

INAKTIVÁCIA GENETICKY MODIFIKOVANÝCH MIKROORGANIZMOV

Inaktivácia je proces, ktorým sa upravujú vedľajšie produkty a nežiadúce látky vznikajúce pri práci v zariadení a neupotrebitelné zvyšky zo zariadení - GMMi v roztokoch, v tekutých a tuhých médiách... (ďalej len „odpad“), pred ich konečným zneškodnením. Týmto procesom sa upravujú aj predmety a materiály, ktoré v zariadení prichádzajú do kontaktu s GMMi.

Inaktivácia je definovaná ako „úplná alebo čiastočná deštrukcia GMMi“, ktorou sa zaistí, že kontakt GMMi s ľuďmi alebo životným prostredím bude obmedzený na úroveň, ktorá zodpovedá hodnoteniu environmentálneho rizika a ktorá zabezpečí primerane vysokú úroveň ochrany pre ľudí a životné prostredie.

Cieľom inaktivácie je teda zaistiť taký stupeň zneškodnenia mikroorganizmov, ktorý zodpovedá pravdepodobnosti výskytu nebezpečenstva pôsobiaceho škodu a stupňu vážnosti tejto škody, t. j. riziku (ďalej len „riziko“). Pre nebezpečnejšie GMMi sa vyžadujú také metódy inaktivácie, ktoré 100% zneškodnia všetky mikroorganizmy. Pre menej nebezpečné GMMi môžu byť prijateľné aj metódy, ktorých účinnosť zneškodnenia je nižšia ako 100% (napr. chemická inaktivácia zvyčajne poskytuje rádovo logaritmickejšiu redukciu životaschopnosti mikroorganizmov).

Pri postupoch, ktoré predstavujú zanedbateľné alebo malé riziko nemusí byť inaktivácia samostatným krokom, ale môže byť výsledkom iných krokov v postupe. Napr. úpravy, ktoré sú nevyhnutné pri extrahovaní produktu z GMMi, nevyhnutne zabíjajú aj GMMi. Vo všeobecnosti teda platí, že v každom konkrétnom prípade je potrebné zabezpečiť validovanú metódu inaktivácie GMMi.

Inaktivácia vo veľkoprodukčných prevádzkach obyčajne zahŕňa teplovzdušnú sterilizáciu kultúr.

V laboratóriách sa na inaktiváciu využívajú aj primerané postupy, ktorými sa rôznymi fyzikálnymi a chemickými metódami znižuje množstvo životaschopných mikroorganizmov.

Z hľadiska použitých prostriedkov rozlišujeme vo všeobecnosti inaktiváciu fyzikálnu a chemickú:

- Fyzikálna inaktivácia:
 - vlhkým teplom (fyzikálna parná sterilizácia)
 - suchým teplom (fyzikálna teplovzdušná sterilizácia)
 - radiačná (fyzikálna radiačná sterilizácia)
 - plazmová (fyzikálna plazmová sterilizácia)
- Chemická inaktivácia:
 - použitím vhodných dekontaminačných prostriedkov

Fyzikálna inaktivácia

Pri fyzikálnej inaktivácii sa využívajú rôzne prístroje, ktoré majú určené konkrétne prevádzkové parametre. Z viacerých dôvodov je však potrebné realizovať priebežný monitoring účinnosti inaktivácie. Vo všeobecnosti je napr. doba expozície závislá na objeme inaktivovaného roztoku. Tiež je dôležité zabezpečiť, aby bol sterilizačný čas počítaný až od doby, kedy prístroj dosiahol požadovanú teplotu sterilizácie, nie čas od zapnutia prístroja. Cieľom fyzikálnej inaktivácie je sterilizácia. Fyzikálna inaktivácia je teda proces, vedúci k dosiahnutiu sterilného stavu, t.j. stavu **bez** životaschopných mikroorganizmov.

Všeobecné parametre:

Fyzikálna parná sterilizácia

Pre všetky typy parných prístrojov platia parametre:

Teplota [°C]	Tlak [kPa]	Pretlak [kPa]	Expozícia [min]*
121	200	100	20
134	300	200	10

*napr. primerane plná 5 litrová Erlenmayerová banka vyžaduje sterilizáciu 1 hodinu pri 121 °C.

