

Przetrwalniki bakteryjne w procesach dekontaminacyjnych

Uwarunkowana genetycznie zdolność wytwarzania przetrwalników przez bakterie z rodzajów: *Bacillus*, *Geobacillus* i *Clostridium* jest zdobyczą ewolucyjną tych drobnoustrojów i wyrazem ich zdolności adaptacyjnych do trudnych warunków środowiska. Wyjątkowa oporność przetrwalników na działanie bodźców fizycznych i środków chemicznych stwarza jednakże problemy z ich eradykacją z powierzchni oraz produktów poddawanych procesom dekontaminacyjnym. Z drugiej strony, cechy oporności spor stały się powodem wykorzystania tych bakterii jako organizmów testowych do oceny skuteczności procesów dezynfekcji i sterylizacji.

1. Przetrwalniki bakteryjne – struktura, fizjologia

Przetrwanie drobnoustrojów w zmieniających się warunkach środowiska, działania różnorodnych bodźców stresowych wymaga posiadania przez organizmy określonych zdolności adaptacyjnych. Ukierunkowana zmienność bakterii, będąca odpowiedzią na trudne warunki może objawiać się wytwarzaniem przetrwalników, inaczej endospor (w skrócie: spor) przez laseczki beztlenowe z rodzaju *Clostridium* oraz laseczki tlenowe z rodzaju *Bacillus*, *Geobacillus* (Tab.1). Przetrwalniki są strukturami spoczynkowymi bakterii określanymi również jako bakterie w fazie „pauzy metabolicznej” lub jako bakterie w stanie „śmierci pozornej”. Ten stan uśpienia może trwać długi okres czasu. Endospory skrajnie odporne na trudne warunki środowiskowe zwane są również się formami w stanie „głębokim” czy też „super” uśpionym lub w stanie anabiozy.

Tabela 1. Gatunki bakterii wytwarzających przetrwalniki.

Rodzina	Rodzaj	Gatunki
<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i> <i>Geobacillus</i>	<i>B. anthracis</i> , <i>B. subtilis</i> / <i>atrophaeus</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. mycoides</i> , <i>B. pseudomycetoides</i> , <i>Geobacillus stearothermophilus</i>
<i>Clostridiaceae</i>	<i>Clostridium</i>	<i>C. botulinum</i> , <i>C. perfringens</i> , <i>C. novyi</i> , <i>C. sporogenes</i> , <i>C. tetani</i> , <i>C. difficile</i> , <i>C. sordelli</i> , <i>C. ramosum</i> , <i>C. septicum</i> , <i>C. histolyticum</i> , <i>C. bifermentans</i>

W porównaniu z aktywnymi, czyli wegetatywnymi formami bakterii, endospory odznaczają się odmienną strukturą morfologiczną, biochemiczną oraz właściwościami metabolicznymi. Są odporne na brak substancji odżywczych w środowisku, zmienność temperatur w szerokich zakresach, wysuszenie, środki dezynfekcyjne i inne substancje chemiczne, enzymy, promieniowanie UV itp. Odporność przetrwalników bakteryjnych na wszelkie bodźce stresowe pozwala im przetrwać nawet kilkaset lat w warunkach krytycznych, aż do czasu pojawienia się nowych możliwości funkcjonowania i rozmnażania, warunkując tym samym

przetrwanie gatunku. Endospory wytwarzane są w procesie zwanym sporulacją, który jest odwracalny gdyż może ponownie dochodzić do powstawania komórki wegetatywnej gdy tylko w środowisku pojawią się korzystne warunki. Ten odwrotny do sporulacji proces zwany jest germinacją lub inaczej kiełkowaniem przetrwalników.

