaj o vhození prvního ostrého odpadu, tedy datum a čas, je zaznamenán na štítek umístěný na každém klinik boxu z boku nádoby. Výskyt tohoto patogenu byl lokalizován na venkovní stěně tohoto klinik boxu.

V následujícím grafu jsou shrnuty celkové počty všech vykultivovaných mikroorganismů.



Obr č. 3 Vyhodnocení výskytu MO na transfuzním oddělení v Novém Jičíně 21.10.2015

Ve druhé sérii byly opět vykultivovány rody *Staphylococcus* - koaguláza negativní a dále *Bacillus*. V této sérii vzorků byl sledován nárůst typických nepravidelných bělavých až hnědých kolonií rodu *Bacillus* a zjištěn převážný nárůst pouze těchto bakterií.

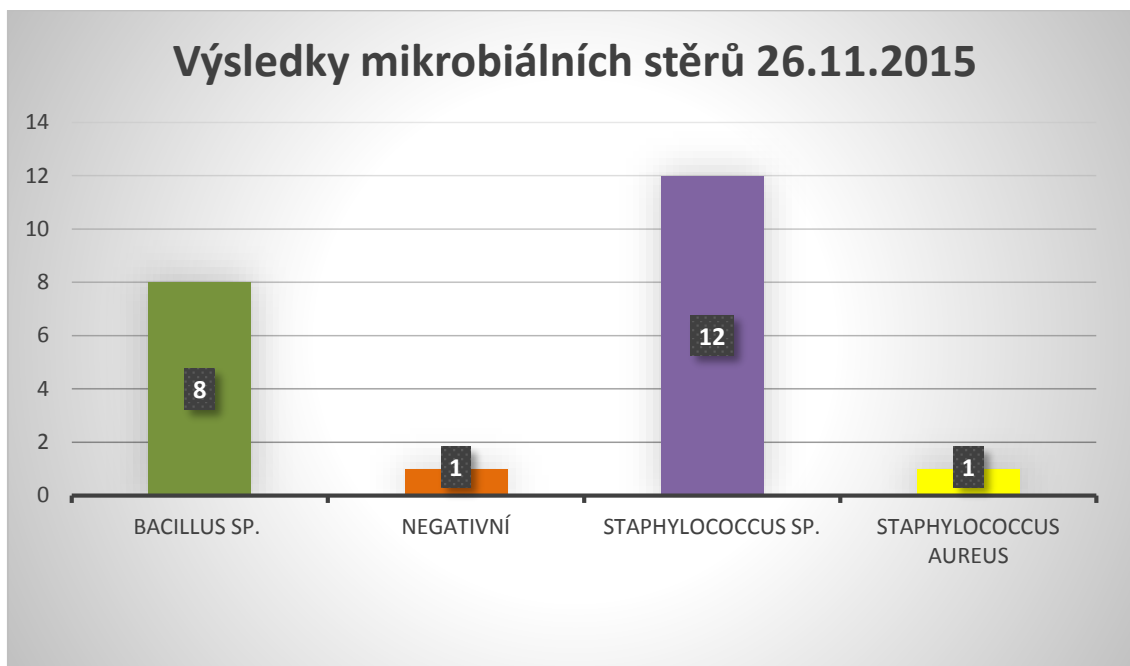
Jediný vzorek byl pozitivní na nález *Staphylococcus aureus* a to byl opět klinik box na venkovní straně nádoby. Na krevním agaru byly pozorovány typické zlatožluté kolonie s β -hemolýzou. Po kultivaci metodou EUCAST bylo zjištěno, že se jedná o druh, který je k antibiotikům senzitivní. Tedy nešlo o významnějšího zástupce MRSA. Tento patogen byl opět senzitivní vůči antibiotikům, tedy na speciálním MH agaru byly pozorovány typické zóny v okolí disků s antibiotiky. Oproti předchozí sérii vzorků se u těchto vzorků neprokázala přítomnost další běžné mikroflóry, zastoupené např. rodem *Micrococcus* či kvasinky. Z celkového množství odebraných vzorků byl pouze jeden klasifikován jako negativní.

Následující tabulka shrnuje výskyt mikroorganismů odebraných stěrů ze dne 26. 11. 2015 a jejich jednotlivé zastoupení v odebraných vzorcích na všech sálech našeho oddělení.