Fyzikálna teplovzdušná sterilizácia

Pre prístroje s nútenou cirkuláciou platia parametre:

Teplota [°C]	Expozícia [min]
160	60
170	30
180	20

Fyzikálna radiačná sterilizácia

- rádioaktívnym kobaltom 60
- sterilizačná dávka žiarenia je 25 kGy

Fyzikálna plazmová sterilizácia

- štvrté skupenstvo hmoty
- chemickým prekursorom aktívnych častíc je 58% H₂O₂

Chemická inaktivácia

Legislatíva vyžaduje, aby sa mikrobiologické kultúry inaktivovali validovanými metódami. Ak sa použije metóda chemickej inaktivácie, musí byť táto metóda overená v pracovných podmienkach.

Validácia je dôležitá, pretože účinok konkrétnych dekontaminačných prostriedkov môže byť významne ovplyvnený napr. prítomnosťou organických látok. Ak sa bunkové kultúry používajú v podmienkach tlmivého roztoku, v prítomnosti bielkovín..., je potrebné tomu prispôsobiť spôsob inaktivácie.

Z dostupných metód chemickej inaktivácie sa v laboratórnych podmienkach využíva hlavne dezinfekcia.

Definície

Dezinfekcia je postup, ktorým sa rôznymi fyzikálnymi a chemickými metódami zníži množstvo životaschopných mikroorganizmov. Dezinfekcia sa väčšinou vzťahuje na použitie chemických prostriedkov s cieľom zničiť možnú infekčnosť materiálu, ale nezahŕňa úplnú elimináciu živých mikroorganizmov. Účinnosť dezinfekcie závisí od:

- **účinku pôsobenia:** účinnosť určitého dezinfekčného prostriedku sa mení v závislosti od cieľového mikroorganizmu,
- **koncentrácie:** použitý roztok má vhodnú koncentráciu vzhľadom na konkrétne okolnosti, napr. pri rozliatí roztokov, pri poškodenom, neupotrebitel'nom laboratórnom skle.... Účinná koncentrácia môže závisieť od veku roztoku, riedený dezinfekčný prostriedok zvyčajne stráca časom účinnosť,
- **kontaktu:** po dostatočnú dobu musí byť zabezpečený vhodný kontakt medzi dezinfekčným prostriedkom a dezinfikovaným predmetom (napr. z predmetov ponorených v dezinfekčnom prostriedku je potrebné odstrániť vzduchové bubliny).

Dezinfekčné prostriedky

Najbežnejšie používané dezinfekčné prostriedky sú chlórany, zlučeniny uvoľňujúce chlór, fenoly, alkoholy, aldehydy, povrchovo aktívne zlúčeniny, zlúčeniny kvartérneho amoniaku, peroxidy.

- **Chlórany, napr. Chlorox, Domestos:**
Chlórany majú široké spektrum antimikrobiologickej aktivity, rýchlo účinkujú, ale sú leptavé, ich účinok sa stráca v prítomnosti organických látok.
- **Zlúčeniny uvoľňujúce chlór (napr. NaDCC)**
Zlúčeniny uvoľňujúce chlór majú široké využitie a rýchly biocídny účinok, ale sú leptavé a ľahko inaktivovateľné prímiesou organických látok. Tablety alebo granule NaDCC sú stabilné, ak sa uskladňujú v suchu. Sú rozpustné vo vode, pričom uvoľňujú chlór. Zlúčeniny uvoľňujúce chlór sa odporúčajú v takých podmienkach, kde nie sú problémom ich leptavé alebo bieliace účinky. Stupeň uvoľňovania chlóru je urýchlený v kyslom prostredí.

