

Příloha 9

Podklady pro vypracování certifikované metodiky (BIO)

Průzkum a prevence prostředí

Předmluva

Tento dokument vznikl za podpory programu NAKI DF11 P01OVV017 Tradiční lidový oděv na Moravě, identifikace, analýza, konzervace a trvale udržitelný stav sbírkového materiálu z let 1850 – 1950.

Informace pro uživatele

Tento návrh byl vytvořen pro potřeby sledování mikrobiálního znečištění v prostředí, ve kterém jsou umístěny předměty kulturního dědictví. Jeho cílem je vytvořit nástroj pro měření mikrobiální kontaminace jak v prostředí předmětů, tak na exponátech samotných. Využívání popsaných postupů umožní sledovat a snižovat znečištění s cílem ochránit jak exponáty, tak zdraví pracovníků.

Dokument je zaměřen na veškeré prostředí, ve kterém se pohybuje sbírkový textil.

Související normy a technické specifikace

ČSN ISO 4833 Mikrobiologie. Všeobecné pokyny pro stanovení celkového počtu mikroorganismů

ČSN ISO 7954 Mikrobiologie. Všeobecné pokyny pro stanovení celkového počtu plísní a kvasinek

Související právní předpisy

Vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 6/2003 Sb., kterou se stanoví hygienické limity chemických, fyzikálních a biologických ukazatelů pro vnitřní prostředí pobytových místností některých staveb

Návrh vypracovali:

Zpracovatel: Textilní zkušební ústav, s.p., Brno, IČO: 00013251, Centrum technické normalizace, Mgr. Markéta Hrubanová, Mgr. Hana Polášková, Ing. Petr Nasadil

1 Předmět

Tento dokument vzniká především pro účely kontroly mikrobiálního znečištění prostředí z pohledu **textilních exponátů**.

Mikrobiální kontaminace prostředí, ve kterém dochází k manipulaci s exponáty, resp. vzájemná kontaminace exponátů samotných, zvyšuje riziko jejich nenávratného poškození. Exponáty jsou obvykle z přírodních materiálů, které v nevhodných podmínkách mohou být napadány bakteriemi a plísněmi. Důležitá je bezprašnost a optimální vlhkost, neboť je známo, že mikroorganismy jsou nejčastěji prostředím přenášeny na prachových částicích. Z tohoto důvodu je potřeba udržovat veškeré prostředí, kterým se pohybuje textil, v čistotě a preventivně kontrolovat jeho čistotu odběrem kontrolních vzorků.

Konečným výstupem tohoto podkladu bude certifikovaná metodika a zkušební postupy, které mají být použity při stanovování mikrobiální kontaminace v prostředí předmětů a při ověřování kontaminace předmětů samotných.

2 Termíny a definice

2.1 CFU, KTJ

Colony forming units, kolonie tvořící jednotky

3 Podstata kontrol

Kontrolní činnost by se měla zaměřit na celý koloběh exponátu, tzn. zohlednit prostory, kde dochází k:

- příjmu exponátů (izolační místnost)
- zpracování exponátu (pracoviště kurátora, dokumentace, konzervace, zobrazování – záznam)
- badatelna
- uložení exponátu (depozitář)
- prezentace (vystavení, demonstrace předmětů)
- další práce s exponátem (přenášení, transport)

Součástí kontrol jsou otisky z prostor/povrchů na kterých jsou exponáty uloženy, dále stěry z pomůcek, z materiálů samotných předmětů a také stanovování vzdušné kontaminace aeroskopem na všech místech, ve kterých se exponáty vyskytují. Tento systém umožní sledovat jak vzdušnou kontaminaci, tak přítomnost např. mikroskopických hub v materiálech exponátů samotných. Na základě výsledků je pak možné přijmout potřebná opatření.

Odběr vzorků by měli provádět pracovníci, kteří byli pro tuto činnost vyškoleni. Z praktického hlediska je vhodné, aby odběry provedl pracovník obeznámený se zásadami práce se sterilními odběrovými médii (agarové plotny, živná půda) a se zásadami nakládání se vzorky z hlediska jejich možné kontaminace.

Vyhodnocení vzorků smí s ohledem na možnost kultivace patogenních mikroorganismů provádět pouze mikrobiologická laboratoř, splňující požadavky aktuální legislativy, platné pro tuto oblast činnosti.

