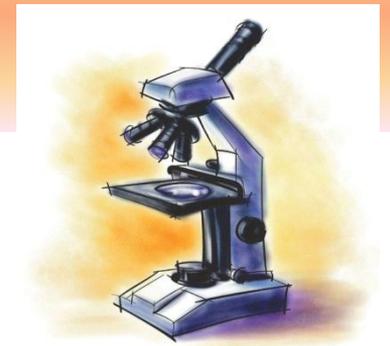




Основы микробиологии и иммунологии

Группы 112 а,б,в, 115 а,б.



Организация микробиологической лабораторной службы

- Основные понятия (введение)
- Структура микробиологической лаборатории
- Правила работы в микробиологической лаборатории
- Понятие о классах опасности микроорганизмов
- Принципы утилизации отходов микробиологической лаборатории
- Некоторые методические приемы бактериолога

Цель микробиологических исследований - **установить факт наличия или отсутствия возбудителя** в организме больного и на объектах окружающей среды.

Объект изучения медицинских микробиологических лабораторий - патогенные биологические агенты.

Работа в бактериологической (микробиологической) лаборатории требует соблюдения специальных правил, так как исследования проводятся с использованием культур патогенных микроорганизмов и заразного материала от больных и экспериментальных животных. Соблюдение этих правил необходимо для обеспечения не только личной безопасности, но и

Микробиологи имеют дело с популяциями (культурами) микроорганизмов, состоящими из миллионов особей. Культуру, содержащую микроорганизмы одного вида, называют чистой. Если в культуре содержится более одного вида микроорганизмов, она носит название смешанной.

В микробиологической практике используют главным образом чистые культуры микроорганизмов. Ввиду того что в воздухе и на поверхности предметов (на столах, инструментах, одежде), а также на руках, волосах всегда имеется большое количество разнообразных микроорганизмов, следует постоянно заботиться о сохранении чистоты изучаемых культур.

Требование чистоты культур в значительной степени определяет специфику устройства микробиологической лаборатории и правила работы микробиолога.



NB!

Понятия:

- **Патогенность** или болезнетворность микроорганизмов — это генетически обусловленная потенциальная способность микроорганизмов данного вида вызывать инфекционный процесс, и характеризуется специфичностью, т.е. способностью одного вида микроорганизма вызывать определенный клинический и морфологический симптомокомплекс.
 - **Вирулентность** - это степень патогенности каждого отдельного штамма патогенного микроорганизма.
 - В клинике о вирулентности судят по тяжести течения и исходу болезни, а в лабораторных условиях — по величине дозы, вызывающей летальный исход у 50% зараженных животных (LD50)*. В связи с этим, вирулентность можно отнести и к количественному параметру, характеризующему возбудителя.
- * - при этом учитывают четыре фактора, от которых зависит величина вирулентности: способ заражения, вид животного, вес животного, время наступления гибели животного*

- **Антисептика** - это комплекс мероприятий, направленный на **уничтожение микробов** (в ране, в патологическом очаге, в органах и тканях, а также в организме больного в целом), использующая механические и физические методы воздействия.
- Она достигается уничтожением микробов и их спор **путем дезинфекции и стерилизации**.

Листер вошёл в историю хирургии как основоположник антисептики, в 60-е годы XIX века создав первый цельный многокомпонентный способ борьбы с инфекцией (применялась карболовая кислота).

Антисептическое средство – вещество, которое подавляет рост и развитие микроорганизмов (но не обязательно убивает их). Антисептические средства обычно применяются к поверхности тела.

Спустя 25 лет, на смену антисептического метода Листера пришёл новый метод — асептический. В его основе лежат **предупреждение заражения раны**, соблюдение стерильности в ходе операции, стерилизация приборов, инструментов.

Результаты его применения оказались настолько впечатляющие, что появились призывы к отказу от антисептики и исключению антисептических средств из хирургической практики. Однако обойтись без них в хирургии оказалось невозможно. Постепенно асептика тесно переплелась с антисептикой.

Асептика (греч. отрицательная приставка а- + *septikos*, вызывающий нагноение, гнилостный) — комплекс мероприятий, направленных на **предупреждение попадания микроорганизмов.**

Асептика включает:

- а) стерилизацию инструментов, материалов, приборов и др.;
- б) специальную обработку рук персонала;
- в) соблюдение особых правил и приемов работы при проведении операций, исследований и др.;
- г) осуществление специальных санитарно-гигиенических и организационных мероприятий в лаборатории/лечебном учреждении/производстве.

Дезинфекция - уничтожение патогенных и условно-патогенных микроорганизмов с кожных покровов и объектов внешней среды до уровня не представляющего опасности для здоровья.

