

ACTA      HYGIENICA  
              EPIDEMIOLOGICA  
              ET MICROBIOLOGICA  
              4/2021



## **Standardní operační postupy pro vyšetřování vnitřního prostředí**

Kateřina Klánová  
Jana Vrkoslavová

Státní zdravotní ústav

ISSN 1804-9613

## **Standardní operační postupy pro vyšetřování vnitřního prostředí**

*Abstrakt:* Tato práce aktualizuje Standardní operační postupy pro vyšetřování mikroorganismů v ovzduší a pro hodnocení mikrobiologického znečištění ovzduší ve vnitřním prostředí z roku 2002, které jsou rozšířeny o vyšetřování povrchů ve vnitřním prostředí. Metody vyšetření povrchů vycházejí z ČSN EN ISO 18593 a zkušeností pracovníků NRL. Metodiky popsané v této práci mohou sloužit jako základ standardních operačních postupů jednotlivým laboratořím pro účely akreditačního řízení.

*Klíčová slova:* bakterie, plísně, vzduch, povrchy

## **Standard operational procedures for examination of the indoor environment**

*Summary:* This work updates the 2002 standard operational procedures for examination of airborne microorganisms and evaluation of microbiological airborne pollution in the indoor environment, which have been expanded to comprise examination of indoor surfaces. Indoor surface examination is based on CSN EN ISO 18593 and the expertise of NRL workers. The methodologies described may serve as the basis for standard operational procedures of laboratories that conduct accreditation services.

*Key words:* bacteria, mould, air, surfaces

*Doporučená citace:* Klánová K, Vrkoslavová J. Standardní operační postupy pro vyšetřování vnitřního prostředí. Acta Hyg Epidemiol Microbiol. 2021;(4):1-22.

© Státní zdravotní ústav 2021

Žádná část časopisu nesmí být reprodukována tiskem, fotografickou cestou, počítačovými soubory dat nebo jinými způsoby bez předchozího písemného svolení vydavatele.

Redakční rada:

Prof. MUDr. Vladimír Bencko, DrSc., Ústav hygieny a epidemiologie 1. LF UK

RNDr. František Rettich, Centrum epidemiologie a mikrobiologie, Státní zdravotní ústav

MUDr. Jaroslav Volf, Oddělení pracovního a preventivního lékařství, FN Ostrava

Mgr. Jana Veselá, Středisko vědeckých informací, Státní zdravotní ústav

Adresa redakce:

Státní zdravotní ústav, redakce časopisu AHEM, Šrobárova 49/48, 100 00 Praha 10, telefon: 267082288, e-mail: [vaclava.novakova@szu.cz](mailto:vaclava.novakova@szu.cz)

Publikováno 9. 12. 2021

ACTA HYGIENICA  
EPIDEMIOLOGICA  
ET MICROBIOLOGICA

## **Standardní operační postupy pro vyšetřování vnitřního prostředí**

RNDr. Kateřina Klánová, CSc.

Ing. Jana Vrkoslavová, Ph.D.

Státní zdravotní ústav, Centrum toxikologie a zdravotní bezpečnosti, Praha

## Obsah

1. Úvod .....	5
2. Vyšetřování vzduchu .....	7
2.1. Stanovení celkové koncentrace směsné populace bakterií a celkové koncentrace spor směsné populace plísni ve vzduchu aktivním nasáváním.....	7
2.1.1. Pracovní postup při vyšetření vzduchu aktivním nasáváním .....	8
2.1.2. Výpočet a vyjádření výsledků při vyšetření vzduchu aktivním nasáváním .....	8
2.2. Vyšetřování mikroorganismů ve vzduchu sedimentační metodou .....	8
2.2.1. Pracovní postup při vyšetření vzduchu sedimentační metodou .....	9
2.2.2. Výpočet a vyjádření výsledků při sedimentační metodě .....	9
2.3. Výskyt patogenních a potenciálně patogenních druhů mikroorganismů ve vzduchu ....	9
2.4. Hodnocení výsledků .....	10
3. Vyšetřování povrchů.....	12
3.1. Stanovení celkové koncentrace směsné populace bakterií a celkové koncentrace směsné populace spor plísni na površích .....	12
3.1.1. Pracovní postup při vyšetření povrchů.....	13
3.1.2. Výpočet a vyjádření výsledků mikroorganismů na površích .....	13
3.2. Hodnocení výsledků .....	14
4. Závěr .....	15
5. Příklady vyšetření vnitřního prostředí provedené laboratoří NRL pro mikrobiologii potravin, PBU a prostředí.....	19

## 1. Úvod

Mikroorganismy jsou přítomny ve všech složkách životního prostředí: ve vodě, v půdě i ve vzduchu. Jejich existence je většinou saprofytická a je převážně spojována s rozkladem organické hmoty (v půdě a na rostlinném materiálu).