Sporulacja rozpoczyna się w momencie pojawienia się określonego bodźca stresowego. W pierwszej kolejności następuje zahamowanie wzrostu bakterii. Z intensywnej fazy wzrostu zwanej fazą logarytmiczną, bakterie przechodzą w fazę stacjonarną, w której następuje zahamowanie podziałów komórkowych. Stan ten doprowadza do ekspresji (uaktywnienia) genów odpowiedzialnych za uruchomienie sporulacji oraz kształt przyszłego przetrwalnika. Podkreśla się znaczenie czynnika genetycznego tzw. sigma-55, który jest promotorem uruchamiającym wieloetapowy proces sporulacji. W etapie pierwszym komórka różnicuje się na tzw. presporę oraz sporangium, które oddzielone są przegrodą. Każda z tych struktur posiada materiał genetyczny komórki macierzystej. Wokół materiału genetycznego cytoplazma zagęszcza się. Prespora coraz bardziej oddziela się od sporangium poprzez wytwarzanie kolejnych koncentrycznych osłon: błony i ściany komórkowej, korteksu (kory), płaszczki czyli wewnętrznej i zewnętrznej osłony, czasem także egzosporium. Sporangium z czasem uwstecznia się. Przetrwalniki przechodzą w końcowej fazie w etap dojrzewania. Ustaje wówczas metabolizm, zwłaszcza aktywność oddechowa (pobieranie tlenu jest znikome lub nie występuje w ogóle). Ustala się stan anabiozy, tj. wspomnianej wcześniej „pauzy metabolicznej”. Endospory zachowują jednakże pewną ilość białek enzymatycznych, ponieważ są one niezbędne do ewentualnego uaktywnienia germinacji. Fazę dojrzewania muszą przebyć również osłony przetrwalników. Jest ona związana z postępującymi zmianami ich struktury chemicznej. Syntetyzowane są w dużej ilości specyficzne aminokwasy i białka charakteryzujące się odpornością na środki chemiczne i działanie enzymów. Na powierzchni osłon wykształcają się receptory dla czynników germinacji oraz antygeny wielocukrowe. Ostatecznie, osłony stanowią do 50% suchej masy komórki. Przetrwalniki przyjmują kształt okrągły bądź owalny i ułożone są w komórce w zróżnicowany sposób co jest istotne w identyfikacji gatunkowej laseczek. W celach diagnostycznych, dla uwidocznienia kształtów i ułożenia, przetrwalniki wybarwia się specjalnymi metodami. Endospory u *C. perfringens* wykształcają się w postaci centralnej „beczułki”, u *C. novyi* – umiejscawiają się podbiegunowo lub jako centralna „osełka”, u *C. tetani* - biegunowo jako „pałeczka dobosza”, u *C. botulinum* - podbiegunowo jako „rakieta tenisowa”, u *C. difficile* - podbiegunowo, u *B. anthracis* - centralnie. Przetrwalnik przez pewien czas pozostaje w komórce macierzystej, po czym może uwolnić się po jej lizie, stąd też został nazwany endosporą,

w odróżnieniu od egzospory grzybów, która umiejscawia się zewnętrznie. Przetrwalniki są ciepłooporne, przeżywają w temp. 100°C od kilku do ok. 20 godzin. Na przykład spory *C. botulinum* wytrzymują ogrzewanie w tej temperaturze przez 3-4 godz., w temp. 105°C przez 2 godz., a w temp. 115°C przez 12 min. Spory *B. cereus* natomiast wytrzymują tylko 45 min. w temp. 95°C. Ogólnie, w wyższej temperaturze przetrwalniki przeżywają krócej – średnio ok. 30 min. w 112°C, stąd też te właśnie parametry są zalecane w procesach wyjaławiania pożywek bakteryjnych. Ciepłooporność przetrwalników uwarunkowana jest z obecnością w ich strukturze znacznych ilości dipikolinianu wapnia DPA-Ca⁺² (do 15% s.m.), który jest kompleksem kwasu dipikolinowego z jonami wapnia. Utrata termooporności w procesie germinacji wiąże się zawsze z rozpadem tego kompleksu i uwrażliwieniem wegetatywnych form bakterii na temperatury znacznie poniżej 100°C. Termooporność przetrwalników związana jest również z posiadaniem ciepłoopornych enzymów, które zachowują swą nienaruszoną strukturę w 100°C. Ich biologiczną funkcją jest regulacja kiełkowania endospor, a w zasadzie hamowanie tego procesu.

