

Acta hygienica, epidemiologica et microbiologica
číslo 1/2002

**Standardní operační postupy
pro vyšetřování mikroorganismů
v ovzduší a pro hodnocení mikrobiologického znečištění ovzduší ve
vnitřním prostředí**

Praha, listopad 2001

Předseda redakční rady: doc. MUDr. L. Komárek, CSc.

Členové: prof. MUDr. V. Bencko, DrSc., MUDr. J. Mika,
RNDr. F. Rettich, CSc., A. Svobodová,
Mgr. J. Veselá, MUDr. M. Vít.

Vydává Státní zdravotní ústav v Praze
ISSN 0862-5956

ACTA HYGIENICA, EPIDEMIOLOGICA ET MICROBIOLOGICA
číslo 1/2002

**Standardní operační postupy pro vyšetřování mikroorganismů
v ovzduší a pro hodnocení mikrobiologického znečištění ovzduší ve
vnitřním prostředí**

Autor: Kateřina Klánová, SZÚ - CZŽP

Vytiskl: Ústav jaderných informací, Praha 5 – Zbraslav,
Elišky Přemyslovny 1335
rok vydání: 2002, náklad 540 výtisků

Vydal Státní zdravotní ústav, 100 42 Praha 10, Šrobárova 48
Tel. Redakce: 02-67082288, e-mail ahemszu@szu.cz

OBSAH

1.	Úvod	1
2.	Stanovení celkové koncentrace směsné populace bakterií a celkové koncentrace směsné populace plísní v ovzduší.....	3
2.1.	Stanovení celkové koncentrace směsné populace bakterií.....	3
2.2.	Stanovení celkové koncentrace směsné populace plísní.....	5
2.3.	Pracovní postup při odběrech ovzduší.....	6
2.4.	Výpočet a vyjádření výsledků.....	7
3.	Hodnocení výsledků.....	7
3.1.	Pobytové místnosti.....	8
3.2.	Domácnosti.....	9
3.3.	Nemocnice.....	9
4.	Dodatečná stanovení.....	10
4.1.	Stanovení relativního znečištění.....	10
4.2.	Výskyt patogenních a potenciálně patogenních druhů mikroorganismů.....	11
5.	Vyšetřování mikroorganismů v ovzduší jinými způsoby.....	12
5.1.	Aktivní nasávání vzduchu.....	12
5.2.	Sedimentační metoda.....	15
5.2.1.	Stanovení celkového počtu směsné populace bakterií a směsné populace plísní v ovzduší vnitřního prostředí sedimentační metodou.....	15
5.2.2.	Výpočet, vyjádření výsledků a hodnocení při sedimentační metodě.....	16
6.	Závěr.....	17
	Dodatek A.....	18
	Dodatek B.....	19
	Dodatek C.....	20
	Odkaz na literární údaje.....	21

1. Úvod

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

Ve venkovním ovzduší i v ovzduší 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.

Mikroorganismy jako jedny ze škodlivin v aerosolu vnitřního prostředí mohou vyvolat několik nežádoucích účinků na zdraví od nevolností a potíží smyslového ústrojí až k vážnému ohrožení zdraví.

Zdravotní obtíže, které mikroorganismy způsobují, jsou jak nemoci dobře definované, tak méně dobře definované syndromy. Kromě infekčních onemocnění patří mezi nejznámější rýmy, kašel, bolesti hlavy, astma, záněty průdušek a atopické dermatitidy. Mikroorganismy jsou uváděny i jako jeden z původců onemocnění z budov (SBS - Sick Building Syndrome).

Z mikroorganismů jsou bakterie a mikroskopické vláknité houby - plísně uváděny jako významné alergenů 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, podávání širokospektrých antibiotik či po terapii ozařováním). Systémové mykózy jsou téměř vždy způsobeny plísněmi z vnějšího prostředí. V těle zdravého člověka vláknité mikroskopické houby, například rodu *Aspergillus*, nežijí - nejsou endogenní.

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

Tato vyšetřování mají nezastupitelný význam i pro sledování kvality čistých provozů. Nejnovější výsledky výzkumu totiž ukazují, že mikroorganismy detekované z pevných povrchů nejsou vždy totožné s mikroorganismy nalézány v ovzduší. Člověkem inhalovány však mohou být pouze mikroorganismy ze vzdušného aerosolu.