Ve venkovním vzduchu i ve vzduchu uvnitř objektů se vyskytuje množství mikroskopických organismů, na jejichž existenci je člověk dlouhodobě adaptován. Každým vdechnutím inhaluje několik mikroorganismů, v naprosté většině případů bez jakékoli odezvy. Řada prací z posledních let však ukazuje, že nemocí, které mají souvislost s pobytem v určitém vnitřním prostředí, celosvětově přibývá. Za jeden z faktorů, které se na vzniku těchto nemocí podílejí, jsou považovány právě mikroorganismy.

Některé mikroorganismy z aerosolu vnitřního prostředí mohou vyvolat nežádoucí účinky na zdraví od nevolností a potíží smyslového ústrojí až k vážnému ohrožení zdraví.

Zdravotní obtíže, které mikroorganismy mohou způsobit, jsou jak nemoci dobře definované, tak méně dobře definované syndromy. Kromě infekčních nemocí mohou být mikroorganismy příčinou rýmy, kašle, bolestí hlavy, astmatu, zánětů průdušek a atopické dermatitidy. Mikroorganismy jsou uváděny i jako jeden z původců onemocnění z budov (SBS – Sick Building Syndrome).

Bakterie a mikroskopické vláknité houby – plísně jsou uváděny jako významné alergeny hned za roztoči, prachem a alergeny domácích živočichů.

Z hygienického hlediska je závažná produkce toxických látek – toxinů. Ty jsou produkovány jak bakteriemi, tak plísněmi.

Zdravotní důsledky po inhalaci bakteriálních toxinů jsou známy jako „horečka ze zvlhčovačů“ a jsou spojovány především s inhalací aerosolu z kontaminovaných zvlhčovačů nebo vodních rezervoárů klimatizací.

Plísněmi produkované mykotoxiny způsobují mykotoxikózy, a to především po konzumaci kontaminovaných potravin. V odborné literatuře je uváděn i kancerogenní účinek některých mykotoxinů a jejich schopnost negativně působit na imunitní systém. Mykotoxiny se mohou vyskytovat ve velmi malých koncentracích ve sporách plísní, které je produkují a s nimi být vdechnuty.

Výrazným příkladem nemocí způsobených mikroskopickými vláknitými houbami jsou poškození pacientů s HIV odvozenými defekty imunitního systému, u kterých jsou mykotická onemocnění (převážně aspergilózy v plicích) detekovány až u 30 % nemocných. Výskyt systémových mykóz je však znám i u pacientů s jinými poškozeními imunitního systému (pacienti po transplantacích, při podávání širokospektrých antibiotik či po terapii ozařováním). Systémové mykózy jsou téměř vždy způsobeny plísněmi z vnějšího prostředí. V těle zdravého člověka se vláknité mikroskopické houby nevyskytují – nejsou endogenní.

Vyšetřování koncentrací bakterií a spor mikroskopických vláknitých hub ve vzduchu mají význam nejen v souvislosti s výskytem onemocnění, jehož projevy jsou spojovány s pobytem v určitém prostředí, ale i jako vyšetření preventivní.

Ze vzduchu mikroorganismy sedimentují na povrchy. Za určitých podmínek se z povrchů mohou dostat do vzduchu. Mikroorganismy detekované z pevných povrchů nejsou vždy totožné s mikroorganismy nalézány ve vzduchu. K resuspendaci mikroorganismů z povrchů do ovzduší dochází v závislosti na typu povrchů, velikosti částic a rychlosti proudění vzduchu. Specifickou vlastností mikroorganismů je vytváření biofilmů na površích. V těchto případech je vyšetřování složitější a není předmětem tohoto sdělení.

Přestože člověkem inhalovány mohou být pouze mikroorganismy ze vzdušného aerosolu, je vyšetřování povrchů důležitou složkou vyšetřování vnitřního prostředí. Určení přítomnosti nebo počtu mikroorganismů na površích může být důležité i pro odhad úrovně kontaminace prostředí.

## 2. Vyšetřování vzduchu

### 2.1. Stanovení celkové koncentrace směsné populace bakterií a celkové koncentrace spor směsné populace plísní ve vzduchu aktivním nasáváním

#### Oblast použití

Dále uvedené postupy se vztahují na stanovení celkové koncentrace směsné populace bakterií a celkové koncentrace spor směsné populace plísní ve vzduchu vnitřního prostředí. Tímto kvantitativním kritériem nejsou hodnoceny bakterie patogenní, bakterie potenciálně patogenní a mikroskopické vláknité houby – plísně, které jsou potenciálně patogenní, patogenní, nebo takové mikroskopické vláknité houby, které produkují mykotoxiny.