4 Metodika odběru vzorků

Je důležité, aby odebrané vzorky byly reprezentativní a odrážely tak skutečné mikrobiologické poměry v místě odběru. Pro lepší představu o tom, jak jsou exponáty okolním prostředím ovlivňovány, je vhodné vytipovat více menších oblastí a zde pak provést odběry, vždy v jednom místě (pokud je to možné). Postup zahrnuje:

- a) stanovení mikrobiální kontaminace exponátu (stěr)
- b) mikrobiologické otisky z povrchů, které přicházejí do kontaktu s exponáty
- c) mikrobiologickou kontrolu prostředí, ve kterých se exponáty zdržují po delší dobu (depozitáře, výstavní sítě, skanzeny atp.)
- d) mikrobiologickou kontrolu vzdušné kontaminace

Prakticky je tedy vhodné provádět odběry v místě, které reprezentuje určitou oblast nebo prostředí. Rozhodnutí, kde a jak odebrat vzorky, by mělo zohlednit vždy konkrétní podmínky konkrétního prostředí. Doporučuje se provést kontrolu v dále popsaných oblastech.

4.1 Základní typy prostředí

4.1.1 Pracovny mimo konzervátorská pracoviště

Doporučuje se provést odběr vzorku z ovzduší uprostřed místnosti a otisky z pracovních ploch, které přicházejí do styku s exponátem.

4.1.2 Konzervátorské pracoviště suché a mokré

Provede se odběr vzorku z ovzduší uprostřed místnosti, a pokud je instalována vzduchotechnika tak i přímo v místě výduchu (ověření čistoty vzduchu vpouštěného do prostoru pracovny).

Je vhodné provést otisky z ploch, na kterých se exponáty odkládají nebo kde dochází k jejich zpracování. Pokud jsou zde některé exponáty delší dobu (alespoň 2 týdny a více) pak je vhodné provést stěr i z těchto exponátů.

4.1.3 Depozitář, dočasné příruční uložení, obaly

Provede se odběr vzorku z ovzduší uprostřed místnosti, a pokud je instalována vzduchotechnika tak i přímo v místě výduchu (ověření čistoty vzduchu vpouštěného do prostoru depozitáře)

Provede se otisk z vnitřního prostoru nábytku – ze stěny a současně stěr z náhodně vybraného exponátu uvnitř nábytku. Otisk by měl zohlednit vnitřní prostor, ne aktuální znečištění, tj. neprovádí se otisky „z podlahy“, která může být zaprášená.

U ochranných obalů předmětu se snímá otisk z vnější i vnitřní strany jeho povrchu. Z předmětu, zde umístěného, se pak provede ještě stěr.

4.1.4. Manipulační, transportní prostor

Tyto prostory se vždy udržují v čistotě a desinfikované.

4.1.5. Prezentační prostor

Doporučuje se provést odběr vzorku z ovzduší uprostřed místnosti a otisky z ploch, které přicházejí do styku s exponátem. Pokud je instalována vzduchotechnika pak je vhodné provést odběr vzorku z ovzduší přímo v místě výduchu (ověření čistoty vzduchu vpouštěného do prostoru).

4.2 Technika odběru vzorků

4.2.1 Otisk

Odběr vzorků otiskem je prováděn na laboratorně vyrobené plotny podle čl. A. 2, nebo na plotny komerčně dodávané. Sterilní plotna se otevře a pevně přitiskne na zkoušený povrch na dobu přibližně 3 sekundy. Poté se ihned zavře a uloží k další analýze.

4.2.2 Stěr

Sterilní stěrový tampón se namočí do sterilní tekuté půdy ve zkumavce a za stálého otáčení se jím stírá plocha předmětu na sebe kolmými tahy. Stěr je prováděn z plochy 10x10 cm nebo z celého menšího předmětu. Poté se tampon zalomí tak, aby jeho stírací část spadla do tekuté půdy ve zkumavce, zkumavka se ihned zavře a uloží k další analýze.

4.2.3 Odběr vzduchu

Do zařízení sloužícímu k odběru vzduchu se upevní Petriho miska s agarem. Zařízení se nastaví na průtok vzduchu 100 l za minutu po dobu 5 minut. Celkový odebraný objem vzduchu je tedy 500 litrů. Po ukončení odběru se miska vyjme, ihned se uzavře a uloží k další analýze. Vrchní víko přístroje se před každým odběrem vždy vydesinfikuje.

4.3 Uložení vzorků po odběru

Otiskové plotny a zkumavky s tekutou půdou se musejí uchovávat v chladu při teplotě 4 °C. K tomuto účelu je vhodné využít přenosné chladičí zařízení (např. autolednička). Vzorky je nutné nejpozději 6 h po odběru dopravit do mikrobiologické laboratoře k dalšímu zpracování a vyhodnocení výsledků. Během jejich přepravy nesmí dojít k jakémukoliv poškození vzorku, které by mohlo vést ke zkreslení výsledků.