Oporność przetrwalników bakteryjnych na działanie chemicznych środków dezynfekcyjnych i antyseptycznych jest zróżnicowana, zależy między innymi od rodzaju użytego środka i od ich aktywnego składnika mikrobójczego. Polecanymi środkami dezynfekcyjnymi o sprawdzonej aktywności sporobójczej są preparaty zawierające w swym składzie aldehydy, związki chloru i związki utleniające. W odniesieniu do różnych grup czynników biologicznych zarówno komórkowych jak i bezkomórkowych, aktywność sporobójcza preparatów przedstawia poniższa rycina:



Ryc.1. Wrażliwość przetrwalników bakteryjnych i innych czynników biologicznych na działanie środków chemicznych dezynfekcyjnych (kierunek strzałki wskazuje wzrastającą oporność)

Poszukiwanie coraz to nowych preparatów sporobójczych jest zadaniem trudnym, dlatego też coraz częściej uwaga kieruje się w stronę substancji naturalnych, które są stosowane alternatywnie bądź w kombinacji z obecnie stosowanymi metodami. Przykładem mogą być antyseptyki-olejki eteryczne pozyskiwane z roślin, będące mieszaniną terpenów. Udowodniono ich mikrobójcze działanie w niskich stężeniach wobec spor *Bacillus subtilis*. Mikroskopia elektronowa wykazała oddziaływanie tych antyseptyków na morfologię przetrwalników, które z form owalnych i pulchnych przekształcały się w wyniku ekspozycji w formy wysuszone, pomarszczone, z ostrymi grzbietami.

Rozpoczęcie germinacji może być spowodowane pojawieniem się w środowisku nowych warunków np. wzrostu stężenia substancji odżywczych, wody, zmiany pH, bodźca fizycznego powodującego uszkodzenie struktury osłon, czy też szoku termicznego zwanego inaczej ciepłą aktywacją. Aktywacja może wystąpić w szerokim zakresie temperatur, najczęściej od 75⁰C do powyżej 100⁰C oraz w różnym czasie – średnio od 5 min. do 60 min. Parametry szoku termicznego dla przetrwalników są specyficzne dla każdego gatunku bakterii. Spory np. *Bacillus megaterium* aktywują się już w temp. 60⁰C, podczas gdy spory *Geobacillus stearothermophilus* wymagają aż 115⁰C. Ciepła aktywacja w szybkim tempie niszczy osłony endospory, inhibitory geminacji oraz uaktywnia czynniki pobudzające kiełkowanie. Dojrzała spora, która w swej strukturze zawiera do 15% wody, po utracie osłon szybko nabiera wody, pęcznieje, ponadto uruchamiają się procesy metaboliczne kończące okres anabiozy i w efekcie powstaje zdolna do podziałów komórka wegetatywna. Zjawisko szoku termicznego zostało wykorzystane w diagnostyce laboratoryjnej do poszukiwania w materiale klinicznym bakterii wykazujących zdolność do sporulacji. Badany materiał poddaje się krótkiej ekspozycji na temp. 80⁰C. W tych warunkach następuje zabicie wegetatywnych form laseczek i innych bakterii, jeśli tam występowały. Przeżyją natomiast przetrwalniki, które identyfikuje się metodą hodowli na pożywkach bakteryjnych.

2. Przetrwalniki bakteryjne w procedurach kontroli skuteczności dekontaminacji

Ciepłooporność oraz wyjątkowa odporność przetrwalników na działanie środków chemicznych spowodowała zainteresowanie bakteriami wytwarzającymi spory jako drobnoustrojami spełniającymi kryteria tzw. organizmów testowych (inaczej: wzorcowych). Obecnie szczepy tego typu są szeroko stosowane do kontroli dezynfekcji i sterylizacji zarówno w rutynowym monitorowaniu jak i w procesach walidacyjnych. Zdefiniowanie szczepu drobnoustroju jako organizmu testowego musi być zawsze poprzedzone badaniami wykonanymi według ustalonych procedur kontrolnych, a wyniki tych sprawdzeń zawsze są

dokumentowane. Szczepy drobnoustrojów wybrane do wykazania skuteczności sporobójczej czynnika dezynfekcyjnego lub sterylizującego należą do gatunków bakterii z rodzajów: *Bacillus*, *Clostridium*, *Geobacillus* i charakteryzują się podwyższoną opornością na konkretne, dokładnie sprecyzowane parametry badanego procesu. W normie PN-EN ISO11138-1 istnieje zapis, iż procesach kontrolnych mogą być użyte również inne organizmy testowe, jeśli tylko wykazano ich odpowiednie cechy oporności. Szczepy wzorcowe pochodzą z różnych, uznanych kolekcji hodowlanych, które oznaczone są symbolami identyfikującymi, występującymi łącznie z nazwą gatunku, np. *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (ATCC – to symbol kolekcji: *American Type Culture Collection*). Organizmy wzorcowe powinny odznaczać się stabilnością odnośnie wymaganych cech oporności, a także odpornością na warunki transportu i przechowywania.