V bioaerosolu venkovního vzduchu i vzduchu ve vnitřním prostředí jsou bakterie a spory plísní přítomny téměř vždy; uvedenými postupy je tedy možno hodnotit:

1. Čistotu zvolených interiérů.
2. Požadované snížení koncentrace bakterií a spor plísní při používání přístrojů na úpravu vzduchu v interiéru (laminární boxy, čističe vzduchu, klimatizace s filtrací vzduchu, UV lampy a další).
3. Nežádoucí zvýšení koncentrace bakterií a spor plísní, ke kterému může docházet v případech specifikovaných v Dodatku A. Zvýšené koncentrace bakterií a spor plísní mohou ohrozit zdraví u vnímavých jedinců.

#### Princip metody

Postupem zkoušení se zjišťuje celková koncentrace všech bakterií a plísní, které vyrostou na kultivačních půdách za daných podmínek aerobní inkubace při  $30 \pm 1$  °C za 48–72 hodin (bakterie) a všech plísní, které vyrostou na kultivačních půdách za daných podmínek aerobní inkubace při  $25 \pm 1$  °C za 5–7 dní.

#### Kultivační média

Pro odběry vzduchu aktivním nasáváním se zakupují nebo připravují agarové půdy do Petriho misek podle aktuálně platných norem.

#### Přístroje a pomocná zařízení

Přístroj určený pro odběr vzorků vzduchu aktivním nasáváním. Objem nasávaného vzduchu je závislý na předpokládané koncentraci bakterií a spor plísní ve vzduchu. Obecně platí pravidlo: čím nižší je očekávané množství mikroorganismů ve vzduchu, tím delší je doba odběru. Petriho misky o průměru 84–90 mm.

Biologický termostat s teplotou nastavenou na  $30 \pm 1$  °C a  $25 \pm 1$  °C.

### **2.1.1. Pracovní postup při vyšetření vzduchu aktivním nasáváním**

Stanovení celkového počtu směsné populace bakterií i celkového počtu spor směsné populace plísní ve vzduchu ve vnitřním prostředí se provádí po 20 minutách důkladného provětrání a po další jedné hodině uzavření oken a dveří.

V případě čistých provozů a dalších prostorů s klimatizací bez možnosti větrání se vyšetření provádějí za provozu nebo v případě potřeby bez provozu, a to nejdříve za 20 minut od ukončení činnosti.

Místo odběru se zvolí podle zadaného vyšetření. Nejčastěji se vyšetřuje ve středu místnosti v inhalační zóně ve výšce 160 cm nad podlahou. Vhodné je provést dva odběry vzduchu s tím, že doba mezi jednotlivými odběry je minimálně 10, maximálně 30 minut. Odběr provádí pověřená osoba; přítomnost a pohyb dalších osob ve sledovaném interiéru je vyloučen, pokud není uvedeno jinak – viz Dodatek B.

Vše se zaznamená do protokolu o měření.

Mezi jednotlivými odběry je odběrová horní část přístroje očištěna ubrouskem napuštěným v etanolu.

Mezi odběry vzduchu v odlišných interiérech je odběrová hlava přístroje sterilizována autoklávováním (121 °C, 15 minut).

Během vyšetření je přístroj umístěn ve stabilizované poloze; s přístrojem se nepohybuje.

Řádně označené Petriho misky jsou uloženy v co nejkratší době do termostatu, ve kterém se inkubují dnem vzhůru. Pro přenos misek mezi odběrovým místem a laboratoří se užívají chladicí přenosné nádoby.

Po inkubaci se spočítají vyrostlé kolonie bakterií a plísní.

### **2.1.2. Výpočet a vyjádření výsledků při vyšetření vzduchu aktivním nasáváním**

Vypočte se aritmetický průměr počtu kolonií z obou misek pro každý mikroorganismus. Tento počet se uvede do protokolu jako skutečný počet mikroorganismů a přepočte se dále podle výkonu aeroskopu a délky odběru na počet bakterií a počet spor plísní v jednom metru krychlovém vzduchu.

## **2.2. Vyšetřování mikroorganismů ve vzduchu sedimentační metodou**

Sedimentační (gravitační) metoda využívá schopnost mikroorganismů sedimentovat na pevné povrchy. Tato metoda, známá již v předminulém století, je nejlevnější a i přes časovou náročnost stále dosud některými laboratořemi metodou používanou.

Dovolujeme si upozornit na skutečnost, že tato metoda by neměla být používána při hodnocení prostor zdravotnických zařízení, které využívají oběhový vzduch. Jedná se o všechny typy klimatizačních zařízení s turbulentním či laminárním prouděním vzduchu. Sedimentační metodou získané výsledky jsou často falešně negativní (mikroorganismy se



pohybují se vzduchem a nesedimentují, i když jsou v ovzduší přítomny, tj. mohou být inhalovány).