5 Příprava a vyhodnocení vzorků

Vyhodnocení vzorků provede mikrobiologická laboratoř s odpovídajícím vybavením potřebným ke kultivaci mikroorganismů a k jejich následné identifikaci.

5.1 Otisky

Plotny se v laboratoři umístí dnem vzhůru do termostatu nastaveného na 37 °C na dobu 48 hodin. Po 48 hodinách jsou zachycená agens dále určována například za použití biochemických konfirmačních testů.

5.2 Stěry

Zkumavky se stěry se umístí do termostatu nastaveného na 37 °C na dobu 24 hodin. Po 24 hodinách následuje kultivace zachycených agens na speciálních půdách a druhová diagnostika.

5.3 Odběr vzduchu

Plotny se v laboratoři umístí dnem vzhůru do termostatu nastaveného na 37 °C na dobu 48 hodin. Po 48 hodinách jsou zachycená agens dále určována například za použití biochemických konfirmačních testů.

6 Výpočet a vyjádření výsledků

6.1 Otisky

Vyhodnocení se provádí bakteriologickými postupy umožňujícími stanovit počet CFU na ploše 10 cm². Vyhodnotí se množství a patogenita zjištěných mikroorganismů a jejich možný vliv na exponáty a zdraví pracovníků.

6.2 Stěry

Výsledné nálezy nejsou kvantifikovány, ale označeny pouze rodovým, případně druhovým názvem. Vyhodnotí se množství a patogenita zjištěných mikroorganismů a jejich možný vliv na exponáty a zdraví pracovníků.

6.3 Odběr vzduchu

Zjištěné hodnoty jsou přepočteny na CFU/m³ vzduchu. Za vyhovující se považují vzorky s počtem menším než 500 CFU/m³.

7 Protokol o zkoušce

Protokol o zkoušce musí specifikovat:

- odkaz na tuto metodiku
- všechny informace potřebné k identifikaci místa odběru (evidenční údaje o místě prováděné zkoušky: instituce - adresa, podlaží, místnost, nábytek, obal, předmět, záznam konkrétního místa odběru. Je-li zkouška prováděna na předmětu mimo jeho původní lokaci, doplňují se ještě jeho majetkoprávní údaje.)
- použitou metodiku vzorkování
- použité inkubační teploty
- všechny podrobnosti o pracovním postupu, které zde nejsou specifikovány, které jsou považovány za volitelné a dále všechny události, které mohly mít vliv na výsledky zkoušení
- datum zkoušky (datum ukončení zkoušky)
- jméno a podpis osoby odpovědné za provedení zkoušky.

Příloha A (normativní)

A. 1 Zkušební zařízení

Obvyklé vybavení mikrobiologické laboratoře a dále následující.

Přístroj ke sterilizaci horkým vzduchem (sušárna) **nebo parou** (autokláv).

Inkubátory s teplotou udržovanou v rozmezí 22 °C až 37 °C.

Vodní lázeň nebo podobné zařízení schopné udržovat teplotu mezi 44 °C a 47 °C.

Nádoby, zkumavky, baňky či lahve, vhodné pro sterilizaci a uchování kultivačních pūd a odběr vzorků.

Petriho misky, skleněné nebo plastové o průměru 65 mm a 90 mm.

Mikrobiologické kličky (o průměru asi 3 mm), **očkovací jehly** platino-iridiové nebo nikl-chromové a **skleněné tyčinky**, nebo ekvivalentní sterilní kličky či očkovací jehly na jednorázové použití.

Pipety, kalibrované nedělené pipety, mechanické pipety s fixním či variabilním objemem; špičky pro pipety

pH metr

Jednorázové sterilní stěrové tampóny

Zařízení pro odběr vzduchu schopné aktivně odebírat okolní vzduch při průtoku vzduchu 100 l za minutu po dobu 5 minut.

A. 2 Kultivační pūd a reagensie

A. 2.1 Krevní Agar

A. 2.1.1 Složení

Pepton	15,0 g
Extrakt z jater	2,5 g
Kvasničný extrakt	5,0 g
Chlorid sodný	5,0 g
Agar	13,0 g
Voda	1000 ml

A. 2.1.2 Příprava

Složky, nebo kompletní sušená pūda se rozpustí ve vodě, je-li třeba zahříváním. Kultivační pūda se sterilizuje v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

A. 2.1.3 Příprava agarových ploten

Kultivační půda rozehřátá a ochlazená na $(45 \pm 2) ^\circ\text{C}$. K základu se přidá 5 – 7 % defibrinované ovčí krve, agar se promíchá a bezprostředně se rozlévá do sterilních Petriho misek a nechá se ztuhnout.