2.1 Przetrwalniki bakteryjne w procedurach kontroli dezynfekcji

Działanie sporostatyczne definiowane jest jako zdolność środka dezynfekcyjnego do hamowania w określonych warunkach kiełkowania spor bakteryjnych. Z kolei sporobójcze działanie środka to zdolność tego środka do redukcji liczby zdolnych do życia spor bakteryjnych organizmu testowego. Nazwy i symbole szczepów bakterii testowych zalecanych do kontroli procesów dezynfekcji w tym zakresie są zamieszczone w normach PN-EN oraz w wykazach krajowych kolekcji hodowlanych (Tab.2).

Tabela 2. Przykłady organizmów testowych stosowanych w badaniach skuteczności dezynfekcji w zakresie sporobójczym.

Metody badań wg:	Szczepy bakterii wytwarzających spory i numery identyfikacyjne kolekcji hodowlanych			
	<i>Bacillus subtilis</i> / <i>atrophaeus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Clostridium sporogenes</i>	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
PN EN 14347	ATCC 6633* DSM 347, NCTC 10400, CCM 19999, IAM 1069, NCIB 8054, CIP 52.62	ATCC 12826	X	X
PN EN 13704	ATCC 6633, DSM 347, NCTC 10400, CCM 19999, IAM 1069, NCIB 8054, CIP 52.62	ATCC 12826, CIP 105151	CIP 79.39	X
PN-EN ISO	ATCC 6633	X	X	ATCC 7953

15883-4				
metoda nośnikowa PZH	NCTC 8236	ATCC 10876	ATCC 3584	X
DIN 58949-4	NCTC 10073	X	X	X

* według normy, pełna nazwa organizmu testowego to: *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* ATCC 6633

Laboratorium stosujące w badaniach szczepy wzorcowe inne niż wyżej wymienione, nie pochodzące z ośrodków referencyjnych jest zobowiązane do sprawdzenia i opisanie cech szczepów własnych, przechowywania ich przez okres 5 lat, ewentualnie przekazania do krajowej kolekcji szczepów.

Przetrwalniki do badań uzyskuje się z hodowli bakteryjnej szczepu wzorcowego, po przejściu komórek z fazy logarytmicznego wzrostu w fazę spoczynkową, w czasie której dochodzi do etapu sporulacji. Wszystkie uzyskane w ten sposób powinny być w fazie głębokiej anabiozy, bez dodatku form wegetatywnych i kiełkujących, czyli w stanie najwyższej odporności na środki dezynfekcyjne. Jest to istotny warunek wiarygodności przeprowadzanych analiz, dlatego też przygotowane przetrwalniki podlegają ocenie jakościowej metodami mikroskopowymi. Badanie aktywności sporobójczej środka chemicznego przeprowadza się poddając działaniu roztworu tego środka zawiesinę zawierającą odpowiednią liczbę spor z/lub bez białkowych substancji obciążających, w wyznaczonych parametrach czasu i temperatury. Po ekspozycji, metodą hodowli mikrobiologicznych zlicza się spory, które zachowały żywotność, określając w stopniach logarytmicznych poziom ich redukcji.

W wykazie norm zamieszczonych w PN-EN 14885:2008 odnoszących się do procedur badawczych oceniających aktywność mikrobójczą środków dezynfekcyjnych i antyseptycznych, nie ma normy dla obszaru medycznego określającej warunki badania fazy 2, etapu 1 w zakresie sporobójczym. Znajduje się natomiast EN 13704 (wersja polska: PN-EN 13704:2004) dotycząca środków sporobójczych przeznaczonych dla sektora żywnościowego, przemysłowego, warunków domowych oraz zakładów użyteczności publicznej ale z zaznaczeniem dla „obszarów szpitalnych nie związanych bezpośrednio z działalnością kliniczną”. Obecnie norma PN-EN 14347 zawiera wymagania odnośnie sporobójczych środków stosowanych w medycynie i innych sektorach, lecz niestety opisuje tylko metody podstawowe, tj. fazy 1, etapu 1, które nie jest wystarczające dla potwierdzenia deklarowanych przez producenta właściwości produktu. W związku z powyższym, sporobójczość preparatów oferowanych przez firmy zakładom opieki zdrowotnej jest oceniana najczęściej w oparciu o wymogi PN-EN 13704 jako najbardziej odpowiednie dla tego zastosowania (Tab.3).