### 2.2.1. Pracovní postup při vyšetření vzduchu sedimentační metodou

Ve středu místnosti v inhalační zóně ve výšce 160 cm nad zemí (v případě potřeby i jinde) se umístí dvě uzavřené Petriho misky se živnými médii (viz. 2.1.). Průměr Petriho misky by neměl být menší než 84 mm a větší než 90 mm.

Vzdálenost mezi miskami je nejméně 10, maximálně 30 cm. Poté se misky otevřou a osoba, která provádí odběr, opustí interiér. Přítomnost a pohyb dalších osob ve sledovaném interiéru je vyloučen, pokud není uvedeno jinak. Po určené době, jejíž odhad je možný dle dodatku C, se osoba vrátí a misky uzavře obvyklým způsobem.

Další práce jsou stejné, jako při vyšetření vzduchu aktivním nasáváním (viz. 2.1.1.).

### 2.2.2. Výpočet a vyjádření výsledků při sedimentační metodě

Vypočte se aritmetický průměr počtu kolonií z obou Petriho misek stejného složení. Tento počet se přepočte na dobu expozice 1 hodina. Výsledek je tedy vyjádřen jako celkový počet bakterií nebo spor plísní, které sedimentovaly na jednu Petriho misku za jednu hodinu.

## 2.3. Výskyt patogenních a potenciálně patogenních druhů mikroorganismů ve vzduchu

Výše uvedená vyšetřování vzduchu jsou založena na předpokladu, že se jedná o směsné populace bakterií a směsné populace plísní. Pro směsnou populaci dále platí, že jde o směs různých druhů. Pokud v populaci převažuje jeden či dva dominantní druhy, musí následovat jejich identifikace. I v případě, že se nejedná o druh s nežádoucími vlastnostmi (patogenita, schopnost produkce toxinů), je nález převážně jednoho druhu v populaci hodnocen jako závažnější než v případě populace směsné. Identifikace druhů se vždy provádí v případech, kdy je podezření na onemocnění v souvislosti s pobytem člověka v určitém prostředí.

Pro sledování výskytu patogenních, potenciálně patogenních nebo toxinogenních druhů mikroorganismů je nutné použít selektivní či diagnostická média. Následné identifikace mikroorganismů se provádějí po jejich izolaci. U bakterií převážně dostupnými biochemickými testy (a mikroskopickým určením grampozitivity nebo gramnegativity), u plísní mikroskopickou determinací (a případně potvrzením kultivací na specifických kultivačních půdách, které jsou dostupné zejména pro některé druhy rodu *Aspergillus*). Nověji lze k identifikaci mikroorganismů využít metodu MALDI–TOF MS, která má význam u podezření na vážné onemocnění.

Po identifikaci mikroorganismu se pro hodnocení schopnosti vyvolat infekční onemocnění a alergické nebo toxické projevy v živém organismu může využít zařazení do skupin, které uvádí příloha 7 k nařízení vlády 361/2007 Sb., kterým se stanoví podmínky ochrany zdraví

zaměstnanců při práci. V příloze 7 ČÁST A je Seznam biologických činitelů a jejich zařazení do skupin 2, 3 nebo 4.

Využívá se i příslušná odborná literatura. Pro monitorování výskytu patogenních bakterií, případně bakterií s významnými vlastnostmi, jako je např. rezistence na antibiotika, je možné využít uvedené pracovní postupy odběru vzorků vzduchu s tím, že kultivační půdy, teploty a doby inkubace jsou přizpůsobeny sledovanému mikroorganismu.

## 2.4. Hodnocení výsledků

Pro hodnocení výsledků z většiny prostředí nejsou závazné hygienické limity. Výjimkou je vnitřní prostředí obytných místností některých staveb a čisté prostory. Pro vnitřní prostředí obytných místností stanovuje hygienické limity vyhláška č. 6/2003 Sb., kterou se stanoví hygienické limity chemických, fyzikálních a biologických ukazatelů pro vnitřní prostředí obytných místností některých staveb (zařízení pro výchovu a vzdělávání, vysokých škol, škol v přírodě, staveb pro zotavovací akce, staveb zdravotnických zařízení léčebně preventivní péče, ústavů sociální péče, ubytovacích zařízení, staveb pro obchod a pro shromažďování většího počtu osob).

Obytné místnosti těchto staveb splňují požadavky na kvalitu vnitřního prostředí v případech, kdy je koncentrace bakterií nižší než 500 KTJ.m<sup>-3</sup> a koncentrace spor plísní nižší než 500 KTJ.m<sup>-3</sup>.