Виды дезинфекции:

- Профилактическая (плановая, по эпидпоказаниям, по санитарно-гигиеническим показаниям)
- Очаговая (текущая, заключительная)

Методы дезинфекции:

- Механическая – мытье, обработка пылесосом, вентиляция, проветривание, стирка, и т.д.
- Физическая – кипячение, воздействие сухого горячего воздуха, водяного насыщенного пара, УФ, и т.д.
- Химическая – применение химических веществ (антисептиков и дезинфектантов).
- Комбинированная – сочетание использования нескольких методов, например влажная уборка помещений с последующим УФ облучением.

Стерилизация (sterilis – бесплодный, лат.) – полное освобождение какого-либо предмета от микроорганизмов путем воздействия на него физическими или химическими факторами (синоним - обеспложивание).

Физические методы

- Обжигание и кипячение
- Стерилизация паром под давлением (автоклавирование)
- Стерилизация горячим воздухом (сухим жаром)
- Лучевая стерилизация

Механические методы стерилизации

- Фильтрование

Химические методы

- Газовая стерилизация
- Стерилизация растворами антисептиков

Предстерилизационная или постстерилизационная очистка – это механическая очистка от белковых, жировых и лекарственных загрязнений.

Механическая стерилизация:

Фильтрация через мелкопористые фильтры — механический способ избавления растворов от нерастворимых образований с малым поперечником частиц, каковыми могут считаться микробные клетки и споры, применяется для стерилизации термолабильных растворов (сыворотки, лекарственные вещества, питательные среды).

Материалом для изготовления фильтров при этом являются такие материалы, как неглазурованный фарфор (керамика), стекло, асбест, пленки, пропитанные коллодием (динитроцеллюлозой*), и другой пористый материал.

В данное время используются фильтры различных конструкций, глубинные и мембранные (размеры их пор не превышают 0,3 мкм).

* - Динитроцеллюлоза, разбухшая в смеси эфира со спиртом, называется «коллодион» или «коллодионная вата», а растворённая в избытке растворителя образует уже непосредственно *коллодий*. Представляет собой бесцветную или слегка желтоватую, иногда несколько опалесцирующую, сиропообразную жидкость, оставляющую после испарения растворителя тонкую пленку.

Бактериальные фильтры

• Существуют следующие типы бактериальных фильтров :

- 1) керамические (свечи Шамберлана (рис. 1) или Беркефельда); фильтрующим материалом в этих бактериальных фильтрах служит каолин с примесью кварца или инфузорная земля*, подвергнутая обжигу;
- 2) стеклянные фильтры (рис. 2) — воронки Бюхнера с впаянной пластинкой из мелкопористого стекла;
- 3) коллодийные пластинчатые фильтры, приготовляемые из нитроклетчатки или ацетилцеллюлозы (в частности, фильтры Элфорда).

В СССР выпускали коллодийные фильтры диаметром 35 мм для использования в фильтровальном аппарате Зейтца (рис. 3), в которых фильтрация происходит через специальные асбестовые пластинки.

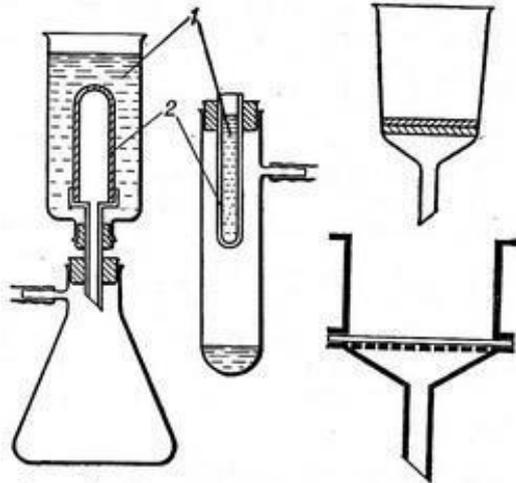


Рис. 1. Монтаж свечей Шамберлана (схема): 1 — фильтруемая жидкость; 2 — фильтровальная свеча.

Рис. 2. Стеклянные фильтры с пластинками из мелкопористого стекла (схема).

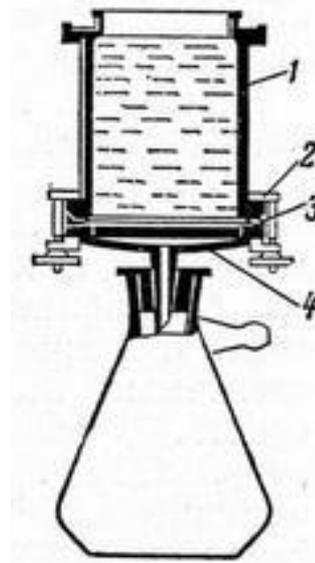


Рис.