Na rozdíl od ostatních škodlivin v interiéru (kromě roztočů) se mohou mikroorganismy v různých místech vnitřního prostředí kumulovat (v potrubí vzduchotechniky, na filtrech čistících zařízení, v nádržkách zvlhčovačů, v kobercích a čalouněném nábytku aj.) a při vhodných podmínkách (teplota, vlhkost) i rozmnožovat. Z těchto míst se dostávají s pohybujícím se vzduchem do bioaerosolu vnitřního prostředí, kde se mohou vyskytovat i v koncentracích několiknásobně vyšších než je jejich koncentrace ve venkovním ovzduší.

Je známou skutečností, že lidé současné doby tráví nejvíce času ve vnitřním prostředí. Alergická onemocnění, včetně alergií na bakterie a plísně se vyskytují stále častěji. Z tohoto důvodu jsou velmi často užívána v interiérech různá technická zařízení, která mají sloužit, mimo jiné, i ke snížení koncentrací mikroorganismů z ovzduší. Při nedostatečné péči se však tato zařízení mohou naopak stát rezervoárem, ve kterém se mikroorganismy hromadí i rozmnožují a ze kterého se do ovzduší uvolňují.

Předložené standardní operační postupy jsou určeny pro práci těch laboratoří, které dosud nemají vlastní zkušenosti a příslušné metody pro vyšetřování koncentrací mikroorganismů v ovzduší a chtějí se uvedenými sledováními zabývat v pobytových místnostech v souladu s § 13 zákona č. 258 /2000 Sb., O ochraně veřejného zdraví nebo v pracovním prostředí v souladu s ČSN EN 13098 Ovzduší na pracovišti - Směrnice pro měření vzdušných mikroorganismů a endotoxinů. Těmito postupy lze však vyšetřovat i ovzduší ve všech dalších prostorách uvnitř budov, v případě potřeby i ve venkovním ovzduší.

Uvedené standardní operační postupy je možné použít do Příručky jakosti v seznamu přihlašovaných metod pro účely akreditačního řízení.

2. Stanovení celkové koncentrace směsné populace bakterií a celkové koncentrace směsné populace plísní v ovzduší

2.1. Stanovení celkové koncentrace směsné populace bakterií

Oblast použití

Tento postup se vztahuje na stanovení celkové koncentrace směsné populace bakterií v ovzduší vnitřního prostředí. Tímto kvantitativním kritériem nejsou hodnoceny bakterie patogenní a bakterie potenciálně patogenní.

V bioaerosolu ovzduší venkovního i vnitřního prostředí jsou bakterie přítomny téměř vždy, uvedeným postupem je tedy možno hodnotit:

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

Princip metody

Postupem zkoušení se zjišťuje celková koncentrace všech bakterií, které vyrostou na kultivační půdě za daných podmínek aerobní inkubace při 30 ± 1 °C za 48-72 hodin.

Kultivační média

Pro odběry vzduchu aktivním nasáváním se zakupují nebo připravují agarové půdy do Petriho misek dle ČSN ISO 4833.

Přístroje a pomocná zařízení

Přístroj A-AIR-010 je určen pro odběr vzorků vzduchu aktivním nasáváním, objem nasávaného vzduchu (přímo úměrný času, po který je vzduch nasáván) je závislý na předpokládané koncentraci bakterií v ovzduší. Doporučené objemy nasávaného vzduchu pro jednotlivé typy interiérů jsou uvedeny v Dodatku B.

Petriho misky z umělé hmoty o průměru 84-90 mm.

Biologický termostat s teplotou nastavenou na 30 ± 1 °C.

2.2. Stanovení celkové koncentrace směsné populace plísní

Oblast použití

Tento postup se vztahuje na stanovení celkové koncentrace směsné populace plísní v ovzduší vnitřního prostředí. Tímto kvantitativním kritériem nejsou hodnoceny mikroskopické vláknité houby - plísně, které jsou potenciálně patogenní, patogenní, nebo takové mikroskopické vláknité houby, které produkují mykotoxiny.

V bioaerosolu ovzduší venkovního i vnitřního prostředí jsou plísně přítomny téměř vždy, uvedeným postupem je tedy možno hodnotit:

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

Princip metody

Postupem zkoušení se zjišťuje celková koncentrace všech plísní, které vyrostou na kultivační půdě za daných podmínek aerobní inkubace při 25 ± 1 °C za 3-5 dnů.