Dalším platným předpisem, podle kterého je možné hodnotit koncentrace mikroorganismů ve vzduchu je předpis, který uvádí Státní ústav pro kontrolu léčiv (VYR 32). Ten uvádí koncentrace mikroorganismů pro čisté prostory tříd čistoty C a D určené např. pro provádění méně kritických činností při výrobě sterilních přípravků následovně.

Doporučené limity pro mikrobiologickou kontaminaci čistých prostor ve stavu „za provozu“.

Třída čistoty	Doporučený limit celkového počtu životaschopných mikroorganismů	
	Vzduch (KTJ.m <sup>-3</sup> )	Sedimentace* (KTJ/1 hod)
C	100	12,5
D	200	25

\*Petriho miska průměr 90 mm

V některých případech může pomoci s hodnocením stanovení relativního znečištění. To porovnává koncentrace mikroorganismů uvnitř objektu (u) s koncentracemi mikroorganismů ve venkovním vzduchu (v) před objektem. Relativní znečištění je další z ukazatelů kvality vnitřního prostředí. Poměr u/v se však výrazně mění v závislosti na sezóně (v zimě, kdy je mikroorganismů ve venkovním vzduchu nejméně, je nejvyšší) a na fyzikálních veličinách – teplotě a relativní vzdušné vlhkosti.

Pokud je v letních měsících u/v vyšší než 2,0, hledá se tzv. vnitřní zdroj znečištění. Nejčastěji

se jedná o zanesené filtry čisticích zařízení, potrubí vzduchotechnických zařízení či nárůst mikroorganismů ve vodních nádržkách zvlhčovačů nebo nádržích zdrojů vody pro vlhčení vzduchu klimatizačních zařízení. Tímto způsobem lze prokázat i nerespektování hygienických zásad (především nedostatečný úklid) či nedostatečné větrání v objektu. Pouze při nalezení vnitřního zdroje znečištění je možné navrhnout a provést nápravné opatření.

Další samostatnou kapitolou při hodnocení výsledků je skutečnost, zda uvádět výsledky detekovaného počtu mikroorganismů nebo výsledky pravděpodobného počtu mikroorganismů, které jsou vždy vyšší. Pravděpodobný počet mikroorganismů v ovzduší je počet detekovaných mikroorganismů (viz kapitola 2.4.) vynásobený faktorem, který uvádějí někteří výrobci aeroskopů. S ohledem na charakter hodnocení, tj. zjistit, zda se jedná o populaci směsnou či tvořenou dominantně pouze jedním druhem, je dostačující uvádět detekovaný počet mikroorganismů. Pouze u mikroorganismů detekovaných, které skutečně po kultivaci na agarové půdě vyrostly, je pak možné zjišťovat jejich vlastnosti, jako je patogenita či produkce toxinů. Pokud je jako výsledek počtu mikroorganismů v ovzduší užíváno vyjádření jejich pravděpodobného počtu, je nutné tuto skutečnost uvést v protokolu o výsledcích.

### 3. Vyšetřování povrchů

#### 3.1. Stanovení celkové koncentrace směsné populace bakterií a celkové koncentrace směsné populace spor plísni na površích

##### Oblast použití

Dále uvedené postupy se vztahují na stanovení celkové koncentrace směsné populace bakterií a celkové koncentrace spor směsné populace plísni na površích ve vnitřním prostředí. Tímto kvantitativním kritériem nejsou hodnoceny bakterie patogenní, bakterie potenciálně patogenní a mikroskopické vláknité houby – plísně, které jsou potenciálně patogenní, patogenní, nebo takové mikroskopické vláknité houby, které produkují mykotoxiny.

Z venkovního vzduchu a ze vzduchu vnitřního prostředí sedimentují bakterie a spory plísni na povrchy. Z povrchů se odstraňují úklidem (stírání, vysávání, případně renovace včetně výmalby stěn).

Dále uvedenými postupy je tedy možno hodnotit:

1. Čistotu zvolených interiérů.
2. Požadované snížení koncentrace bakterií a spor plísni po úklidu či renovaci.
3. Nežádoucí zvýšení koncentrace bakterií a spor plísni, ke kterému může docházet při některých činnostech (např. stavební ruch v okolí).

Zvýšené koncentrace bakterií a spor plísni mohou ohrozit zdraví u vnímavých jedinců.

##### Princip metody

Postupem zkoušení se zjišťuje celková koncentrace všech bakterií a plísni, které vyrostou na kultivačních půdách za daných podmínek aerobní inkubace při  $30 \pm 1$  °C za 48–72 hodin (bakterie) a všech plísni, které vyrostou na kultivačních půdách za daných podmínek aerobní inkubace při  $25 \pm 1$  °C za 5–7 dní.

##### Materiál a přístroje

Pro odběry materiálu stěrovou metodou se zakupují nebo připravují agarové půdy do Petriho misek podle aktuálně platných norem. Kromě standardních Petriho misek je možné použít otisková média s konvexním meniskem.