Tabulka č. 4 Výsledky stěrů 26. 11. 2015

Datum odběru vzorů 26. 11. 2015		
Sál	Vzorek	Nález
sál č. 1	Sběrná nádoba nášlapná – víko uvnitř	Staphylococcus sp. – koaguláza neg.
sál č. 1	Sběrná nádoba nášlapná – sběrný pytel	Negativní
sál č. 1	Sběrná nádoba nášlapná - víko uvnitř	Staphylococcus sp. – koaguláza neg. Bacillus sp.
sál č. 1	Sběrná nádoba nášlapná - sběrný pytel	Bacillus sp.
sál č. 1	Klinik box – okraj otvoru	Staphylococcus sp. – koaguláza neg.
sál č. 1	Klinik box – vnější stěny	Staphylococcus sp. – koaguláza neg. Bacillus sp. Staphylococcus aureus OXA+ ERY+ CLI+ COT+ VAN+
sál č. 2	Sběrná nádoba nášlapná – víko uvnitř	Staphylococcus sp. – koaguláza neg.
sál č. 2	Sběrná nádoba nášlapná – sběrný pytel	Staphylococcus sp. – koaguláza neg.
sál č. 2	Sběrná nádoba nášlapná - víko uvnitř	Staphylococcus sp. – koaguláza neg.
sál č. 2	Sběrná nádoba nášlapná - sběrný pytel	Staphylococcus sp. – koaguláza neg.
sál č. 2	Klinik box – okraj otvoru	Staphylococcus sp. – koaguláza neg.
sál č. 2	Klinik box – vnější stěny	Staphylococcus sp. – koaguláza neg. Bacillus sp.
sál č. 3	Sběrná nádoba nášlapná – víko uvnitř	Bacillus sp.
sál č. 3	Sběrná nádoba nášlapná – sběrný pytel	Staphylococcus sp. – koaguláza neg.
sál č. 3	Sběrná nádoba nášlapná - víko uvnitř	Bacillus sp.
sál č. 3	Sběrná nádoba nášlapná - sběrný pytel	Bacillus sp.
sál č. 3	Klinik box – okraj otvoru	Bacillus sp.
sál č. 3	Klinik box – vnější stěny	Staphylococcus sp. – koaguláza neg.

V následujícím grafu jsou shrnuty výsledky kultivací stěrů z odpadových nádob. Výsledky z tohoto měsíce jsou z pohledu zastoupení bakteriálních rodů nejnepohodlnější. V této sérii byly vykultivovány pouze bakterie rodu *Bacillus*, *Staphylococcus*. Nejpočetnější zastoupení má opět rod *Staphylococcus*.



Obr. č. 4 Vyhodnocení výskytu MO na transfuzním oddělení v Novém Jičíně 26.11.2015

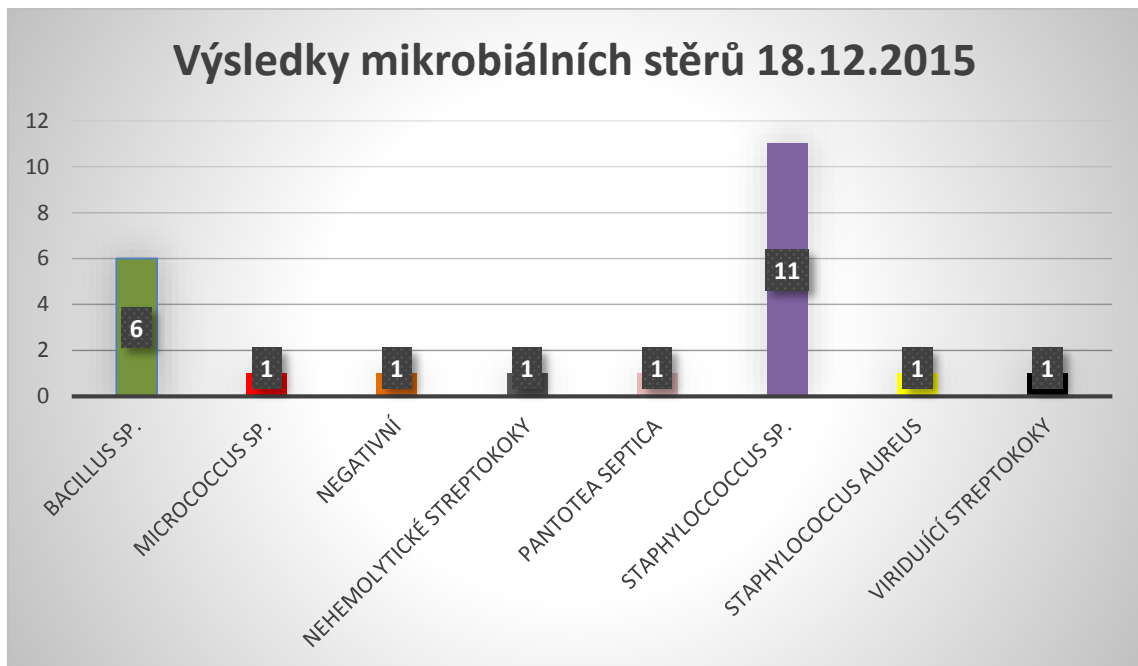
Ve třetí sérii odběrů byly stanoveny jako u předchozích dvou sérií v nejpočetnějším zastoupení rody *Staphylococcus* – koaguláza negativní a *Bacillus*. Jeden vzorek, a to okraj klinik boxu, byl pozitivní na *Staphylococcus aureus*, u kterého nebyla opět prokázána rezistence k antibiotikům, takže se nejednalo o, z hlediska patogenity, významnější kmen MRSA. Na stěnách klinik boxu byly stanoveny viridující streptokoky, které tvoří podstatnou část normální flóry dutiny ústní a horních cest dýchacích a způsobují na krevním agaru α -hemolýzu. Tyto streptokoky se v některých případech mohou chovat jako podmíněné patogeny, bývají příčinou subakutní endokarditidy. Na odběrovém sále číslo 3 byl na vnitřní straně víka, identifikován příležitostný patogen z čeledi *Enterobacteriaceae* gramnegativní, aerobní bakterie *Pantoea septica*. Tato bakterie byla také testována na citlivost k antibiotikům metodou EUCAST a z výsledků vyplývá, že *P. septica* je rezistentní vůči antibiotikům Ampicilinu, Cefuroximu a Amoxicilinu / Kyse-lina klavulonová. Naopak byla prokázána citlivost vůči Gentamicinu, Kolistinu a Ko-trimoxazolu.