* - осадочная горная порода, состоящая преимущественно из останков скопления кремнеземистых панцирей диатомовых водорослей

Материал для фильтрования необходимо очистить от крупнодисперсных элементов путем предварительного фильтрования через бумажные фильтры или центрифугирования при небольших скоростях (2000— 4000 об/мин). Растворы, содержащие высокие концентрации белка, перед фильтрованием целесообразно развести. При применении керамических фильтров целесообразно вначале насытить фильтр той средой, в которой содержится взвесь бактерий.

Керамические и стеклянные бактериальные фильтры после использования восстанавливают путем очистки и стерилизации. Для удаления органических остатков бактериальные фильтры прогревают в муфельной печи (тепло передается через стенки камеры, которой нагревается бактериальный фильтр).

Керамические бактериальные фильтры для фильтрации стерилизуют в автоклаве, затем промывают в теплой воде, слабом растворе формалина и 15% растворе хлорной извести. Обработанные таким образом керамические биологические фильтры отмывают в водопроводной и дистиллированной воде и высушивают.

Стеклянные биологические фильтры очищают путем фильтрования через них разведенных кислот, отмывают в водопроводной, а затем дистиллированной воде и стерилизуют в сушильном шкафу при $t^{\circ} 105^{\circ}$.

Коллодийные пластинчатые биологические фильтры стерилизуют кипячением в течение 20 мин. Использованные коллодийные биологические фильтры не восстанавливают.

КЛАССИФИКАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ ПО СТЕПЕНИ ИХ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ОПАСНОСТИ



NB!

- 1-я** - возбудители особо опасных инфекций, например, **чумы, натуральной оспы, желтой лихорадки.**
- 2-я** - возбудители высококонтагиозных эпидемических заболеваний человека, например, **сибирской язвы, бруцеллеза, малярии, сыпного тифа.**
- 3-я** - возбудители инфекционных болезней, выделяемых в самостоятельные нозологические группы, например, **брюшного тифа, шигеллеза, дифтерии.**
- 4-я** - условно патогенные микроорганизмы, возбудители оппортунистических инфекций, например, **клебсиеллы, протей.**

Нумерация групп микробов, принятая в России, отличается от классификации ВОЗ обратным порядком



Особо опасные инфекции

представляют собой значительную эпидемиологическую опасность в плане быстрого распространения и заражения большого количества людей, а также тяжелого течения болезни. Перечень и меры профилактики распространения ООИ были закреплены в Международных медико-санитарных правилах (ММСП), принятых 22-й сессией Всемирной ассамблеи здравоохранения ВОЗ 26 июля 1969 года. В 1970 году 23-я ассамблея ВОЗ исключила из перечня карантинных инфекций сыпной и возвратный тифы. С поправками 1981 года список включал лишь три заболевания: **чуму, холеру и сибирскую язву.**

В 2005 году на 58-й сессии Всемирной ассамблеи здравоохранения ВОЗ приняла новые ММСП, в которых были введены изменения.**

На каждый случай ООИ (или подозрени) медицинское учреждение должно отправить внеочередное донесение в территориальную СЭС.

Немного истории

- Чумой в Средневековье переболело больше 25 миллионов человек и примерно столько же погибло. Отсутствие централизованного водоснабжения и канализации являлось причиной постоянных вспышек холеры на территории Европы и Азии.

**Новая классификация ВОЗ:

1. болезни, которые являются необычными и могут оказать серьёзное влияние на здоровье населения: оспа, полиомиелит, вызванный диким полиовирусом, человеческий грипп, вызванный новым подтипом, тяжёлый острый респираторный синдром (ТОРС) или (SARS).
2. болезни, любое событие с которыми всегда оценивается как опасное, поскольку эти инфекции обнаружили способность оказывать серьёзное влияние на здоровье населения и быстро распространяться в международных масштабах: холера, легочная форма чумы, желтая лихорадка, геморрагические лихорадки — лихорадка Ласса, Марбург, Эбола, лихорадка Западного Нила. Сюда же ММСП-2005 относят инфекционные болезни, которые представляют особую национальную и региональную проблему, например лихорадку денге, лихорадку Рифт-Валли, менингококковую болезнь (менингококковую инфекцию).

Чума



Yersinia pestis, относящееся к группе зоонозов. Источником инфекции являются грызуны (крысы, суслики, песчанки и др.) и больной человек. Заболевание протекает в формах бубонной, септической (редко) и легочной. Наиболее опасна легочная форма чумы. Возбудитель инфекции — чумная палочка, устойчивая во внешней среде, хорошо переносящая низкие температуры. Заражение происходит через укусы блох, которые паразитировали на больном животном, воздушно-капельным (легочная форма чумы) и пищевым путями (употребление в пищу мяса зараженных животных).

Формы заболевания:

- локальная форма (бубонная)
- септическая форма
- легочная чума – самая опасная в эпидемиологическом плане

В диагностике чумы важную роль играет бактериологический метод с выделением культуры возбудителя и его идентификацией.