##### Ředící roztok

Obecně je ředícím roztokem sterilní pufrovaná peptonová voda či fyziologický roztok s peptonem.

## Spotřební materiál

Sterilní stěrové tampony, případně sterilní stěrové tampony s médiem, sterilní plachetky či sterilní houbičky.

Biologický termostat s teplotou nastavenou na  $30 \pm 1$  °C a  $25 \pm 1$  °C.

### 3.1.1. Pracovní postup při vyšetření povrchů

Při užití kontaktních ploten se povrch agaru pevně přitlačí na vyšetřovaný povrch. Bezprostředně po vzorkování se plotna uzavře.

Při užití stěrových tamponů se po zvolení místa odběru vzorků rozhodne o velikosti vyšetřované plochy. Nejčastěji se odebírá materiál z plochy 100 cm<sup>2</sup>. Obecně platí, že čím méně mikroorganismů lze na povrchu očekávat, tím je větší vzorkovaná plocha. Plochu lze vyšetřovat s pomocí sterilní šablony, kterou je možné vyrobit z pevnějšího plastového materiálu. V terénu se sterilizuje otřením etanolem.

Před stíráním povrchu se špička stěrového tamponu navlhčí v ředícím roztoku a jeho přebytek se odstraní otřením proti stěně zkumavky. Stírá se za současného otáčení stěrového tamponu několikrát v horizontálním i vertikálním směru.

Po provedení stěru se tampon uloží do původního obalu stěrovky.

V laboratoři se materiál ze stěrového tamponu:

přenesení na povrch agarové půdy v Petriho misce v případě, že se očekává nízká koncentrace mikroorganismů, nebo

vloží do zkumavky s 2,5 ml ředícího roztoku a pro získání výchozí suspenze se důkladně homogemizuje. Výchozí suspenzi je možné dále ředit.

Výchozí suspenze a naředěné suspenze se vysévají na požadovaná agarová média. Po kultivaci se spočítá počet jednotek vytvářejících kolonie.

### 3.1.2. Výpočet a vyjádření výsledků mikroorganismů na površích

Otiskové plotny – výsledek se vyjádří jako počet bakterií nebo plísni (podle tytu agarového média) na plotně.

Stěrové tampony – výsledek se vyjádří jako počet bakterií nebo plísni (podle tytu agarového média) na plochu stěru.

Pro výchozí suspenzi při vytřepání tamponu do 2,5 ml ředícího roztoku a výsevu 0,5 ml suspenze/miska platí

$$N_S = N_P \times 5$$

$N_S$  je počet mikroorganismů/plocha stěru 100 cm<sup>2</sup>.

$N_P$  je průměrný počet mikroorganismů na miskách při výsevu výchozí suspenze 0,5 ml.

### 3.2. Hodnocení výsledků

Jedinou dostupnou legislativní normou je výše citovaná vyhláška č. 6/2003 Sb. V té je uvedeno: § 5 Limity výskytu mikroorganismů. Nepřípustný je viditelný nárůst plísní na zdech a povrchu obytných místností. Ve sporných případech se za prokázaný růst plísní na povrchu považuje nález potvrzený odběrem a kultivací.

Pro hodnocení výskytu mikroorganismů na površích je možné využít i Doporučené limity, které uvádí Státní ústav pro kontrolu léčiv (VYR 32 a VYR 36). Ten uvádí koncentrace mikroorganismů pro čisté prostory tříd čistoty C a D určené např. pro provádění méně kritických činností ve výrobě sterilních přípravků následovně:

Mikrobiologická kontaminace čistých prostor na površích

Třída čistoty	Doporučený limit celkového počtu životaschopných mikroorganismů	
	Kontaktní desky průměr 55 mm (KTJ/deska)	Přepočet na plochu stěru 100 cm <sup>2</sup>
C	25	105
D	50	210

## 4. Závěr

Dospělý člověk denně potřebuje přibližně 12 tisíc litrů vzduchu. Na kvalitě vzduchu, který dýcháme, tedy velmi záleží.

Mikroorganismy ze vzduchu mohou ovlivnit zdraví člověka významným způsobem. U pacientů s výrazně poškozeným imunitním systémem mohou rozhodovat i o jeho životě. Tato skutečnost je člověku známa již velmi dlouho. Také z tohoto důvodu byla vyvinuta řada přístrojů, které mají mikroorganismy z prostředí eliminovat. Pouhé zakoupení a uvedení takového zařízení do provozu však neznamená, že mikroorganismy jsou z ovzduší vnitřního prostředí průběžně eliminovány. Vzduch by měl být pravidelně kontrolován, jen tak je možné zjistit, zda jsou uvedená zařízení skutečně funkční.

