

**Marta Anna HAJDUGA**, Studenckie Koło Naukowe sekcja in vitro przy Katedrze i Zakładzie Fizjologii w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny, Katowice

**Sylwia WĘGRZYNKIEWICZ**, Zakład Inżynierii Materiałowej, Akademia Techniczno-Humanistyczna, Bielsko-Biała

**Dariusz SOŁEK**, Wydział Powłok Ochronnych, FAMED S.A, Żywiec

**Dariusz JĘDRZEJCZYK**, Zakład Inżynierii Materiałowej, Akademia Techniczno-Humanistyczna, Bielsko-Biała

**Maciej HAJDUGA**, Zakład Inżynierii Materiałowej, Akademia Techniczno-Humanistyczna, Bielsko-Biała

## **BAKTERIE JAKO JEDNO Z ZAGROŻEŃ AMBULANSÓW SANITARNYCH**

**Streszczenie:** Ambulans medyczny może stanowić źródło zakażenia groźnymi szczepami bakterii. Celem badań był dobór materiałów i powłok antykorozyjnych najbardziej odpowiednich dla zachowania aseptyczności wnętrza karetki pogotowia. Po pierwsze zidentyfikowano szczepy bakterii z wnętrza ambulansu oraz pojazdu sanitarnego typu melex. W drugim etapie posiano i inkubowano wybrane szczepy bakterii na wytypowanym materiale. Badania potwierdziły, że wyizolowane bakterie mogą stanowić zagrożenie dla pacjentów, a stopień ich adhezji zależy od rodzaju powierzchni.

**Słowa kluczowe:** bakterie, adhezja, ambulans, melex, powłoki lakiernicze, tworzywo sztuczne

### **1. WSTĘP**

Nie wszystkie jednostki pogotowia ratunkowego posiadają wysoki standard dezynfekcji wnętrza. Mobilny charakter pracy ambulansu, jak również stosowanie silnych środków dezynfekcyjnych oraz trudnodostępne do dezynfekcji miejsca sprzyjają zjawisku korozji i adhezji drobnoustrojów na powierzchniach abiotycznych [1,3,5]. Wnętrze ambulansu może stanowić źródło zakażenia pacjenta. Dlatego niezwykle istotne jest wdrożenie wszystkich procedur ułatwiających utrzymanie właściwej czystości. Bazując na wynikach badań [5, 7-9] autorzy zdecydowali się rozszerzyć ich spektrum i skoncentrować się na badaniu adhezji bakterii na powierzchniach stanowiących poszycie pojazdów sanitarnych.

### **2. CEL I ZAKRES BADAŃ**

Obiektem zainteresowania badawczego jest zabudowa wnętrza ambulansu: poszycie wewnętrzne ścian wykonane z blachy aluminiowej (A1 i PA11) oraz z tworzywa sztucznego (trzy aplikacje). Powierzchnia aluminium pokryta została powłoką lakierniczą standardową i antybakteryjną. Celem badań jest dobór materiałów i powłok antykorozyjnych najbardziej odpowiednich dla zachowania aseptyczności wnętrza karetki pogotowia typu HONKER

(rys. 1) użytkowanej w warunkach specjalnych (Azerbejdżan). Prace badawcze były prowadzone dwuetapowo. W pierwszym etapie identyfikowano szczepy bakterii obecne na poszyciu ambulansu sanitarnego i melexu. Drugi etap obejmował posiew i inkubację wybranych gatunków bakterii na przygotowanych do tego celu próbkach.



Rys.1. Ambulans sanitarny: a-wygląd zewnętrzny Honkera, b-zabudowa wnętrza, c-zabudowa wnętrza

### 3. METODYKA BADAŃ

#### 3.1. Przygotowanie materiału do badań




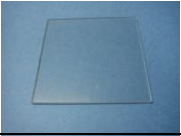

Materiał badawczy zebrano z wnętrza pojazdów sanitarnych: ambulansu i melexu (rys. 2) będących w codziennej eksploatacji. Wymazy pobrano za pomocą wymazówek transportowych typu Amies z żelem agarowym po uprzednim zwilżeniu wacika solą fizjologiczną.