Následující tabulka shrnuje výskyt mikroorganismů odebraných stěrů ze dne 18. 12. 2015 a jejich jednotlivé zastoupení v odebraných vzorcích na všech sálech našeho oddělení.

Tabulka č. 5 Výsledky stěrů 18. 12. 2015

Datum odběru vzorů 18. 12. 2015		
Místo odběru	Vzorek	Nález
sál č. 1	Sběrná nádoba nášlapná – víko uvnitř	Bacillus sp.
sál č. 1	Sběrná nádoba nášlapná – sběrný pytel	Negativní
sál č. 1	Sběrná nádoba nášlapná - víko uvnitř	Staphylococcus sp. – koaguláza neg.
sál č. 1	Sběrná nádoba nášlapná - sběrný pytel	Staphylococcus sp. – koaguláza neg.
sál č. 1	Klinik box – okraj otvoru	Staphylococcus aureus OXA+ ERY+ CLI+ COT+ VAN+
sál č. 1	Klinik box – vnější stěny	Viridující streptokoky Nehemolytické streptokoky
sál č. 2	Sběrná nádoba nášlapná – víko uvnitř	Staphylococcus sp. – koaguláza neg.
sál č. 2	Sběrná nádoba nášlapná – sběrný pytel	Staphylococcus sp. – koaguláza neg.
sál č. 2	Sběrná nádoba nášlapná - víko uvnitř	Bacillus sp.
sál č. 2	Sběrná nádoba nášlapná - sběrný pytel	Staphylococcus sp. – koaguláza neg.
sál č. 2	Klinik box – okraj otvoru	Staphylococcus sp. – koaguláza neg.
sál č. 2	Klinik box – vnější stěny	Staphylococcus sp. – koaguláza neg.
sál č. 3	Sběrná nádoba nášlapná – víko uvnitř	Staphylococcus sp. – koaguláza neg.
sál č. 3	Sběrná nádoba nášlapná – sběrný pytel	Bacillus sp. Staphylococcus sp. – koaguláza neg.
sál č. 3	Sběrná nádoba nášlapná - víko uvnitř	Staphylococcus sp. – koaguláza neg. Pantotea septica AMP- AIN- CRX- COL+ GEN+ COT+ Bacillus sp.
sál č. 3	Sběrná nádoba nášlapná - sběrný pytel	Bacillus sp.
sál č. 3	Klinik box – okraj otvoru	Micrococcus sp.
sál č. 3	Klinik box – vnější stěny	Bacillus sp.