Kultivační média

Pro odběry vzduchu aktivním nasáváním se zakupují nebo připravují agarové půdy do Petriho misek dle ČSN ISO 7954.

Přístroje a pomocná zařízení

Přístroj A-AIR-010 je určen pro odběr vzorků vzduchu aktivním nasáváním, objem nasávaného vzduchu (přímo úměrný času, po který je vzduch nasáván) je závislý na předpokládané koncentraci plísní v ovzduší. Doporučené objemy nasávaného vzduchu pro jednotlivé typy interiérů jsou uvedeny v Dodatku B.

Petriho misky z umělé hmoty o průměru 84-90 mm.

Biologický termostat s teplotou nastavenou na 25 ± 1 °C.

2.3. Pracovní postup při odběrech ovzduší

Stanovení celkového počtu směsné populace bakterií i celkové koncentrace směsné populace plísní v ovzduší vnitřního prostředí se provádí ve vnitřním prostředí po 20 minutách důkladného vyvětrání a po další jedné hodině uzavření oken.

V případě čistých provozů a dalších prostorů s klimatizací bez možnosti větrání jsou nutné odběry v prostředí bez provozu, nejdříve za 20 minut od ukončení činnosti.

Ve středu místnosti v inhalační zóně ve výšce 160 cm nad zemí se provedou dva odběry ovzduší. 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 C.

Pro odběry je možno zvolit i jiné místo (umístění přístroje, nadzemní výška) podle účelu vyšetření. Tuto skutečnost je nutné zaznamenat do protokolu o měření

Mezi jednotlivými odběry je odběrová horní část přístroje očištěna ubrouskem napuštěným v dezinfekčním přípravku nebo tamponem smočeným v roztoku dezinfekčního přípravku.

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

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 chladící přenosné kabely.

Pro stanovení celkového počtu směsné populace bakterií se inkubace provádí při 30 ± 1 °C po dobu 48 až 72 hodin. Po inkubaci se spočítají vyrostlé kolonie bakterií.

Pro stanovení celkového počtu směsné populace plísní se inkubace provádí při teplotě 25 ± 1 °C po dobu 3-5 dnů. Po inkubaci se spočítají vyrostlé kolonie mikroskopických vláknitých hub - plísní.

2.4. Výpočet a vyjádření výsledků

Vypočte se aritmetický průměr počtu kolonií z obou misek. Tento počet se vynásobí faktorem, který je uveden v Dodatku B tak, aby byl výsledek vyjádřen jako celkový počet bakterií nebo celkový počet plísní v jednom metru krychlovém vzduchu odebraného aktivním nasáváním.

3. Hodnocení

Hodnocení se provádí po zařazení stanovené koncentrace bakterií a plísní v ovzduší do jedné z pěti kategorií znečištění: velmi nízké, nízké, střední, vysoké a velmi vysoké. Tyto kategorie znečištění jsou uváděny Evropskou unií na základě průměrných naměřených hodnot v ovzduší vnitřního prostředí (EUR 14988). Kategorie znečištění jsou odlišné pro domácnosti a neprůmyslové prostředí s výjimkou nemocnic.

3.1. Pobytové místnosti

V souladu s § 13 zákona č. 258 /2000 Sb., O ochraně veřejného zdraví, jsou uživatelé 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 povinni zajistit, aby vnitřní prostředí pobytových místností v těchto stavbách odpovídalo hygienickým limitům chemických, fyzikálních a biologických ukazatelů, upravených prováděcími právními předpisy. Jeden ze sledovaných biologických ukazatelů, uvedený v návrhu vyhlášky k výše uvedenému zákonu, jsou koncentrace mikroorganismů, tj. bakterií a plísní v ovzduší.

Kategorie znečištění ovzduší mikroorganismy pro pobytové místnosti jsou uvedeny v tab. 1.

Tab. 1: Kategorie znečištění ovzduší vnitřního prostředí dle EUR 14988 - kritérium koncentrace směsné populace bakterií a směsné populace plísní v ovzduší pobytových místností

Kategorie znečištění	Bakterie (KTJ . m ⁻³)	Plísně (KTJ . m ⁻³)
velmi nízké	< 50	< 25
nízké	< 100	< 100
střední	< 500	< 500
vysoké	< 2 000	< 2 000
velmi vysoké	> 2 000	> 2 000

Hygienickým limitem koncentrace mikroorganismů v ovzduší vnitřního prostředí je koncentrace směsné populace bakterií a směsné populace plísní do kategorie znečištění střední (včetně).