Rys.2. Od lewej: Karetka pogotowia z zewnątrz i wnętrze oraz pojazd sanitarny typu melex

W drugim etapie przystąpiono do oceny adhezji wybranych patogenów na materiale badawczym. W tym celu z blachy aluminiowej i tworzywa sztucznego wycięto próbki o wymiarach 100 x 100mm. W zależności od rodzaju materiału bazowego podzielono je na dwie grupy (tab. 1). Dalej, na powierzchni wszystkich próbek dokonano w kilku losowo wybranych obszarach pomiaru chropowatości i topografii powierzchni w 3D. Badania przeprowadzono na profilometrze Perthometer Concept (MAHR). Chropowatości powierzchni oceniono na podstawie wielkości parametru Ra - średnia arytmetyczna rzędnych profilu.

Tabela 1. Podział materiału do badań adhezyjnych

Grupa	Nr próbki	Wygląd próbki	Rodzaj podłoża
<b>A</b>	<b>1</b>		Powłoka lakiernicza antybakteryjna RAL 9003, połysk 60%
	<b>2</b>		Powłoka lakiernicza standardowa RAL 9002, połysk 90%
<b>B</b>	<b>1</b>		Płyta z tworzywa- gładka
	<b>2</b>		Płyta z tworzywa- plexi- szkło organiczne
	<b>3</b>		Płyta z tworzywa- karbowana

### 3.2. Metodyka badań identyfikacji bakterii

Wymazówki z pobranym materiałem badawczym zostały umieszczone w bulionie odżywczym w celu namnożenia bakterii (37°C, 24h). Po okresie inkubacji, materiał z wymazówek został posiany (posiewem marmurkowym) na podłoża typu: agar krwawy, podłoża wybiórczo-różnicujące: McConkey, Chapman, podłoże Sabouraud, podłoże wybiórcze Decoccosel. Po 48h hodowli, posiewem redukcyjnym izolowano czyste kolonie bakteryjne z wyżej wymienionych podłoży hodowlanych. Następnie przeprowadzono identyfikację mikroorganizmów z użyciem testów biochemicznych (API) za pomocą aparatu VITEK 2 Compact<sup>®</sup> firmy (bioMerieux). Dodatkowo w zależności od wyizolowanego szczepu bakterii określano mechanizm oporności na antybiotyki stosowane w terapii (MRSE, MRSCN, MBL, HLAR). MRSE – oporność na metycylinę szczepu *Staphylococcus epidermidis*, MRSCN- metycylino oporność szczepów gronkowców koagulazo ujemnych. MBL – szczepy pałeczek niefermentujących węglowodany odporne na karbapenemy, β-laktamy, linkozamidy. HLAR- szczepy *Enterococcus spp*, odporne na wysokie stężenia antybiotyków aminoglikozydowych. Diagnostykę bakteriologiczną przeprowadziła Pracownia Bakteriologii Szpitala Nr 1 im. Profesora S. Szyszko w Zabrze.

### 3.3. Metodyka badań adhezyjnych na próbkach modelowych

Po wyizolowaniu i zidentyfikowaniu szczepów bakterii występujących na poszyciu pojazdów sanitarnych do dalszych badań wybrano: *Pseudomonas aeruginosa* oraz *Enterococcus faecalis*. Wykonano test adhezji (przylegania) bakterii na przygotowanych próbkach. Badanie polegało na inkubacji wybranych gatunków bakterii (gęstość 0.05 -7 McF) w 3 ml roztworu soli fizjologicznej (0,9% NaCl) na płytkach metalowych i plastikowych. Przed posiewem bakterii próbki zostały poddane procedurze sterylizacji powierzchniowej

poprzez naświetlanie światłem ultrafioletowym (UV) przez okres 24h. Dalej, dokonano kontroli jałowości płytek. Następnie, posiano wybrane gatunki bakterii na określone powierzchnie i inkubowano je 24h w temperaturze pokojowej 25°C. Po okresie inkubacji płytki trzy krotnie przemyto roztworem soli fizjologicznej (0,9% NaCl) i pozostawiono do wysuszenia. Do suchych powierzchni płytek przykładano podłoża odciskowe typu Contact<sup>®</sup> media (bioMerieux, Fr) celem badania jałowości powierzchni testowanych płytek. Po okresie 24h, zliczano ilość kolonii bakteryjnych na płytkach kontaktowych, wyniki przedstawiono w liczbie kolonii bakteryjnych na centymetr kwadratowy powierzchni (CFU/cm<sup>2</sup>).