Tabela 3. Kryteria oceny sporobójczego działania produktu wg normy PN-EN 14347 i PN-EN 13704.

	PN-EN 14347:2005	PN-EN 13704:2004
faza, etap*	faza 1 etap 1	faza 2, etap 1
obszar stosowania	medyczny i inne: weterynaryjny, zakłady użyteczności publicznej, przemysł, rolnictwo,	żywnościowy, przemysłowy, warunki domowe, zakłady użyteczności publicznej
Organizmy testowe (spory)	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 <i>Bacillus cereus</i> ATCC 12826	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 Inne szczepy dodatkowe: <i>Bacillus cereus</i> ATCC 12826 <i>Clostridium sporogenes</i> CIP 7939
substancje obciążające w zawiesinie spor	brak	warunki czyste 0,3 g/l albuminy wołowej
warunki badania: temp, czas kontaktu zawiesiny spor z roztworem środka	temp. 20 ⁰ C w czasie 30 min, 60 min, 120min Norma dopuszcza także możliwość wykonania testów dodatkowo w innych warunkach.	1 szczep wzorcowy: temp. 20 ⁰ C w czasie 60 min, lub dodatkowe szczepy w innych warunkach temp. i czasu: - 4 ⁰ C, 10 ⁰ C, 40 ⁰ C, 75 ⁰ C, - 5 min., 15min., 30 min., 60min.
uzyskany poziom redukcji liczby zdolnych do życia spor	≥4,0 log ₁₀ (inaczej 10 ⁴ –krotna redukcja)	≥3,0 log ₁₀ (inaczej 10 ³ –krotna redukcja)

Faza 1 – ilościowa metoda zawiesinowa określająca działanie sporobójcze w zakresie podstawowym (badania niewystarczające do oceny środka)

Faza 2, etap 1 – ilościowa metoda zawiesinowa określająca działanie sporobójcze uwzględniające warunki praktycznego stosowania środka (badania wystarczające do oceny środka)

W ocenie aktywności sporobójczej środków dezynfekcyjnych dopuszcza się również inne metody badań, poza zamieszczonymi w normach. Procedury Państwowego Zakładu Higieny opisują nośnikową metodę określania wrażliwości przetrwalników. Nośnikami są metalowe cylinderki zakażone sporami organizmów testowych (Tab.2), eksponowane na badany środek w określonym stężeniu, czasie, temperaturze i obecności substancji obciążających. Kryterium akceptacji uzyskanego wyniku to stwierdzenie odkażenia wszystkich nośników w przyjętych warunkach badania.

Przetrwalniki bakteryjne mogą być stosowane również do kontroli procesów dezynfekcyjnych przeprowadzanych maszynowo. Norma PN-EN ISO 15883-4 zawiera wskazania dotyczące walidowania metodami mikrobiologicznymi procesów dezynfekcji termolabilnych endoskopów. Zaleca się, by zastosowane środki dezynfekcyjne były aktywne w stosunku do przetrwalników bakteryjnych z zaznaczeniem jednakże, że nie można zapewnić usunięcia

wszystkich spor, a jedynie zapewnić znaczny poziom ich redukcji. W ocenie sporobójczości procesów poleca się stosowanie przyrządów testowych z przewodami kanałowymi odpowiedniej długości i średnicy symulującymi kanały endoskopowe. Przyrządy można zaszczerpić sporami np. *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 lub sporami *Bacillus atrophaeus* ATCC 6633. Po zakończonym cyklu w myjni, ocenie podlega poziom inaktywacji przetrwalników.