Натуральная оспа



Инфекционное вирусное заболевание, ООИ.

Возбудителем оспы является ДНК-вирус (*Poxvirus variola*). Колонии вируса видны в световом микроскопе в виде элементарных телец, расположенных в цитоплазме эпителиальных клеток эпидермиса. Тельца Пашена — Морозова представляют собой мелкие кокковидные образования, тельца Гуарньери — более крупные образования, представляющие собой денатурированный белок в области скопления вирусных телец.

Источник инфекции — больной человек в течение всего периода болезни.

Возможны три формы натуральной оспы:

- легкая форма — вариолоид или оспа без сыпи;
- натуральная оспа обычного типа и сливная оспа
- тяжелая геморрагическая форма, протекающая при явлениях кровоизлияний в элементы сыпи, вследствие чего последние становятся багрово-синими («черная оспа»).

Последний случай заболевания был зафиксирован в 1977 году в Сомали. В различных странах мира начали планомерно отказываться от обязательного оспопрививания, а 8 мая 1980 года XXXIII Генеральной ассамблеей ООН было заявлено о полной и безоговорочной победе человечества над натуральной оспой.



ГНЦ ВБ «Вектор» один из крупнейших научных вирусологических и биотехнологических центров России, расположенный в наукограде Кольцово Новосибирской области — один из двух в мире непосредственных участников процесса «Ликвидация оспы: уничтожение запасов вируса натуральной оспы» -начатых по рекомендации ВОЗ и официально имеющих только в США (репозиторий на базе CDC) и России (репозиторий на базе ГНЦ ВБ «Вектора»).

Категории лабораторий

В соответствии с делением микробов на группы по степени биологической опасности лаборатории также делят на категории. По номенклатуре ВОЗ выделяют 3 категории микробиологических лабораторий:

- 1) базовые (основные или общего типа)
- 2) режимные (изолированные), или лаборатории удержания
- 3) лаборатории особого режима (максимально изолированные) или лаборатории максимального удержания.

В зависимости от основных задач лаборатории могут быть научно-исследовательскими, диагностическими или производственными.

В системе органов здравоохранения имеются:

- клинико-диагностические лаборатории общего или специального (биохимическая, бактериологическая, иммунологическая, цитологическая и др.) типов, входящие в состав больниц, поликлиник, диспансеров и других лечебно-профилактических учреждений;
- бактериологические лаборатории Госсанэпиднадзора;
- санитарно-бактериологические лаборатории ГСН;
- санитарно-химические лаборатории ГСН;
- центральные (ЦНИЛ), проблемные, отраслевые, учебные лаборатории вузов;
- специализированные лаборатории (особо опасных инфекций и др.).

- *Работу с культурами возбудителей 1 и 2 групп можно проводить только в специальных лабораториях строгого режима с разрешения органов здравоохранения России.*
- *Работа с особо опасными микроорганизмами регламентируется специальной инструкцией и проводится в режимной лаборатории.*
- *Работа с возбудителями 3 и 4 групп проводится в соответствии с правилами устройства, техники безопасности, производственной санитарии в лабораториях СЭС и других бактериологических лабораториях.*

Работа с микроорганизмами регламентируется правилами и требованиями, направленными на обеспечение личной и общественной безопасности, защиту окружающей среды при работе с биологическими агентами:

1. Санитарно-эпидемиологические правила СП1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами 3–4 групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» - регламентирует работу с микроорганизмами 3-4-й группы;
2. Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.3118-13 для работы с I-II группой патогенности (введены с 15.08.2014 года).

А также документ: САНПИН 2.1.3.2630-10 "Санитарно-эпидемиологические требования к организациям, осуществляющим медицинскую деятельность»

и САНПИН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами»



БИОЛОГИЧЕСКАЯ
ОПАСНОСТЬ

«Биозащита» – это практическое применение принципов и методов обеспечения биологической безопасности, которые позволяют защитить работников от воздействия, связанного с работой, выполняемой в лаборатории (клинической или исследовательской).

«Биобезопасность» – это обеспечение мер безопасности (в сочетании с процедурами обеспечения биозащиты) для уменьшения риска потери, хищения или применения микробиологических агентов или токсинов в целях диверсии, что может привести к ненадлежащему или преступному использованию того или иного агента в качестве биологического оружия (биооружия), например для биотерроризма.

Устройство микробиологической лаборатории

- **Базовые лаборатории, работающие с патогенными биологическими агентами (ПБА)** групп III и IV, должны располагаться в отдельном здании или в изолированной части здания. Они должны иметь два выхода: один для сотрудников, другой — для доставки материала для исследований (допускается передача материала через передаточное окно).
- должны иметь необходимый набор помещений в соответствии с производственной мощностью и номенклатурой выполняемых исследований.