### Dodatek A

K nežádoucímu zvýšení koncentrace bakterií i plísní v ovzduší může docházet zejména v dále uvedených případech:

- Čističe vzduchu se zanesenými filtry (nedostatečná četnost výměny filtrů).
- Potrubí klimatizace s nárůsty bakterií nebo plísní či zanesenými filtry (nedostatečná péče o tato zařízení).
- Nedostatečná péče o čistotu vody ve zvlhčovačích vzduchu nebo nádržích zdrojů vody pro vlhčení vzduchu klimatizačních zařízení.
- S kontaminovanou vodou mohou být mikroorganismy vnášeny do bioaerosolu interiéru.
- Nárůsty mikroorganismů na zdech interiéru v důsledku nevhodné péče o interiér – kondenzace vzdušné vlhkosti na zdech v souvislosti s aktivitami, jako je praní, vaření, sušení v součinnosti s nedostatečnou frekvencí výměny vzduchu (větrání).
- Nárůsty mikroorganismů na zdech interiéru v důsledku stavební závady, která způsobuje vlhké zdi.
- Nedodržování hygienického režimu (především úklid a větrání v součinnosti s vytápěním).
- Aktivita lidí související se zvýšenou prašností.

### Dodatek B

Přítomnost a pohyb osob v prostředí mimo osobu provádějící odběr ve sledovaném interiéru

Přítomnost a pohyb dalších osob ve sledovaném interiéru je povolen v případech, kdy je sledována koncentrace směsné populace bakterií nebo spor plísní v souvislosti s aktivitou těchto lidí a to zejména při:

- aktivní lidské činnosti související se zvýšenou prašností,
- sledování změny koncentrací bakterií a spor plísní v ovzduší v souvislosti s určitou činností,
- nemožnosti přítomnosti lidí z uvedeného prostředí vyloučit.

## Dodatek C

Odhad doby expozice otevření agarových misek při sedimentační metodě.

Odběrové místo	Doba expozice (hodiny)
Prostory se zvýšeným požadavkem na čistotu	4
Prostory s běžnými nároky na kvalitu prostředí	1
Prostory s předpokládaným znečištěním ovzduší bioaerosolem	0,3–0,5



## Literatura

Brandys RC, Brandys GM. Worldwide exposure standards for mould and bacteria - historical and current perspectives. 6th ed. Hinsdale: Occupational and Environmental Health Consulting Services; 2006.

Fungi and bacteria. In: Humfrey C, Shuker L, Harrison P, editors. Indoor air quality in the home. Leicester: Institute for Environment and Health; 1996. p. 290-307.

Hyvärinen A, Reponen T, Husman T, Ruuskanen J, Nevalainen A. Characterising mould problem buildings - concentrations and flora of viable fungi. *Indoor Air*. 1993 Dec;3(3):337-43.

Klánová K. Standardní operační postupy pro vyšetřování mikroorganismů v ovzduší a pro hodnocení mikrobiologického znečištění ovzduší ve vnitřním prostředí. *Acta Hyg Epidemiol Microbiol*. 2002;(1):1-21.

Klánová K. Výskyt plísní v nedostatečně větraných místnostech domů s novými okny. *Tepelná ochrana budov*. 2009;12(6):34-7.

Macháček P. Vliv plísní na organismus a alergická onemocnění způsobená houbami. *Alergie*, 2004;6(1):30-42.

Macher J, editor. *Bioaerosol: assesment and control*. Cincinnati: ACGIH; 1999.

Malíř R, Ostrý V. *Vláknité mikromycety (plísně), mykotoxiny a zdraví člověka*. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů v Brně; 2003.

Meklin T, Husman T, Vepsäläinen A, Vahteristo M, Koivisto J, Halla-Aho J, et al Indoor air microbes and respiratory symptoms of children in moisture damaged and reference schools. *Indoor Air*. 2002 Sep;12(3):175-83.

Oliveira M, Ribeiro H, Delgado JL, Abreu I. The effects of meteorological factors on airborne fungal spore concentration in two areas differing in urbanisation level. *Int J Biometeorol*. 2009 Jan;53(1):61-73.

Pasanen AL, Pasanen P, Jantunen MJ, Kalliokoski P. Significance of air humidity and air velocity for fungal spore release into the air. *Atmos Environ*. 1991;25(2):459-61.

Rao CY, Burge HA, Chang JC. Review of quantitative standards and guidelines for fungi in indoor air. *J Air Waste Manag Assoc*. 1996 Sep;46(9):899-908.

Schwab CJ, Cooley JD, Brasel T, Jumper CA, Graham SC, Straus DC. Characterization of exposure to low levels of viable *Penicillium chrysogenum* conidia and allergic sensitization induced by a protease allergen extract from viable *P. Chrysogenum* conidia in mice. *Int Arch Allergy Immunol*. 2003 Mar;130(3):200-8.