V následujícím grafu jsou shrnuty výsledky kultivací stěrů z odpadových nádob. Výsledky měsíce prosince jsou významné z hlediska přítomnosti patogenů a příležitostných patogenů. *Viridující streptokoky*, jsou podmíněné patogeny a mohou způsobit onemocnění u citlivých jedinců, kteří mají imunitní deficit. Stejný případ je zmíněn kmen *Pantoea septica*, která je klasifikována také jako podmíněný patogen.



Obr. č. 5 Vyhodnocení výskytu MO na transfuzním oddělení v Novém Jičíně 18.12.2015

Celkově byly u všech sérií a téměř u všech vzorků stanoveny rody *Staphylococcus* a *Bacillus*, které výskytem převažovaly ostatní zastoupené rody. Jelikož se jedná o běžnou mikroflóru, není tento náález považován za významný. Kvasinky byly vykultivovány pouze u jednoho vzorku, jejich výskyt byl zanedbatelný.

Jako rizikové se z pohledu možné nákazy jeví klinik boxy. Na těchto sběrných nádobách jako na jediných byl vykultivován patogen *Staphylococcus aureus* u všech sérií a to jak na vnějších stěnách tak i na otvoru určeném k vhazování nebezpečného odpadu. Všechny vzorky s nárůstem *S. aureus* byly citlivé k antibiotikům, takže MRSA nebyl prokázán ani v jednom případě. Na vnější stěně klinik boxu byly u vzorku ze sálu č. 1 vykultivovány také *viridující streptokoky*, které jsou podmíněnými patogeny. Jejich patogenita se může projevit u lidí s oslabenou imunitou.

Následující graf statisticky shrnuje výskyt, tedy zastoupení jednotlivých mikroorganismů na odběrech vzorků provedených v období 21. 10. – 18. 12. 2015 na transfuzním oddělení v nemocnici Nový Jičín.



Obr. č. 6 Četnost vyhodnocení výskytu MO na transfuzním oddělení v Novém Jičíně

9.3 Diskuse

Vzorky byly odebírány na transfuzním oddělení Nemocnice Nový Jičín. Celkem bylo odebráno 54 vzorků za dobu 3 měsíců, kdy každý měsíc byla odebrána série 18 vzorků.

Vždy byly odebrány dva vzorky z jedné sběrné nádoby na nebezpečný odpad 18 01 03 a to z vnitřní strany víka a ze sběrného pytle, dále pak z okraje vyhazovacího otvoru a vnějších stěn klinik boxu, což je sběrná nádoba na ostrý nebezpečný odpad tedy 18 01 01. Místa sběru byly vybrány dle předpokladu, že největší riziko vzniká v místě kontaktu biologického materiálu s pracovním prostředím. Stěry byly provedeny na všech třech odběrových sálech, které jsou v současné době na TO v provozu. Pro zajištění korektnosti odběrů byly vzorky odebírány pod dozorem pracovníka ochrany veřejného zdraví nemocnice.

Ve výsledku byly pozorovány u všech vzorků sledovány nárůsty běžných bakteriálních kmenů rodu *Bacillus*, *Micrococcus* či *Staphylococcus*. Nejvýznamnějším nálezem byl pozitivní nález grampozitivní bakterie *Staphylococcus aureus* a gramnegativní bakterie *Pantoea septica*. V převážné většině vzorků se vyskytovaly mikroorganismy, které jsou všudypřítomné nebo se běžně vyskytují na kůži. Získané výsledky se shodují s hypotézou o nejpravděpodobnějším místě výskytu MO, které po kontaktu s živou tkání mohou vyvolat různá onemocnění (sběrné nádoby na nebezpečný popřípadě ostrý odpad na TO).

Vybrané mikroorganismy byly kultivovány klasickými plotnovými kultivačními metodami na selektivních půdách, vyhodnocení probíhalo pomocí hmotnostní spektrometrie a dále metodou EUCAST.

Jak uvádí Šrámová 2001, mezi nejvýznamnější zástupce stafylokoků patří kmen MRSA, jeho přítomnost však nebyla prokázána ani u jednoho vzorku odebraného na TO. I když by dle Važánové 2014, měla být u nemocničních kmenů polyrezistence k antibiotikům či dezinfekčním prostředkům typická, nepřítomnost rezistentních kmenů se dá vysvětlit tím, že transfuzní oddělení není typickým nemocničním oddělením, zde přicházejí převážně zdraví lidé. Z tohoto důvodu je možné, že se na našem oddělení tyto rezistentní kmeny zatím nevyskytují. Tento fakt vyvrací také hypotézu, že by se *metilicilin rezistentní Staphylococcus aureus*, mohl vyskytovat u sběrných nádob na nebezpečný ostrý odpad i na styčných plochách ostatních sběrných nádob.