Грязная зона микробиологических лабораторий

- Включает помещения для приёма и регистрации материала, боксы и комнаты для проведения микробиологических исследований, помещения для проведения серологических исследований, комната для проведения люминесцентной микроскопии, термостатная, автоклавная для обеззараживания материала.
- Окна и двери всех помещений должны герметично закрываться. Приточно-вытяжная вентиляция «грязной» зоны должна быть оборудована фильтрами тонкой очистки выбрасываемого воздуха. Помещения для проведения работ с живыми патогенными биологическими агентами должны быть оборудованы бактерицидными лампами. Обязательна маркировка автоклавов, столов, стеллажей для чистого и инфицированного материала. Покрытие лабораторной мебели, поверхности пола, стен и потолка должны быть гладкими и устойчивыми к действию моющих и дезинфицирующих средств.

Чистая зона микробиологических лабораторий

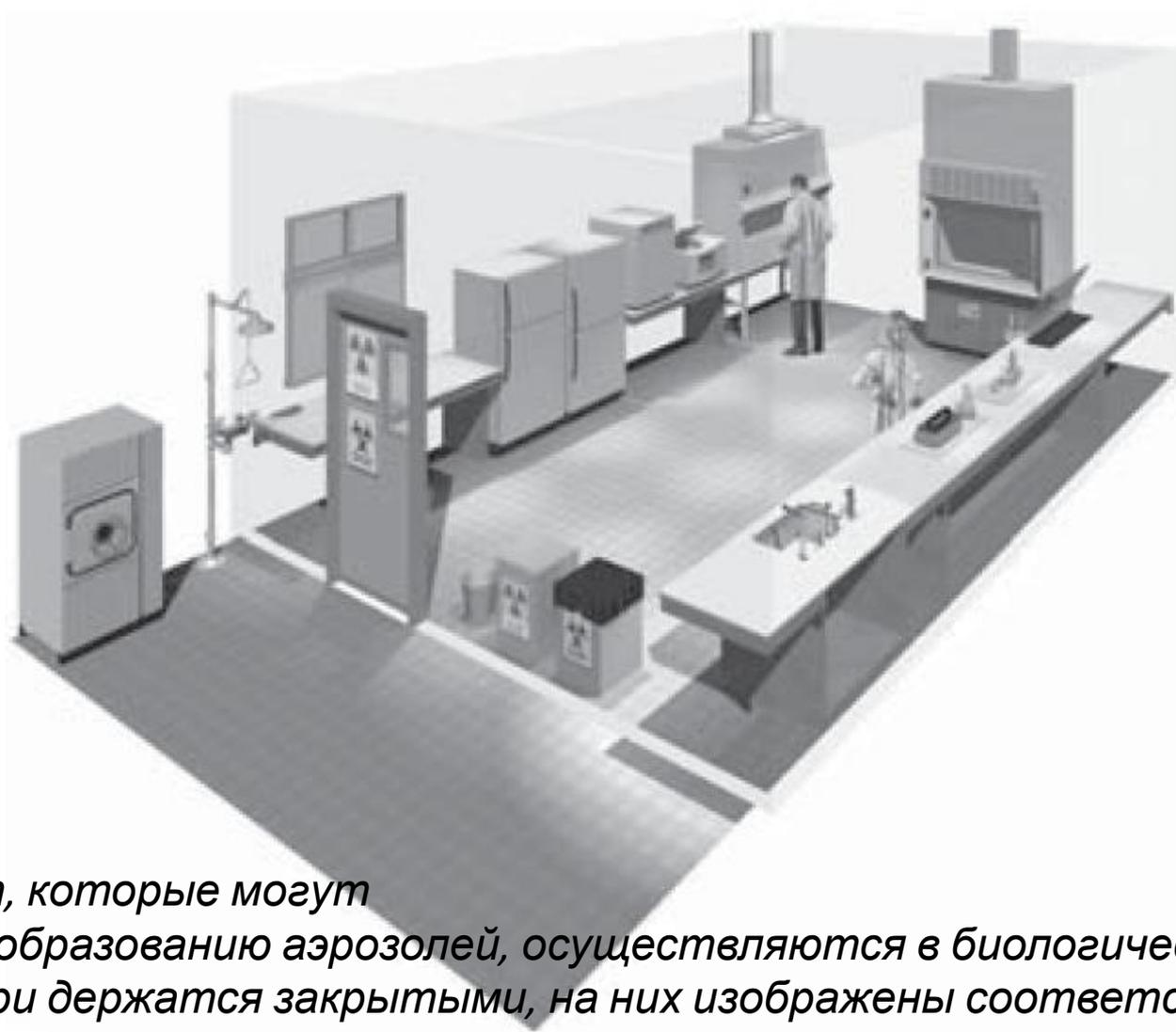
- включает гардероб для верхней одежды, комнаты отдыха, комнату для работы с документацией, комнату для надевания рабочей одежды, подсобные помещения, душевую, туалет, помещения для предварительных работ (препараторская, моечная, комната приготовления и разлива питательных сред и др.), стерилизационную, помещения с холодильниками для хранения питательных сред и диагностических препаратов. В «чистой» зоне возможна работа с неживыми патогенными биологическими агентами (серологические и биохимические исследования).