## **Zákony, nařízení, vyhlášky, normy**

Nařízení vlády č. 361/2007 ze dne 12. prosince 2007, kterým se stanoví podmínky ochrany zdraví při práci. Sbírka zákonů ČR. 2007;částka 111:5086-5229.

Vyhláška č. 6/2003 ze dne 16. prosince 2002, kterou se stanoví limity chemických, fyzikálních a biologických ukazatelů pro vnitřní prostředí pobytových místností některých staveb. Sbírka zákonů ČR. 2003;částka 4:121-5.

ČSN EN ISO 14698-1 (125370) Čisté prostory a příslušné řízené prostředí - Regulace biologického znečištění - Část 1: Hlavní principy a metody. Praha: Český normalizační institut; 2004.

ČSN EN ISO 14698-2 (125370) Čisté prostory a příslušné řízené prostředí - Regulace biologického znečištění - Část 2: Vyhodnocení a výklad údajů o biologickém znečištění. Praha: Český normalizační institut; 2004.

VYR-32 pokyny pro správnou výrobní praxi - doplněk 1: výroba sterilních léčivých přípravků [online]. Praha: SÚKL; 2009 [cit. 2021-10-21]. Dostupné z: <https://www.sukl.cz/leciva/vyr-32-dopl-1-verze-1>.

VYR-36 čisté prostory [online]. Praha: SÚKL; 2009 [cit. 2021-10-21]. Dostupné z: <https://www.sukl.cz/leciva/vyr-36>.

ČSN EN ISO 4833-2 (560083) Mikrobiologie potravinového řetězce - Horizontální metoda pro stanovení počtu mikroorganismů - Část 2: Technika roztěrem a počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví; 2014.

ČSN EN ISO 18593 - Mikrobiologie potravinového řetězce - Horizontální metody specifikující techniky vzorkování z povrchů. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví; 2019.

ČSN EN 13098 (833624) Expozice pracoviště - Měření vzdušných mikroorganismů a mikrobiálních sloučenin - Obecné požadavky. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví; 2020.

## 5. Příklady vyšetření vnitřního prostředí provedené laboratoří NRL pro mikrobiologii potravin, PBU a prostředí

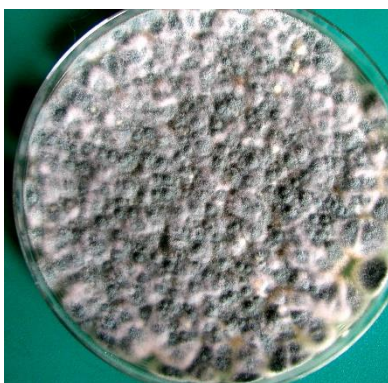
Vyšetření vzduchu aeroskopem, odběr 100 l/min, agarová půda



V závislosti na složení agarové půdy a teplotě kultivace mohou být ze stejného prostředí rozdílné výsledky.

Vyšetření vzduchu aeroskopem, odběr 100 l/min, Sabouraudova agarová půda (listopad 2019)

Místnost s plísněmi na zdech



Před objektem



Větší nárůsty plísní na zdech jsou doprovázeny vysokou koncentrací spor plísní ve vzduchu takových místností.

Od podzimu do jara je výskyt spor plísní ve vzduchu venkovního prostředí minimální.

Vyšetření vzduchu aeroskopem, odběr 100 l/min, Sabouraudova agarová půda (červen 2018)

V kanceláři



Před objektem



V létě je po vyvětrání a uzavření oken většinou spor plísní ve vzduchu méně než ve venkovním prostředí.

Vyšetření vzduchu aeroskopem, odběr 100 l/min, Sabouraudova agarová půda

Místnost s plísněmi na zdech



Před objektem



Spektrum plísní ve vzduchu místnosti s plísněmi na zdech je často jiné než ve venkovním prostředí.

## Vyšetření povrchů

Otisková miska, Sabouraudův agar



Vytřepání tamponu do 2,5 ml ředícího roztoku a výsev 0,5 ml



Na ne zcela čistém povrchu nelze použít otiskovou plotnu – příklad nevhodného vyšetření (vlevo).

Stěr z plochy 100 cm<sup>2</sup> čistého povrchu (vpravo).

Přímý přenos materiálu ze stěrového tamponu na agarové půdy, stěr z plochy 100 cm<sup>2</sup>



Zdivo před výmalbou (vlevo).

Zdivo s viditelným nárůstem plísní (vpravo).



Kožené křeslo s nárůstem plísní (vlevo).

Koberec s nárůstem plísní (uprostřed).

Opadavá malba vlhkého suterénního prostoru (vpravo).