Monitorowanie procesów dezynfekcji parowej przeprowadza się z użyciem biologicznych wskaźników zawierających spory *Bacillus atrophaeus* NCTC 10073 w liczbie $\geq 10^5$ na papierowym nośniku. Wskaźniki sprawdzają sporobójczość programu 105⁰C w czasie 5 min. Żywotność spor po przeprowadzonym procesie jest oceniana w warunkach laboratoryjnych. Ujemny wynik posiewu wskaźników po inkubacji w określonych warunkach, wskazuje na skuteczny proces.

2.2 Przetwalniki bakteryjne w procedurach kontroli sterylizacji

Z definicji sterylizacji jako procesu przeprowadzanego „w celu uzyskania produktu wolnego od zdolnych do życia drobnoustrojów”, wynika konieczność monitorowania tego procesu metodami mikrobiologicznymi. W procedurach walidacji oraz bieżącego monitorowania znaczącą rolę przypisuje się endosporom bakteryjnym, które są wykorzystywane do produkcji wskaźników biologicznych. Normy definiują wskaźnik biologiczny jako system badawczy zawierający gotowy do użycia nośnik umieszczony w opakowaniu pierwotnym, który zaszczerpiony jest organizmem testowym o znacznej oporności na określony proces sterylizacji. W założeniu, wskaźnik powinien zawsze wykazywać znacznie wyższą oporność niż drobnoustroje stanowiące zanieczyszczenie produktu.

Zaleca się stosowanie wskaźników biologicznych zawierających spory następujących organizmów testowych (Tab. 4):

Tabela 4. Spory organizmów testowych we wskaźnikach sterylizacji stosowanych do rutynowej kontroli (podana charakterystyka nie dotyczy wskaźników do walidacji i innych badań)

	PN EN ISO 11138-3	PN EN ISO 11138-2
Metoda sterylizacji	parowa	tlenkiem etylenu
Organizmy testowe do zaszczerpienia nośników we wskaźnikach biologicznych	spory <i>Geobacillus stearothermophilus</i> -lub inne szczepy drobnoustrojów, które wykazały działanie równoważne	spory <i>Bacillus subtilis</i> / <i>atrophaeus</i> -lub inne szczepy drobnoustrojów, które wykazały działanie równoważne
numery uznanych	ATCC 7953 (NCTC 10007,	NCTC 10073,

kolekcji w/w szczepów	DSM 22 i CIP 52.81), ATCC 12980 (równoważne do NRRL B-4419). W sterylizacji płynów poniżej 121 ⁰ C można użyć <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 35021 (5230)	ATCC 9372, DSM 2277, CIP 77.18, NCIMB 8058, NRRL B-4418
nominalna liczba spor na zaszczepionym nośniku	nie mniejsza niż 1 x 10 ⁵ na jednostkę (określona z dokładnością nie większą niż 0,1 x 10 ⁵)	nie mniejsza niż 1 x 10 ⁶ na jednostkę (określona z dokładnością nie większą niż 0,1 x 10 ⁶)
oporność spor wyrażona jako wartość D [min] [*] - powinna być określana dla każdej serii wskaźników lub nośników	nie mniejsza niż 1,5min po ekspozycji w suchej nasyconej parze wodnej w temp.121 ⁰ C spory innych bakterii: -wartość D potwierdzająca zastosowanie	nie mniejsza niż 12,5min po ekspozycji na tlenek etylenu w temp.30 ⁰ C i/ lub nie mniejsza niż 2,5 min po ekspozycji na tlenek etylenu w temp.54 ⁰ C (jeśli badania wykonano w warunkach określonych w procedurach)
wartość z ^{**}	co najmniej 6 ⁰ C	X

* wartość D (wartość D₁₀) to czas wymagany do osiągnięcia inaktywacji (redukcji) 90% populacji drobnoustroju testowego w ustalonych warunkach

** wartość z w procesie sterylizacji termicznej to zmiana temperatury ekspozycji odpowiadająca 10- krotnej zmianie wartości D

Producent wskaźników biologicznych dostarcza wraz w wyrobem istotnych informacji np.: nazwę kolekcji szczepu wzorcowego, oporność szczepu wyrażoną wartością D, liczbę organizmów testowych na jednostkę, proces odpowiedni do kontrolowania tym testem, itp. Normy wskazują na prawdopodobieństwo wystąpienia przypadków, kiedy spory organizmów testowych mogą wykazać inną oporność na parametry procesu niż ta opisana przez producenta. Przyczyny są różne i wynikają np. z rodzaju powierzchni zaszczerpionego nośnika oddziaływującej negatywnie na strukturę endospory, z działania na spory w trakcie cyklu sterylizacji zmiennych czynników fizycznych, poddawania przetrwalników stresującym procedurom odzysku po procesie sterylizacji, itp.