#### 4. WYNIKI BADAŃ

Wewnątrz ambulansu medycznego zidentyfikowano następujące patogeny: *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus spp*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Pantoea agglomerans*. W pojeździe typu melex wyizolowano: *Pseudomonas fluorescens* i *Pseudomonas oryzihabitans*.

Wyniki badań adhezji *Pseudomonas aeruginosa* i *Enterococcus faecalis* na badanych próbkach aluminiowych i plastikowych przedstawiono w tabelach 2 i 3.

Tabela 2. Liczba kolonii bakterii na badanych powierzchniach: A1 - Lakier antybakteryjny (RAL 9003), A2 - Lakier standardowy (RAL 9002)

Liczba próbek	Gatunek bakterii	Gęstość komórek bakteryjnych w zawiesinie [McF]	A1	A2
			Liczba kolonii bakterii [CFU/cm <sup>2</sup> ]	
n=6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.5	-	0
		1	0	0
		3	0	-
		5	0	> 150
		7	1	-
n= 6	<i>Enterococcus faecalis</i>	0.5	-	0
		1	0	0
		3	0	-
		5	1	> 180
		7	1	-

Tabela 3. Liczba kolonii bakterii na badanych powierzchniach: B1 – Płyta z tworzywa, gładka, B2 - Płyta z tworzywa, plexi, B3 - Płyta z tworzywa, karbowana

Liczba próbek	Gatunek bakterii	Gęstość komórek bakteryjnych w zawiesinie [McF]	B1	B2	B3
			Liczba kolonii bakterii [CFU / cm <sup>2</sup> ]		
n=6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.05	> 10	>10	-
		0.5	> 250	>100	0
		1	-	-	0
		5	> 300	>150	>500

<b>n= 6</b>	<i>Enterococcus faecalis</i>	0.05	>10	>10	-
		0.5	> 150	>100	0
		1	-	-	0
		5	>250	>150	>600

## 5. Dyskusja Wyników

Współczesne techniki sterylizacji i obowiązujące procedury dezynfekcji wnętrza nie są na tyle wystarczające, aby wyeliminować ryzyko wystąpienia zakażenia. Problem dotyczy zarówno środowiska szpitalnego oraz wnętrza pojazdów sanitarnych.

Stwierdzono, że wraz ze wzrostem chropowatości powierzchni zwiększa się poziom przyczepności, lecz rozwój na powierzchni jest niezależny od tego czynnika. Jest to szczególnie widoczne w przypadku adhezji wybranych szczepów bakterii na powierzchniach z tworzyw sztucznych.

*Staphylococcus epidermidis* (30,9%) i *Enterococcus faecalis* (20,5%), *Pseudomonas aeruginosa* (21%) to najbardziej rozpowszechnione patogeny izolowane z wnętrza ambulansu sanitarnego.

W pojeździe typu melex zidentyfikowano bakterie *Pseudomonas spp.* (50,7%) i *Enterococcus faecalis* (30,5%). Autorzy nie potrafili wskazać, czy testowane pojazdy wskazują na dopuszczalny poziom zanieczyszczenia bakteryjnego. Niewątpliwie jednak patogeny mogą stanowić zagrożenie dla pacjentów z obniżoną odpornością lub pacjentów leczonych preparatami immunosupresyjnymi.

W wyniku przeprowadzonych analiz adhezji wybranych szczepów bakterii (*Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*) stwierdzono, że próbki A1- z powłoką lakierniczą antybakteryjną (RAL 9003) skutecznie chronią przed przyleganiem testowanych patogenów. W testowanych gęstościach posiewu bakterii (1-5 McF) na płytkach A1 RAL 9003, nie stwierdziliśmy obecności bakterii po 24 godzinach inkubacji. Przyleganie i przeżywalność testowanych gatunków bakterii na płytkach standardowych A2 RAL 9002 jest znacznie większa w porównaniu do płytek A1 9003. Po 24 godzinach inkubacji bakterii posianych na płytce A2 9003 w gęstości 5 McF, zaobserwowano obecności ponad 150 kolonii bakteryjnych na cm<sup>2</sup> powierzchni co stanowi o bardzo wysokim poziomie skażenia powierzchni. Płytki standardowe były jednak jałowe po posiewie bakterii w niższych stężeniach (0.5-1 McF).