- **Fenoly, napr. Hycolin, Stericol, Clearsol**
 Fenoly sú neleptavé a majú široké možnosti využitia. Sú neúčinné proti nebielkovinovým vírusom. Prítomnosť organických látok na účinok fenolov nemá vplyv. Antimikrobiologická aktivita fenolov môže byť ovplyvnená tvrdosťou vody. Fenoly by sa nemali skladovať zriedené.
- **Alkoholy, napr. 70% etanol, 60% izopropanol**
 Alkoholy rýchlo a účinne ničia baktérie a niektoré vírusy, ale kvôli relatívnej prchavosti nedokážu zabezpečiť trvalý antimikrobiologický účinok. Alkoholy sú horľavé a pri skladovaní a použití vyžadujú zabezpečenie vhodných preventívnych opatrení. Nemali by sa používať v mikrobiologických bezpečnostných boxoch alebo na veľkých plochách.
- **Aldehydy**
 Formaldehyd** ako plyn alebo kvapalina (formalín) je toxický a nie je vhodný na všeobecné používanie.
 Zvykne sa využívať na dezinfekciu mikrobiologických bezpečnostných boxov a ďalších miestností (napr. zariadení zatriedených do vyšších rizikových tried).
 Ostatné nádoby s dezinfekčnými prostriedkami by mali byť počas dezinfekcie bezpečne utesnené, najmä ak sú nekompatibilné s konkrétnym aldehydom.
 Glutaraldehyd je tiež toxický, ale má relatívne nízky tlak pár a obyčajne sa používa vo forme roztoku. Ma široké možnosti využitia, vrátane ničenia bakteriálnych spór. Je neleptavý, ale ťažšie preniká organickými látkami a pripravený na použitie nie je dostatočne stabilný.
- **Povrchovo aktívne zlúčeniny (Quaternary ammonium compounds, QAC)**
 QAC sú fungicídne a bakteriocídne (menej proti gram-negatívnym baktériam), ale nie sú sporicídne alebo tuberkulocídne a voči vírusom preukazujú premenlivú účinnosť. Dajú sa inaktivovať mydlom, anionovými detergentami a organickými látkami. Často sa predávajú v kombinácii s ďalšími skupinami dezinfekčných prostriedkov.
 Istú antimikrobiologickú aktivitu majú iba katiónové a amfotérne detergenty a tie sú viac bakteriostatické ako bakteriocídne. Sú relatívne netoxické a ne podráždivé.
 QAC tvoria základ väčšiny katiónových detergentov. Avšak, iba obmedzené množstvo amfotérnych detergentov bolo určených pre použitie ako antimikrobiologické prostriedky.
- **Jodofor**
 Jodofor je kombináciou jódu a rozpustného činidla alebo nosiča, ktorý zabezpečí trvalé uvoľňovanie jódu. Je bakteriocídny, fungicídny a virocídny, ale voči spóram preukazuje obmedzenú účinnosť. Jodofor je inaktivovaný prítomnosťou organických látok (závisí to od spôsobu prípravy a koncentrácie) a môže rozrušovať kovy.
- **Peroxidy**
 Peroxidy majú široký rozsah mikrobiologickej aktivity, hoci ich účinnosť je redukovaná prítomnosťou organických látok. V zariadeniach sa používajú na bežnú dezinfekciu. Pred ich použitím je vhodné informovať sa u výrobcu, či tento druh dezinfekcie nemôže poškodiť laboratórne vybavenie.

- **Roztoky hydroxidu sodného**

Za istých okolností môžu byť používané ako laboratórne dezinfekčné prostriedky aj roztoky hydroxidu sodného (1%). Pri ich používaní sa však musí brať ohľad na ich povahu žieraviny. Roztoky hydroxidu sodného sa často používajú na inaktiváciu priónov, pretože sú menej leptavé ako koncentrované roztoky chlórnanu. Vhodné sú najmä na dezinfekciu oceľových povrchov.

**

1 Formaldehyd má maximálny expozičný limit (MEL) 2 ppm alebo 2.5 mg.m⁻³

2 Plynný formaldehyd je explozívny pri 7.75 % v suchom ovzduší. Jeho zápalný bod je 430°C

Výber a používanie dezinfekčného prostriedku

Pri výbere dezinfekčného prostriedku by sa mali brať do úvahy toxické účinky vybraného prostriedku a mali by byť zabezpečené primerané preventívne opatrenia zohľadňujúce bezpečnosť pri práci a ochranu zdravia ľudí. Rôzne dezinfekčné prostriedky sa nemôžu miešať alebo používať vo vzájomnej kombinácii, kým sa neposúdi možnosť vzniku nebezpečných reakcií alebo toxických produktov.

Na zabezpečenie prípravy vhodných dezinfekčných prostriedkov, ich primeraných riedení a ich správneho použitia by mali byť pripravené vhodné metodické a pracovné postupy a školenia pre zamestnancov pracujúcich v zariadení. Počet rôznych dezinfekčných prostriedkov dostupných v zariadení by mal byť obmedzený na nevyhnutné minimum. Výhodou tohoto obmedzenia je zabránenie zámenám dezinfekčných prostriedkov a zníženie nákladov na prevádzku zariadenia. Po výbere a určení dezinfekčného prostriedku by sa malo sledovať nielen uskutočňovanie jeho používania v zariadení, ale aj spôsob jeho používania. Cieľom tejto kontroly je zabezpečenie zistenia prípadných chýb pri jeho použití, napr. nevhodnej koncentrácie, použitia starého dezinfekčného prostriedku, použitia špinavých nádob, atď.