3.2. Domácnosti

Koncentrace mikroorganismů v ovzduší domácností není pokryta v současné době žádným legislativním podkladem. Kategorie znečištění ovzduší mikroorganismy zjištěné na základě vyšetření a porovnáním s hodnotami dle EUR 14988 lze tedy považovat za hodnoty doporučené. Také v tomto případě je za hygienický limit koncentrace mikroorganismů v ovzduší považována koncentrace směsné populace bakterií a směsné populace plísní do kategorie znečištění střední (včetně).

Zařazení do kategorií znečištění ovzduší mikroorganismy pro domácnosti jsou uvedeny v tab. 2.

Tab. 2: Kategorie znečištění ovzduší vnitřního prostředí dle EUR 14988 - kritérium koncentrace směsné populace bakterií a směsné populace plísní v ovzduší domácností

Kategorie znečištění	Bakterie (KTJ . m ⁻³)	Plísně (KTJ . m ⁻³)
velmi nízké	< 100	< 50
nízké	< 500	< 200
střední	< 2 500	< 1 000
vysoké	< 10 000	< 10 000
velmi vysoké	> 10 000	> 10 000

3.3. Nemocnice

Stavby nemocnic představují komplex různých vnitřních prostor s odlišnými požadavky na čistotu. Zařazení jednotlivých prostor do kategorií znečištění závisí na zřizovateli objektu. Lze uvést, že kategorie znečištění velmi nízké odpovídá velmi přibližně kritériu čistoty 2 definované počtem částic, kategorie znečištění nízké pak kritériu čistoty 4 definované počtem částic.

Ve směsných populacích bakterií a směsných populacích plísní ve vzdušném aerosolu nemocničního prostředí se nesmí vyskytovat patogenní a potenciálně patogenní druhy mikroorganismů s ohledem na pobyt pacientů, jejichž imunitní systém má často sníženou schopnost reagovat na infekci.

4. Dodatečná vyšetření

4.1. Stanovení relativního znečištění

Jako dodatečné stanovení se provádí odběr vzorků venkovního ovzduší. Tyto odběry se provádějí ve venkovním prostředí před objektem nebo z okna. Pracovní postup je stejný jako při odběrech vnitřního prostředí.

Toto stanovení umožňuje vyjádření výsledků stanovením tzv. relativního znečištění u/v (koncentrace uvnitř/ koncentrace venku), tj. porovnáním stanovené koncentrace ve vnitřním prostředí s koncentrací ve venkovním ovzduší.

Při vyšetřování ovzduší je výhodné provést hodnocení získaných výsledků jak zařazením do kategorií znečištění ovzduší, tak stanovit relativní znečištění.

Relativní znečištění je další z ukazatelů kvality vnitřního prostředí. Poměr u/v se mění v závislosti na sezóně. V zimě, kdy je mikroorganismů ve venkovním vzduchu nejméně, je nejvyšší. Poměr u/v je závislý i na fyzikálních veličinách - teplotě a relativní vzdušné vlhkosti. Proto je jako součást vyšetření vnitřního prostředí vhodné provádět i tato stanovení. Stanovení poměrného znečištění u/v vypovídá více o znečištění vnitřního prostředí v případě, že se hodnoty vnitřních a venkovních teplot a relativních vzdušných vlhkostí příliš neodlišují. Za hygienicky závažné poměrné znečištění se považuje hodnota u/v vyšší než 2,0. Hodnota $u/v = 2,0$ znamená, že koncentrace mikroorganismů je uvnitř objektu dvakrát vyšší než ve venkovním vzduchu. Pokud u/v je vyšší než 2,0, hledá se tzv. vnitřní zdroj znečištění. Nejčastěji se jedná o zanesené filtry čistících 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), nedostatečné větrání či nízkou infiltraci v objektu. Pouze při nalezení vnitřního zdroje znečištění je možné navrhnout a provést nápravné opatření.