W interpretacji wyników kontroli procesu sterylizacji z użyciem wskaźników biologicznych zaleca się, by potwierdzenie skuteczności przeprowadzonego cyklu oparte było na stwierdzeniu inaktywacji przetrwalników umieszczanych w miejscach reprezentujących najtrudniejsze warunki procesu sterylizacji, w powiązaniu z osiągnięciem fizycznych i chemicznych parametrów procesu. Stwierdzenie wzrostu organizmu testowego może być spowodowane: brakiem osiągnięcia parametrów procesu lub osiągnięciem tylko niektórych parametrów, uszkodzeniem wskaźnika biologicznego, zastosowaniem wskaźnika

niewłaściwego lub organizmu testowego o wyjątkowej oporności. W takich sytuacjach należy zawsze przeprowadzić identyfikację gatunkową wyhodowanego organizmu. Stwierdzenie wzrostu drobnoustroju innego niż szczep wzorcowy należy interpretować jako wtórne skażenie wskazujące na błędy w procedurach. Może wystąpić również sytuacja odwrotna, tzn. proces sterylizacyjny będzie nieprawidłowy, natomiast inkubacja wskaźnika nie wykaże wzrostu bakterii. Taki wynik może świadczyć np. o utracie żywotności spor w trakcie przechowywania wskaźników lub o błędach w rutynowych procedurach diagnostycznych.

Podsumowanie

Bakterie wytwarzające spory są czynnikami etiologicznymi zakażeń często trudnych, opornych w leczeniu i zagrażających życiu. Bytując w środowisku szpitalnym mogą powodować zakażenia egzogenne. Stąd też istnieją szczególne wymagania odnośnie dezynfekcji w obszarach zagrożenia tymi drobnoustrojami, a więc jest potrzeba wprowadzania do użytkowania stale nowych środków sporobójczych o korzystniejszych parametrach. Wymogi norm odnośnie aktywności sporobójczej środków dezynfekcyjnych dla obszaru medycznego powinny w przyszłości spełnić istotną rolę przekazywaną do użytkowania środków sporobójczych zbadanych według zaostrzonych kryteriów.

Istotnym zagadnieniem jest monitorowanie skuteczności sporobójczej przeprowadzanych procesów dekontaminacyjnych zarówno manualnych jak i maszynowych. Przetrwalniki bakteryjne, z racji swej wysokiej odporności na parametry dezynfekcji i sterylizacji mogą odgrywać coraz większą rolę jako wskaźniki skuteczności tych procedur.

Centrum Onkologii- Instytut

im. M.Skłodowskiej-Curie, O/Gliwice

Dział Centralnej Sterylizacji – dr n. med. Aleksandra Garbusińska

Pismienictwo:

1. Szewczyk EM. Diagnostyka bakteriologiczna. Wydawnictwo Naukowe PWN. W-a 2013.

2. Libudzisz Z, Kowal K, Żakowska Z. Mikrobiologia techniczna (t.1). Wydawnictwo Naukowe PWN. W-a 2009.
3. Lawrence HA, Palombo EA. Activity of essential oils against *Bacillus subtilis* spores. J.Microbiol Biotechnol 2009;19,1590-1595.
4. Normy z obszaru dezynfekcji:
 - PN-EN 13704:2004,
 - PN -EN 14347:2005,
 - PN-EN 14885:2008,
 - PN-EN ISO 15883-4:2010,
5. Normy z obszaru sterylizacji:
 - PN-EN ISO 14161:2010,
 - PN-EN ISO 11138-1:2008,
 - PN-EN ISO 11138-2:2011,
 - PN-EN ISO 11138-3:2011,
6. Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego- PZH. Preparaty dezynfekcyjne przeznaczone do stosowania w zakładach opieki zdrowotnej pozytywnie zaopiniowane przez NIZP-PZH. W-a, 2011.