Все сотрудники, работающие с патогенными биологическими агентами, должны находиться на диспансерном учёте.

Приборы, оборудование и средства измерения должны быть аттестованы, технически исправны и иметь технический паспорт. Их метрологический контроль и техническое освидетельствование следует проводить в установленные сроки.

В структуру любой бактериологической лаборатории входят следующие помещения

- лабораторные комнаты и боксы для работы в асептических условиях;
- специально оборудованное помещение для стерилизации питательных сред, посуды, обеззараживания отработанного инфицированного материала;
- моечная, оборудованная для мытья посуды;
- помещение для приготовления питательных сред;
- виварий – помещение, предназначенное для содержания лабораторных животных.



Виды работ, которые могут привести к образованию аэрозолей, осуществляются в биологически безопасных боксах. Двери держатся закрытыми, на них изображены соответствующие знаки, предупреждающие о биологической опасности. Потенциально контаминированные отходы отделяются от общего потока

Предпочтительным методом деконтаминации является паровое автоклавирование



Режимы стерилизации методом
автоклавирования:

при давлении 1,1 атм. ($t^{\circ} = 119,6^{\circ}\text{C}$) – 1 час,
при давлении 1,5 атм. ($t^{\circ} = 126,8^{\circ}\text{C}$) – 45 мин,
при давлении 2 атм. ($t^{\circ} = 132,9^{\circ}\text{C}$) – 30 мин.

- Строго соблюдаются «Правила устройства и безопасности эксплуатации сосудов, работающих под давлением»
- Ведётся Журнал стерилизации
- Материал на стерилизацию передаётся под расписку, иногда он опломбирован и вскрытие до стерилизации запрещено
- Соблюдение мер предосторожности при открывании крышки стерилизатора (опасность ожогов)
- Ежедневное обеззараживание помещения автоклавной (в конце рабочего дня)

Подготовка сред к стерилизации.

- При автоклавировании 3 – 5% жидкости теряется в результате испарения, поэтому рекомендуется в приготавливаемые среды добавлять сверх объема примерно 5% дистиллированной воды. Тогда после стерилизации среда (раствор) будет иметь требуемую концентрацию.
- Среды обычно стерилизуют в пробирках, колбах, бутылках. Емкости заполняют средой не более чем на половину их высоты, чтобы предотвратить смачивание пробок. Сосуды со средами закрывают ватными пробками. Они предохраняют среду от заражения микрофлорой, находящейся в окружающем воздухе. Пробки должны быть достаточно плотными, чтобы выполнить эту функцию, но с равномерным распределением волокон ваты, так как через них происходит газообмен культуры с окружающей средой. Слишком плотные пробки затрудняют снабжение культур воздухом.
- Для приготовления пробки плоский кусок ваты, взятый вдоль волокна, скатывают валиком. Чтобы придать пробке прочность, ее прокатывают между ладонью и чистым стеклом, лежащим на столе. Длина пробки для обычной пробирки должна быть около 4 см. Пробка должна входить в пробирку на 1,5 – 2,0 см. Для сохранения формы пробку вынимают из горлышка, слегка вращая. Удобно обернуть пробку чистой марлевой салфеткой.
- Перед стерилизацией пробки нужно прикрыть бумажными колпачками. Нельзя обертывать пробки сосудов, которые будут стерилизоваться в автоклаве, целлофаном, фольгой или другими материалами, не пропускающими пар, так как пар должен обязательно проникать через пробку в сосуд, иначе среды не нагреются до нужной температуры и не простерилизуются. При использовании стеклянных, резиновых, корковых и других пробок их завёртывают в двойной слой обёрточной бумаги и стерилизуют привязанными к склянке, закрытой ватной пробкой. Пробки в сосуде меняют стерильно около пламени горелки.