Ve všech případech byl *S. aureus*, vůči testovaným antibiotikům citlivý, tedy s viditelnou zónou okolo disku s antibiotiky. Vzorky s pozitivním výsledkem na *S. aurea* byly pouze 3 z celkových 54 otestovaných míst. Ovšem místo výskytu bylo vždy na klinik boxech, ve dvou případech na vnějších stěnách, takže při manipulaci s těmito nádobami by mělo docházet ke zvýšené opatrnosti. Pouze na těchto nádobách určených pro ostrý odpad byl vykultivován *S. aureus* a *viridující streptokoky*. Tento výsledek potvrzuje ujištění Krňoulové 2012, že největší riziko souvisí vždy s nakládání s infekčním a ostrým odpadem. Tato skutečnost nekoresponduje se stanovenou hypotézou, kdy bylo předpokládáno, že největším ohniskem možné nákazy by měl být okraj otvoru pro vhození ostrého odpadu nikoli vnější stěny. Vnější stěny klinik boxu byly také shledány jako nejvhodnější pro perzistenci MO z hlediska množství vykultivovaných organismů z jednoho stěru.

Vyhodnocením výsledků bylo potvrzeno, že rod *Staphylococcus*, který běžně sídlí na kůži člověka, předmětech i prachu se v nemocničním prostředí vyskytuje hojně, jak uvádí Otto 2009. Ovšem jeho další výrok, že nejčastějším patogenem, který osídluje pracovní povrchy v nemocnicích je druh *S. epidermidis*, nebyl potvrzen ani v jednom vzorku. Tyto výsledky jsou dalším podkladem pro skutečnost uvedenou výše, tedy že transfuzní oddělení navštěvují zdraví dárce, takže výskyt mikroflóry je zde jiný než na klasických nemocničních odděleních.

Sběrné nádoby na nebezpečný odpad byly po tomto testování shledány jako nerizikové, jejich každodenní úklid je prováděn dle správné praxe. Na štítku jsou informační údaje o nebezpečnosti odpadu a místě sběru, podpis pracovníka úklidu. Každý den je také udělaná dezinfekce povrchů těchto nádob. U dezinfekce se jedná o soubor opatření vedoucích ke zneškodňování vegetativních forem infekčních agens. Tyto postupy mají přerušit cestu nákazy od zdroje k vnímavé osobě (ČERVINKOVÁ, 2010). Jak uvádí Klouda 2010, při desinfekci je důležitý vznik tenké vrstvy (filmu) desinfekce, která působí i po zaschnutí desinfekce, vzhledem k výsledkům, je desinfekce prováděná řádně a ředěna ve správném poměru. Denně jsou vyhazovány červené pytle určené pro nebezpečný odpad, jsou označeny štítkem, kterým je přelepeno vázání pytle. Firma MW Dias, která zabezpečuje úklid na všech odděleních nemocnice má své pracovníky řádně proškolené. Krom dodržování hygienických požadavků je důležité také řádné ředění používaných desinfekcí. Nesprávné ředění desinfekce a teda chybná hygiena provozu vede k nedokonalé likvidaci vegetativních forem MO. Výsledky potvrzují, že i tento postup je dodržován.

.

.

10 ZÁVĚR

Hlavním cílem této práce bylo zjistit, jak moc je transfuzní oddělení rizikové z mikrobiálního pohledu a jaké rody a druhy patogenní a podmíněně patogenní mikroflóry jsou na pracovišti zastoupeny nejvíce. Výsledky dokázaly, že při udržování pravidelného hygienického režimu, který je na TO nastaven, je riziko možné kontaminace či vzniku nozokomiálního či profesionálního onemocnění minimální. Pomocí modelového experimentu byly u všech sérií a téměř i u všech vzorků stanoveny rody *Staphylococcus* a *Bacillus*, které výskytem převažovaly ostatní zastoupené rody. Jelikož se jedná o běžnou mikroflóru, není tento nálezn považován za významný.

Jako nejrizikovější místo byla u všech sérií stanovena nádoba na nebezpečný ostrý odpad – klinik box respektive jeho vnější stěny, u kterého byl ve všech případech stanoven *Staphylococcus aureus*, který byl po testu EUCAST stanoven jako citlivý k antibiotikům. Jedná se o patogen, který způsobuje hnisavé onemocnění kůže a měkkých tkání i sepse. Toto může působit problémy z imunologického pohledu, jelikož běžný organismus je vůči této infekci odolný, pro člověka s oslabeným imunitním systémem však může být i smrtelný. Z tohoto pohledu je významná také *Pantoea septica*, což je podmíněný patogen.