4.2. Výskyt patogenních a potenciálně patogenních druhů mikroorganismů

Výše uvedená hodnocení koncentrací směsných populací mikroorganismů jsou založena na předpokladu, že se jedná o směsné populace bakterií a směsné populace plísní. Toto hodnocení není vhodné v případě výskytu patogenních, potenciálně patogenních a toxinogenních druhů mikroorganismů. Výskyt těchto mikroorganismů v bioaerosolu vnitřního prostředí je z hygienického hlediska nepřijatelný.

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 v určitém prostředí.

Identifikace mikroorganismu se provádí po jeho 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*). Po identifikaci mikroorganismu se pro hodnocení patogenity nebo schopnosti produkce toxinů využívá příslušná odborná literatura.

Pro monitorování výskytu patogenních bakterií, případně bakterií s významnými vlastnostmi jako je rezistence na antibiotika apod., je možné využít uvedené pracovní postupy odběru vzorků s tím, že kultivační půdy, teploty a doby inkubace je vždy nutno přizpůsobit sledovanému mikroorganismu.

5. Vyšetřování mikroorganismů v ovzduší jinými způsoby

V současné době existují v podstatě čtyři druhy metod, kterými lze mikroorganismy v ovzduší sledovat. Jsou to metody, při nichž jsou mikroorganismy z ovzduší aktivně nasávány, nebo při kterých je využívána schopnost částic sedimentovat.

5.1. Aktivní nasávání vzduchu

Metody, při nichž je vzduch aktivně nasáván, se liší ve způsobu, jakým je vzduch nasáván a na jaký typ média jsou mikroorganismy zachycovány.

Tzv. impakční metody využívají pro průchod vzduchu sací hlavu s otvory, mikroorganismy jsou zachycovány na agarová média v Petriho miskách. Princip této metody využívají v současné době v ČR nejčastěji používané přístroje (tzv. aeroskopy): A-AIR-010, Andersen six stage sampler, Loreco impactor, Mas-100 a Sampler'air. Impakční metody však využívají i přístroje RCS PLUS a RCS high flow (vzduch je nasáván centrifugací na stripy s agarovou půdou).

Metody filtrační zachycují mikroorganismy na filtry, které jsou dále vkládány na Petriho misky s agary (např. Sartorius MD 8).

Metody označované jako impigement využívají pro zachycení mikroorganismů tekutá média či pohybující se tekutá média (např. Biosampler).

Každá z uvedených metod má své výhody a nevýhody, jejichž popsání by přesáhlo rozsah tohoto sdělení.

Pouze při vyšetřování ovzduší přístroji s aktivním nasáváním vzduchu při objemovém průtoku vzduchu nižším než $100 \text{ l} \cdot \text{min}^{-1}$ na agarová média dle ČSN ISO 4833 a ČSN ISO 7954 nebo uvedenými v EUR 14988 je možné použít pro hodnocení zde uvedená kritéria kategorií znečištění převzatá z EUR 14 988.

V minulosti byla již několikrát publikována snaha o získání faktoru, kterým by výsledky získané různými přístroji a metodami byly navzájem převoditelné. Následné práce však vždy prokázaly, že to není možné.

Tato skutečnost je dána jak fyzikálními zákony, tak samotnými vlastnostmi mikroorganismů.

Z fyzikálního hlediska lze mikroorganismy považovat za pevné částice, které se však v bioaerosolu vyskytují buď samostatně nebo ve shlucích či navázány na další částice aerosolu. Různě velké částice jsou jednotlivými přístroji nasávány různými rychlostmi, která je dána nejen objemovým průtokem vzduchu, ale i velikostí a počtem otvorů v sací hlavě a vzdáleností otvorů od povrchu agarové vrstvy i dalšími faktory. K poměrně závažné skutečnosti patří i to, že každým přístrojem je vzduch nejen nasáván, ale i vypouštěn. Právě vycházející vzduch může "kontaminovat" vzduch, který je nasáván.

Z mikrobiologického hlediska je vždy podstatné složení agarového média a kultivační podmínky pro růst mikroorganismů. Zadáním těchto parametrů se vždy upřednostňuje růst jedněch a inhibuje nebo zpomaluje růst a množení jiných mikroorganismů.

Vyšší vypovídací hodnotu mají samozřejmě výsledky získané při odebírání ovzduší za delší časový úsek, což při mikrobiologickém vyšetření znamená odběr přístrojem s nižším objemovým průtokem vzduchu, nebo provedení několika odběrů na více misek v případě použití přístroje s vyšším objemovým průtokem vzduchu.