Обработка и удаления контаминированных материалов и отходов

1. Неконтаминированные (неинфекционные) отходы, которые могут быть повторно использованы или удалены вместе с общими «бытовыми» отходами.
2. Контаминированные (инфекционные) «колющие предметы» – иглы, скальпели, ножи и осколки стекла. Их во всех случаях необходимо складывать в контейнеры с твердыми стенками, снабженные крышкой и подлежащие обработке в качестве контаминации



3. Контаминированные материалы, предназначенные для деконтаминации путем автоклавирования, которые затем подвергаются мойке и используются повторно (Предварительную мойку контаминированных материалов, подлежащих автоклавированию и повторному использованию, не проводят. Любую необходимую очистку или ремонт проводят после автоклавирования или дезинфекции).
4. Контаминированные материалы, предназначенные для автоклавирования и удаления.
5. Контаминированные материалы, подлежащие



Помещение для приготовления питательных сред содержит:

- Электроплитку
- Автоматическую «варочную машину» см.рисунок
- Электрическую мешалку (магнитную мешалку)
- Шкафы для хранения сухих смесей и компонентов сред (специальных хим. реактивов)
- Запас посуды для приготовления сред
- Фильтровальную бумагу
- рН-метр
- Мерную посуду (колбы, цилиндры и др.)
- Весы для приготовления сухих навесок



Виварий

Состоит обычно из пяти изолированных помещений (или групп помещений):

а) для первичной обработки поступивших животных и их карантина;

б) для содержания здоровых животных;

в) для содержания подопытных животных;

г) для мойки и стерилизации клеток, кормушек, поилок и т. п.;

д) для приготовления пищи, хранения корма, материала для подстилок и т. п.

В виварии предусматривают также лабораторию для проведения манипуляций и опытов, операционную для вскрытия животных, склад для инвентаря и помещение для обслуживающего персонала.

Помещениям для животных, как и лабораториям, могут назначаться – на основе оценки рисков и с учетом группы риска исследуемых микроорганизмов – уровни биологической безопасности 1, 2, 3 и 4.

SPF статус вивария (specific pathogen free) означает отсутствие микроорганизмов, вызывающих различные инфекции. Работа с животными в таких условиях позволяет четко проводить исследования.



Виварий

При работе с заразными животными выдаются отдельные комплекты спецодежды для работы только в этих помещениях. Рядом с такими помещениями устраивают гардеробные с отделением для дезинфекции использованной спецодежды. Сотрудники вивария должны соблюдать правила личной гигиены (работа в масках, перчатках, тщательное мытье рук дезинфицирующими растворами и т. д.) во избежание заражения от животных.

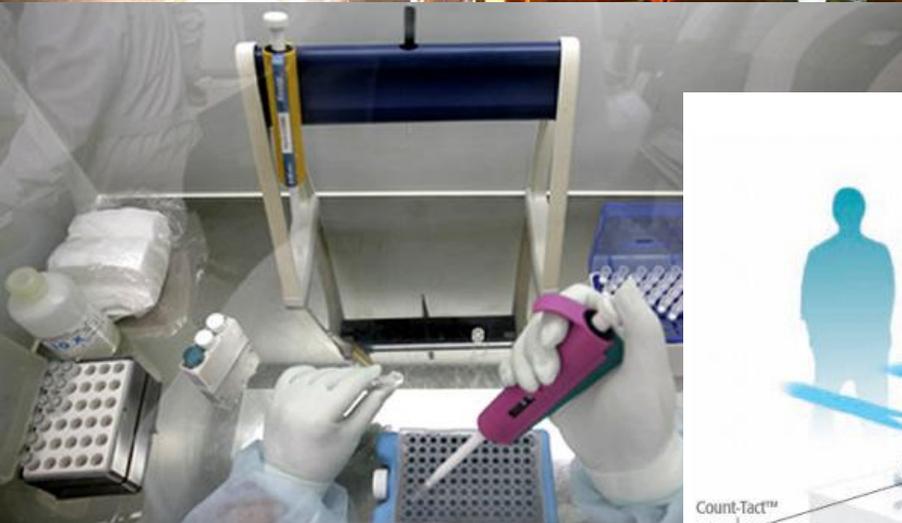
Трупы павших животных сжигаются. Сжигание необходимо проводить с согласия органов здравоохранения и защиты окружающей среды, а также ответственного за биологическую безопасность лаборатории.

Нормативный документ: Санитарные правила по устройству,

НО-
73 г. N 1045-73



Специалисту, работающему в микробиологической лаборатории, необходимы навыки работы с множеством современной аппаратуры



Основная аппаратура и оборудование

- **Термостат.** Аппарат, в котором поддерживается постоянная температура.
- **Микроанаэроустат.** Аппарат для выращивания микроорганизмов в анаэробных (бескислородных) условиях.
- **Холодильник.** Используется в микробиологических лабораториях для хранения культур микроорганизмов, питательных сред, крови, вакцин, сывороток и прочих биологически активных препаратов при температуре около 4°C.
- **Центрифуги.** Применяются для осаждения микроорганизмов, эритроцитов и других клеток, для разделения неоднородных жидкостей (эмульсии, суспензии).
- **Сушильно-стерилизационный шкаф (печь Пастера).** Предназначена для воздушной стерилизации лабораторной посуды и других материалов.
- **Стерилизатор паровой (автоклав).** Предназначен для стерилизации паром под давлением.
- Гомогенизаторы, шейкеры, миксеры, мешалки (вортексы) и ультразвуковые измельчители (соникаторы)
- Водяная баня.
- Денситометры (мутномеры) и спектрофотометры.