Předpokládaný výskyt patogenu MRSA, byl vyvrácen provedenými testy EUCAST, které potvrdily citlivost stanoveného *S. aurea* k antibiotikům.

Celkově nebylo prokázáno zvýšené nebezpečí, které by mohlo vyplynout z manipulace zaměstnanců, dárců, pacientů s nebezpečným odpadem za předpokladu, že budou dodržovány veškeré hygienické požadavky a používání ochranných pomůcek dle platné legislativy a směrnic nemocnice.

LITERÁRNÍ PŘEHLED

ALLEGRAZI, Benedetta. *Směrnice Světové zdravotnické organizace – Hygiena rukou ve zdravotnictví*. In: . WHO: World Health Organization 2009, 2009, ročník 2009, číslo 1.

BĚHAL, Robert. *Způsob a rozsah monitoringu mikrobiologické čistoty prostředí na pracovištích centrální přípravy*. Olomouc, 2011. Atestační práce.

BOGAERT, D., R. DE GROOT a P.W.M. HERMANS. Streptococcus pneumoniae colonisation: the key to pneumococcal disease. *The Lancet Infectious Diseases* [online]. Netherlands, 2004, **2004**(4): 144-154 [cit. 2015-11-04]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1473309904009387>

BOŽEK, F., ZEMÁNEK, Z., URBAN, R. *Recyklace*. 1. vyd. Vyškov, 2003.

BURSOVÁ, Šárka, Marta DUŠKOVÁ, Lenka NECIDOVÁ, Renáta KARPÍŠKOVÁ a Petra MYŠKOVÁ. *Mikrobiologické laboratorní metody*. Brno, 2014. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno.

CARVALHO, S. M. L. a DA SILVA. Infectious Hospital Waste: Evaluation of a Tray Dryer for Volume and Microbiological Load Reduction. *Drying Technology*. 2006, (24). DOI: 10.1080/07373930600612065. ISSN 0737-3937.

CASSELLS, A C. *Pathogen and Microbial Contamination Management in Micropropagation*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1997. 9 s. ISBN 0-7923-4784-6.

ČERVINKOVÁ, Barbora. *Nozokomiální infekce*. Hradec Králové, 2010, Bakalářská práce. Univerzita Karlova v Praze. Vedoucí práce Doc. RNDr. Vladimír Buchta, CSc.

ENRIGHT, Mark C., D.Ashley ROBINSON, Gaynor RANDEL, Edward J. FEIL, Hajo GRUNDMANN a Brian G. SPRATT. The evolutionary history of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. United Kingdom: PNAS, 2002, **2002**(7687–7692): 1-6. ISSN .

FEČKO, P. *Recyklace odpadů*. Ostrava: Vysoká škola báňská - Technická univerzita Ostrava, 1997.

GÖPFERTOVÁ, Dana , et al. *Epidemiologie infekčních nemocí: Učebnice pro lékařské fakulty (bakalářské a magisterské studium)*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2005. . ISBN 80-246-0452-3

CHVÁTALOVÁ, Julie. *Kultivační nálezy z hemokultur od pacientů hospitalizovaných ve Fakultní nemocnici Brno v roce 2011*. Brno, 2012. Bakalářská práce. Masarykova univerzita v Brně. Vedoucí práce MUDr. Markéta Hanslianová

JANDOVÁ, Božena a Ludmila KOTOUČKOVÁ. *Praktikum z mikrobiologie*. 1996. ISBN 80-210-1374-5.

JANÍČKOVÁ, Dana. *Odpady a odpadové hospodářství [online]*. Chrudim, 2012, 186 s. [cit. 2015-10-13]. Dostupné z: <http://www.szes.chrudim.cz/soubory/esf/odpady.pdf>

JAMES, J. *Microbial hazard identification in fresh fruit and vegetables*. Hoboken, N.J. 2006. ISBN 0471670766. URL: <http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/bookhome/112139499>

KHS SE SÍDLEM V LIBERCI. *Jak nakládat se specifickým odpadem ze zdravotnických zařízení [online]*. 9.12.2013. Liberec, 2013 [cit. 2013-12-09]. Dostupné z: http://www.khslbc.cz/politika/kzp/L_Zdravodpad.pdf