Hodnocení výsledků koncentrací mikroorganismů v ovzduší je prováděno porovnáním s hodnotami dle EUR 14988. Kategorie znečištění ovzduší uvedené v tomto doporučení byly vytvořeny na základě průměrných naměřených hodnot v ovzduší vnitřního prostředí a nikoli podle odhadu zdravotních rizik. Tyto hodnoty byly získány na základě výsledků vyšetřování ovzduší přístroji s objemovým průtokem vzduchu $28 \text{ l}\cdot\text{min}^{-1}$ (Andersen six stage sampler a N6-Andersen one stage sampler) s použitím jiných kultivačních půd i teplot inkubace než těch, které používáme v laboratořích Centra zdraví a životního prostředí Státního zdravotního ústavu.

Přesto můžeme uvést, že jsme ověřili, že zařazení do kategorií znečištění dle EUR 14988 lze použít i při vyšetřování mikroorganismů v ovzduší přístroji A-AIR-010 ($67 \text{ l}\cdot\text{min}^{-1}$) a samozřejmě Andersen six stage sampler ($28 \text{ l}\cdot\text{min}^{-1}$) s kultivačními půdami a podmínkami inkubace dle ČSN ISO 4833 a ČSN ISO 7954 a dále při vyšetřování ovzduší přístrojem RCS PLUS ($50 \text{ l}\cdot\text{min}^{-1}$) s agarovými stripy TC a YM při teplotě inkubace 30, resp. $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Při používání přístrojů s vyšším objemovým průtokem vzduchu než $67 \text{ l}\cdot\text{min}^{-1}$ je nutné provést porovnávací měření s některým z výše zmíněných přístrojů, neboť

výsledky získané těmito přístroji jsou vždy vyšší - vyšetřované prostředí by bylo zařazeno do „horší“ kategorie znečištění.

Další samostatnou kapitolou při hodnocení 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. Výpočet a vyjádření výsledků) vynásobený faktorem, který uvádějí někteří výrobci aeroskopů.

S ohledem na charakter hodnocení, tj. znát nejen celkový počet mikroorganismů, ale zjistit i to, 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.

5.2. Sedimentační metoda

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

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 přítomné, tj. mohou být inhalovány).

5.2.1. Stanovení celkového počtu směsné populace bakterií a směsné populace plísni v ovzduší vnitřního prostředí sedimentační metodou

Odběr vzorků vzduchu

Ve středu místnosti v inhalační zóně ve výšce 160 cm nad zemí se umístí dvě uzavřené Petriho misky se živnými médii pro stanovení bakterií (ČSN ISO 4833) a plísni (ČSN ISO 7954). 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 - viz dodatek C.

Po určené době, jejíž odhad je možný dle dodatku B, se osoba vrátí a misky uzavře obvyklým způsobem.

Průměr Petriho misky nesmí být menší než 84 mm a větší než 90 mm.

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 kabely.

Pro stanovení celkového počtu směsné populace bakterií se inkubace provádí při 30 ± 1 °C po dobu 48 až 72 hodin. Po inkubaci se spočítají vyrostlé kolonie bakterií.

Pro stanovení celkového počtu směsné populace plísni se inkubace provádí při teplotě 25 ± 1 °C po dobu 3-5 dnů. Po inkubaci se spočítají vyrostlé kolonie mikroskopických vláknitých hub.

5.2.2. Výpočet, vyjádření výsledků a hodnocení při sedimentační metodě

Výpočet a vyjádření výsledků

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

Hodnocení

Výsledky získané sedimentační metodou nemohou být hodnoceny dle EUR 14988.

Pro obytné místnosti se považují hodnoty 50 KTJ bakterií / Petriho misku / hod. a 50 KTJ plísni / Petriho misku / hod. za hodnoty, které přibližně odpovídají kategorii znečištění střední dle EUR 14988.

Pokud se využívá pro mikrobiologicko-hygienické hodnocení prostředí tato metoda, mělo by vždy být vyjádřeno i relativní znečištění, tj. provést i stanovení mikroorganismů ve venkovním ovzduší.