A. 2.2 Tryptonová voda

A. 2.2.1 Složení

K 10 g komerčně dodávaného sušeného média tryptonového preparátu (např. AES Laboratoire) se přidá 1000 ml destilované vody.

A. 2.2.2 Příprava

Kompletní sušená půda se rozpustí ve vodě za varu.

Tryptonovou vodou se naplní zkumavky, které se pak sterilizují v autoklávu při $121 ^\circ\text{C}$ po dobu 15 minut.

A. 2.3 Mc Conkey agar

A. 2.3.1 Složení

Pepton	20,0 g
Laktóza	10,0 g
Žlučové soli	1,5 g
Chlorid sodný	5,0 g
Neutrální červen	0,03 g
Krystalová violet'	0,001 g
Agar	13,50 g
Voda	1000 ml

A. 2.3.2 Příprava

Složky, nebo kompletní sušená půda, se rozpustí ve vodě, je-li třeba při zahřívání.

Pokud je potřeba, upraví se pH tak, aby po uvaření jeho hodnota činila $7,1 \pm 0,2$ při $25 ^\circ\text{C}$.

Kultivační půda se sterilizuje v autoklávu při $121 ^\circ\text{C}$ po dobu 15 minut.

A. 2.3.3 Příprava agarových ploten

Kultivační půda rozehřátá a ochlazená na $(45 \pm 2) ^\circ\text{C}$ se rozlévá do sterilních Petriho misek a nechá se ztuhnout.

A. 2.4 Sabouradův agar

A. 2.4.1 Složení

Enzymaticky natrávený kasein	5,0 g
Enzymaticky natrávené živočišné tkáň	5,0 g
Glukóza	40,0 g
Agar	15,0 g
Voda	1000 ml

A. 2.4.2 Příprava

Složky, nebo kompletní sušená půda se rozpustí ve vodě, je-li třeba zahříváním.

Pokud je potřeba, upraví se pH tak, aby po uvaření jeho hodnota činila $5,6 \pm 0,2$ při 25 °C.

Kultivační půda se sterilizuje v autoklávu při 121°C po dobu 15 minut.

A. 2.4.3 Příprava agarových ploten

Kultivační půda rozehřátá a ochlazená na (45 ± 2) °C se rozlévá do sterilních Petriho misek a nechá se ztuhnout.

A. 2.5 PCA agar

A. 2.5.1 Složení

Pepton	5,0 g
Extrakt z jater	2,5 g
Glukóza	1,0 g
Agar	15,0 g
Voda	1000 ml

A. 2.5.2 Příprava

Složky, nebo kompletní sušená půda se rozpustí ve vodě, je-li třeba zahříváním.

Pokud je potřeba, upraví se pH tak, aby po uvaření jeho hodnota činila $7,0 \pm 0,2$ při 25 °C.

Kultivační půda se sterilizuje v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

4.5.3 Příprava agarových ploten

Kultivační půda rozehřátá a ochlazená na (45 ± 2) °C se rozlévá do sterilních Petriho misek a nechá se ztuhnout.

Příloha B (informativní)

Příklady uvádění výsledků v protokolu o zkoušce

Výsledky - otisky a stěry:

Označení vzorku	Místo odběru	Způsob odběru	Mikrobiologický nález – CFU/10cm ²
XXX	xxxx	S	negativní
XXX	xxxx	O	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 2 CFU
XXX	xxxx	S	<i>Bacillus sp.</i>
XXX	xxxx	O	negativní
XXX	xxxx	O	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 2 CFU
XXX	xxxx	O	<i>Bacillus sp.</i>
XXX	xxxx	O	negativní
XXX	xxxx	O	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 2 CFU
XXX	xxxx	O	<i>Bacillus sp.</i>
XXX	xxxx	O	negativní
XXX	xxxx	S	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 2 CFU
XXX	xxxx	O	<i>Bacillus sp.</i>

S (stěr); O (otisk)

negativní: bakterie neprokázány použitou metodikou

Výsledky - měření vzdušné kontaminace:

Označení vzorku	Místo odběru	Průtok (l)	Typ půdy	Mikrobiologický nález	Počet CFU	CFU/m ³
XXX	místnost xxx	XXX	XXX	<i>Bacillus sp.</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>	2 6	16