KLOUDA, J. -- FRYČ, J. -- SOMERLÍKOVÁ, K. *The Disinfection efficiency of Iodine Teat Dips for Dairy Cattle*. Acta Technologica Agriculturae. 2010. sv. 13, č. 1, s. 6--9. ISSN 1335-2555. URL: <http://www.slpk.sk/acta/docs/2010/ata01-10.pdf>

KOMÍNKOVÁ, Markéta, Roman GURÁŇ, Branislav RUTTKAY - NEDECKÝ, Pavel KOPEL, Libuše TRNKOVÁ, Ondřej ZÍTKA, Vojtěch ADAM a René KIZEK. Identifikace mikroorganismů pomocí MALDI-TOF MS. In: *Journal of Metallomics and Nanotechnologies 2014*, [online]. Brno, 2014 [cit. 2016-04-02]. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_239_nanotech/J_Met_Nano/0214/pdf/dmicrobial_identification_by_maldi-tof_ms.pdf

KOPECKÝ, Jindřich. 2007. *Nozokomiální infekce v lůžkovém zdravotnickém*. Jindřichův Hradec. Diplomová práce. Vysoká škola ekonomická v Praze. Vedoucí práce Prim. MUDr. Rudolf Střítecký

KOZÁKOVÁ, Monika a Irena KLAPÁČOVÁ. 2005. *Stanovení povrchové kontaminace pracovních ploch ve škole*. Bzenec

KRŇOULOVÁ, Edita. *Nové aspekty v likvidaci infekčního odpadu ve zdravotnictví*. Plzeň, 2012.

LAMAGNI, Theresa L. at all Epidemiology of Severe Streptococcus pyogenes Disease in Europe. *Journal of clinical microbiology* [online]. Sweden: American Society for Microbiology, 2008, (0095-1137/08): 2359–2367 [cit. 2015-10-30]. Dostupné z: <http://jcm.asm.org/content/46/7/2359.full>

LIPJAKOVÁ, Andrea. 2010. *Zajištění a odstraňování odpadů ze zdravotnických zařízení, možnost ohrožení zdraví producentů, zaměstnanců, vliv na životní prostředí The*. Ostrava. Bakalářská práce. Univerzita Karlova v Praze. Vedoucí práce MUDr. František Kožíšek, CSc.

MAĐAR, Rastislav, Renata PODSTATOVÁ a Jarmila ŘEHOŘOVÁ. *Prevence nozokomiálních nákaz v klinické praxi*. Praha: Grada Publishing, 2006. ISBN 80-247-1673-9.

MARTINCOVÁ, Pavlína. 2008. *Profesionální nákazy ve zdravotnictví*. České Budějovice. Bakalářská práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. Vedoucí práce MUDr. Aleš Hejlek

MILKOVÁ, Petra a Rudolf ŠUGAR. *Sm -T 01Odpadové hospodářství*. In: Nemocnice Nový Jičín, 2015, číslo 01.

MLEJNKOVÁ, Hana a Jan CHLOUPEK. *Hygienické zabezpečení pitné a napájecí vody – návody k praktickým cvičením*. 1. Brno, 2014. ISBN 978-80-7305-755-8.

MÜLLEROVÁ, Dana a Anna AUJEZDSKÁ. *Hygiena, preventivní lékařství a veřejné zdravotnictví*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2014, 254 s. ISBN 978-80-246-2510-2.

MUSILOVÁ, Štěpánka. *Nozokomiální nákazy: katérové infekce centrálního žilního řečiště*. Prdubice, 2014. Diplomová práce. Univerzita Pardubice. Vedoucí práce Mgr. Martina Rabová

Návrh metodického doporučení pro hodnocení účinnosti dekontaminace odpadů ze zdravotnictví. 2009. Dostupné také z:

<http://www.szu.cz/uploads/documents/chzp/puda/priloha5Z.pdf>

Návrh metodického pokynu Ministerstva životního prostředí a Ministerstva zdravotnictví k nakládání s odpady ze zdravotnických zařízení a jim podobných zařízení [online].

Praha: Státní zdravotní ústav, 2009 [cit.23.11.2015]. Dostupné z:

<http://www.szu.cz/uploads/documents/chzp/puda/priloha4Z.pdf>

OTTO, Michael. Staphylococcus epidermidis – the “accidental” pathogen. *NIH Public Access* [online]. Bethesda: Nat Rev Microbiol., 2009, (555–567): 1-23 [cit. 2015-10-29]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2807625/>

PETRŽELKOVÁ, Gabriela. 2009. *Prevence nozokomiálních nákaz.* Brno. Bakalářská práce. Masarykova univerzita. Vedoucí práce PhDr. Natálie Beharková

SCHINDLER, Jiří. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů.* 2009. Praha: Grada Publishing, 2010. ISBN 978-80-247-3170-4.