6. Závěr

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

Mikroorganismy z ovzduší 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 neznamena, že mikroorganismy jsou z ovzduší vnitřního prostředí průběžně eliminovány. Ovzduší by mělo být pravidelně kontrolováno, jen tak je možné zjistit, zda jsou uvedená zařízení skutečně funkční.

Pacientů s výrazně poškozeným imunitním systémem je mnohem méně, než pacientů alergologických ambulancí. V posledních 30 letech došlo k výraznému, až čtyřnásobnému, nárůstu pacientů s alergickým onemocněním, hlavně toho nejzávažnějšího – průduškového astmatu. Za jednu z multifaktoriálních příčin tohoto jevu je považována nárazová a netypická antigenní stimulace. Právě ta může být vyvolána mikroorganismy z ovzduší. Mikroorganismy z ovzduší však mohou ovlivnit zdraví i v důsledku další z příčin alergií, a to je narušení ochranných slizničních bariér. Narušená ochranná slizniční bariéra dýchacích cest je stále prostupnější pro vzdušné alergeny. Kolektivní zařízení v našich civilizovaných podmínkách (mateřské školy, supermarkety a další) tomu významně napomáhají.

Sledování koncentrací mikroorganismů v ovzduší může zabránit i nadbytečnému užívání chemických a dezinfekčních přípravků – také ty negativně ovlivňují lidské zdraví.

Znat koncentrace bakterií a plísní ve vnitřním prostředí člověka má tedy mnoho významů. Na úrovni současných znalostí je nelze nahradit žádným jiným vyšetřením, jako je např. stanovení počtu pevných částic či detekcí mikroorganismů na pevných površích.

Dodatek A

K nežádoucímu zvýšení koncentrace bakterií i plísní v ovzduší může docházet v 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 v 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

Doporučené objemy nasávaného vzduchu pro jednotlivé typy interiérů při odběrech vzduchu přístrojem A-AIR-010. Faktor pro výpočet celkové koncentrace směsné populace bakterií nebo směsné populace plísní v jednom metru krychlovém.

Odběrové místo	Objem nasávaného vzduchu (litry)	Délka odběru (minuty)	F (faktor pro výpočet)
Prostory se zvýšeným požadavkem na čistotu	466; 533 ; 599	7; 8 ; 9	2,1; 1,9 ; 1,7
Prostory s běžnými nároky na kvalitu čistoty prostředí	266; 333 ; 400	4; 5 ; 6	3,8; 3,0 ; 2,5
Prostory s předpokládaným znečištěním ovzduší bioaerosolem	67; 133 ; 200	1; 2 ; 3	15,0; 7,5 ; 5,0

spodní mez detekce: 2 KTJ . m⁻³

horní mez detekce: 6000 KTJ . m⁻³

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

Dodatek C - 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 plísní v souvislosti s aktivitou těchto lidí a to zejména v případech:

- aktivní lidské činnosti související se zvýšenou prašností,
- sledujících změny koncentrací bakterií v ovzduší v souvislosti s určitou činností,
- kdy nelze přítomnost lidí z uvedeného prostředí vyloučit.

Odkaz na základní literární údaje:

ČSN ISO 4833 Všeobecné pokyny pro stanovení celkového počtu mikroorganismů - Technika počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C

ČSN ISO 7954 Všeobecné pokyny pro stanovení celkového počtu plísni a kvasinek - Technika počítání kolonií vykultivovaných při 25 °C

ČSN EN 13098 Ovězení na pracovišti - Směrnice pro měření vzdušných mikroorganismů a endotoxinů

EUR 14988 (Report No. 12: Biological Particles in Indoor Environments, Commission of the European Communities, Report No. 12, Luxembourg, 1994)

ISO/CD 14698-1 a 2: Cleanrooms and associated controlled environments. 1996

Mikrobiologicko-hygienické vyšetřovací metody vnitřního prostředí. Acta hygienica, epidemiologica et microbiologica. Příloha č. 5/1999

Návrh vyhlášky Ministerstva zdravotnictví, kterou se stanoví hygienické limity chemických, fyzikálních a biologických ukazatelů pro vnitřní prostředí pobytových místností některých staveb

www: <http://www.mzcr.cz>

Směrnice rady 89/106/EHS pro stavební výrobky. Základní požadavek č. 3: Ochrana zdraví a životního prostředí. Úřední věstník ES č. 94/C 62