Stwierdzono, że do powierzchni z tworzywa sztucznego z bardzo dużą łatwością przylegają testowane bakterie. Po 24 godzinach inkubacji zależnie od gatunku testowanego mikroorganizmu i gęstości posiewu obserwowano skażenie testowanej powierzchni bakteriami >300 CFU/cm<sup>2</sup> (*Pseudomonas aeruginosa*), >250 CFU/cm<sup>2</sup> (*Enterococcus faecalis*) przy gęstości posiewu 5 McF. Analogiczna gęstość posiewu na płytkach karbowanych skutkowałą jeszcze większym odsetkiem przylegających kolonii bakteryjnych po 24 godzinach inkubacji >500 CFU/cm<sup>2</sup> (*Pseudomonas aeruginosa*), <600 CFU/cm<sup>2</sup> (*Enterococcus faecalis*).

## 6. Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań i dyskusji wyników można wnosić co następuje:

1. Bakterie wyizolowane z powierzchni poszycia wewnętrznego karetki mogą stanowić pewne zagrożenie dla pacjentów w stanach niedoboru odporności lub i w trakcie leczenia immunosupresyjnego, szczególnie *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*. Jednak

nie wyizolowano bakterii *Staphylococcus aureus* w tym MRSA odpowiedzialnego za groźne dla życia pacjentów zakażenia szpitalne.

2. Powierzchnia pokryta powłoką lakierniczą 9003 skutecznie chroni przed adhezją testowanych mikroorganizmów w szerokim zakresie gęstości posiewu w porównaniu do płytek standardowych 9002.

3. Stwierdzono, że wraz ze wzrostem chropowatości powierzchni zwiększa się poziom przyczepności, lecz rozwój na powierzchni jest niezależny od tego czynnika. Najłatwiej ulegają adhezji, bakterie posiane na tworzywach sztucznych szczególnie o powierzchni karbowanej w stosunku do powierzchni gładkiej.

## LITERATURA

- [1] Alves DW, Bissell RA. Bacterial pathogens in ambulances: results of unannounced sample collection. *Prehosp Emerg Care* 2008, April-June, 12(2), s. 218-24.
- [2] Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* 1999, 284, s. 1318–1322.
- [3] Hyun Noh, Sang Do Shin et al. Risk Stratification-based Surveillance of Bacterial Contamination in Metropolitan Ambulances. *Journal of Korean Medical Science* 2011, January, 26(1), s. 124–130.
- [4] Klevens RM et al. Estimating health care-associated infections and deaths in U.S. hospitals, 2002. *Public Health Rep* 2007, 122, s. 160–166.
- [5] Otto M. Staphylococcal biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008, 322, s. 207–228.
- [6] Rago JV, Buhs LK, Makarovaite V, Patel E, Pomeroy M, Yasmine C. Detection and analysis of *Staphylococcus aureus* isolates found in ambulances in the Chicago metropolitan area. *Am J Infect Control* 2012, April, 40(3), s. 201-5.
- [7] Sołek D., Węgrzynkiewicz S., Hajduga M., Jędrzejczyk D. Ocena powłok galwanicznych nanoszonych na sprzęt medyczny i rehabilitacyjny jako zabezpieczenie antykorozyjne i antybakteryjne. *Aktualne problemy Biomechaniki* 2011, 5, s. 143 – 148.
- [8] Szłapa I., Hajduga M., Jędrzejczyk D., Węgrzynkiewicz S., Sołek D. Aseptyczne środowisko wnętrza karet pogotowia: nowe rozwiązania w obszarze zabezpieczenia przed korozją części wyposażenia i zabudowy. *Na Ratunek* 2012, 4, s. 39-42.
- [9] Szłapa I., Hajduga M., Jędrzejczyk D., Węgrzynkiewicz S., Sołek D. Optymalne metody zabezpieczenia przed korozją wnętrza ambulansu sanitarnego. *Mechanika w Medycynie*, 11/12, s. 173 – 180.

## BACTERIAL PATHOGENS IN AMBULANCES AS A POSSIBLE DANGER

**Abstract:** Ambulance can be a source of infection dangerous strains of bacteria. The objective of our study was the choice of materials and anticorrosion coatings most appropriate for aseptic behaviour inside an ambulance. First stage consisted in bacteria strains identification found inside an ambulance and melex. In the second stage the selected bacterial strains were inoculated and incubated. Studies have confirmed that the bacteria isolated from the vehicle sanitary may be a risk to patients and the degree of their adhesion depends on the surface.