SPURNÁ, Ivona. 2009. *Mikrobiologie masa.* Brno. Diplomová práce. VUT v Brně. Vedoucí práce Doc. Ing. Jiřina Omenloká, CSc.

ŠÍBLOVÁ, Jana. 2008. *Herpetické infekce a profesionální nákazy.* Brno. Bakalářská práce. Masarykova univerzita. Vedoucí práce Doc. MUDr. Drahomíra Bartošová, CSc

ŠRÁMOVÁ, Helena, Vilma BENEŠOVÁ, Věra MELICHRČÍKOVÁ, Erich PAZDZI-ORA, Vladimír POLANECKÝ a Věra TORŠOVÁ. *Nozokomiální nákazy II.* Olomouc: OTAVA, 2001. ISBN 80-85912-25-2.

ŠRÁMOVÁ, H. Profesionální infekční nákazy u zdravotníků. *Sestra.* Praha: Mladá fronta a.s., 2002. s.39-41, ISSN 1210-0404

TRUNDOVÁ, Helena. *Sledování a prevence nozokomiálních nákaz.* Jihlava, 2012, 2015-11-21 [cit. 2015-11-21]. Bakalářská. Vysoká škola polytechnická v Jihlavě. Vedoucí práce Mgr. Irena Točíková.

VAŽÁNOVÁ, Zdenka. *Chyby v práci zdravotnických pracovníků související s přenosem nozokomiálních nákaz*. Zlín, 2014. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Vedoucí práce PhDr. Eva Hrenáková.

VOBROVÁ, Renata. *Charakteristika a výskyt methicilin rezistentních izolátů bakteriálního druhu Staphylococcus aureus (MRSA) z krve pacientů nemocnic ČR a Evropy* [online]. České budějovice, 2008 [cit. 2015-10-29]. Dostupné z: http://theses.cz/id/elwi8v/downloadPraceContent_adipIdno_12894. Bakalářská. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. Vedoucí práce MUDr. Magdalena Horníková

Vyhláška Ministerstva životního prostředí č. 83/2016 Sb., o podrobnostech nakládání s odpady

WARD, Jeremy P.T. a Roger W.A. LINDEN. *Základy fyziologie*. První vydání. Praha: Galén, 2010. ISBN 978-80-7262-667-0.

Zákon č. 258/2000 Sb., ze dne 14. července 2000, o ochraně veřejného zdraví a o změně některých souvisejících zákonů ve znění pozdějších předpisů.

Zákon č. 185/2001 sb., ze dne 14. června 2001 *O odpadech* a o změně některých dalších zákonů.

ZIMOVÁ, Magdalena — ŘÍMANOVÁ, Dana. *Nakládání s odpady ve zdravotnických a jim podobných zařízeních*. 2. aktual. vyd. Praha : Polygon, 2002. ISBN: 80-7273-070-3. OSA001 [Moravskoslezská věd.knih. Ostrava].

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. č. 1 <i>Křížový roztěr</i>	49
Obr. č. 2 <i>Schéma přístroje MALDI-TOF MS</i>	50
Obr. č. 3 <i>Vyhodnocení výskytu MO 21. 10. 2015</i>	55
Obr. č. 4 <i>Vyhodnocení výskytu MO 27. 11. 2015</i>	58
Obr. č. 5 <i>Vyhodnocení výskytu MO 18. 12. 2016</i>	60
Obr. č. 6 <i>Statistické vyhodnocení výskytu MO</i>	61

SEZNAM TABULEK

Tabulka č. 1: <i>Dělení zdravotnického materiálu</i>	17
Tabulka č. 2: <i>Přehled odebraných vzorků</i>	45
Tabulka č. 3: <i>Výsledky stěrů 21.1.02015</i>	54
Tabulka č. 4: <i>Výsledky stěrů 27.11.02015</i>	57
Tabulka č. 5: <i>Výsledky stěrů 18.12.02015</i>	59

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ADR	Evropská dohoda o mezinárodní silniční přepravě nebezpečných látek
ČIŽP	Česká inspekce životního prostředí
EAD	erythrocyty z aferézy deleukotizované
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
KHS	Krajská hygienická stanice
MO	mikroorganismy
MRSA	metilcilin rezistentní staphylococcus aureus
MŽP	Ministerstvo životního prostředí
RID	Řád pro mezinárodní železniční přepravu nebezpečných věcí
TO	Transfuzní oddělení
WHO	world health organization