Боксы биологической безопасности –подход к безопасной работе в лаборатории (отведение воздуха, с последующей тонкой фильтрацией)

предназначены для того, чтобы защитить оператора, лабораторное оборудование и рабочие материалы от воздействия инфекционных аэрозолей и брызг, которые могут возникнуть при работе с материалами, содержащими инфекционные агенты, такими как первичные культуры, инвентарь, диагностические образцы. Частицы аэрозоля образуются при любой деятельности, сопряженной с переливанием, перемешиванием или распылением жидкости или материалом, находящимся в полужидком состоянии, (также при встряхивании, переливании, перемешивании или нанесении/капании на поверхность или в другую жидкость).

Частицы аэрозоля размером менее 5 мкм в диаметре и капли размером 5-100 мкм в диаметре являются невидимыми невооруженным глазом. Такие частицы возникают и могут быть поглощены в результате вдыхания или контаминируют материалы на рабочей поверхности.

Боксы биологической безопасности также защищают окружающую



Ламинарный (воздушный поток поступает без завихрений)

шкаф представляет собой бокс, оборудованный осветителями, ультрафиолетовыми лампами и системой подачи стерильного воздуха.

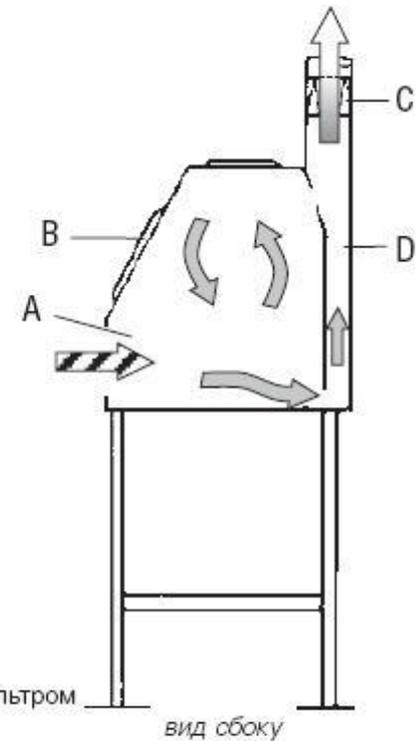
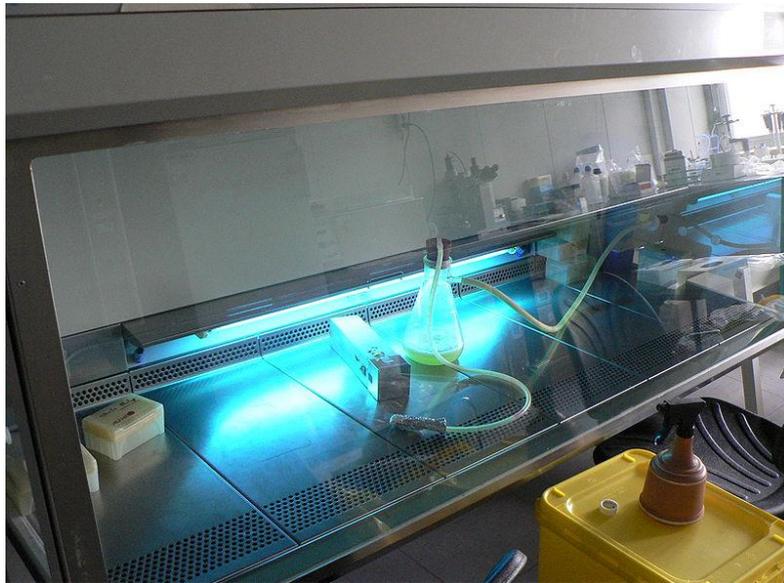


Схема бокса биологической безопасности

7 основных правил работы в базовой лаборатории включают:

1. • запрет работ со стеклянной пипеткой при помощи рта;
2. • запрет приема пищи, питья, курения, хранения пищи и применения косметических средств в рабочих помещениях;
3. • поддержание чистоты и порядка;
4. • дезинфекцию рабочих поверхностей не реже 1 раза в день и после каждого попадания на них заразного материала;
5. • мытье рук персоналом после работы с заразным материалом, животными, перед уходом из лаборатории;
6. • проведение всех работ таким образом, чтобы свести к минимуму возможность образования аэрозоля;
7. • обеззараживание всех инфицированных материалов перед выбросом или повторным использованием.

Микроскопы с различными объективами (биологический, люминесцентный, электронный и др.) и специальные методы микроскопии (фазово-контрастный, темнопольный и др.)



Светоптический биологический микроскоп.



Иммерсионный объектив (с черной полосой).

На рабочем столе микробиолога должно быть:

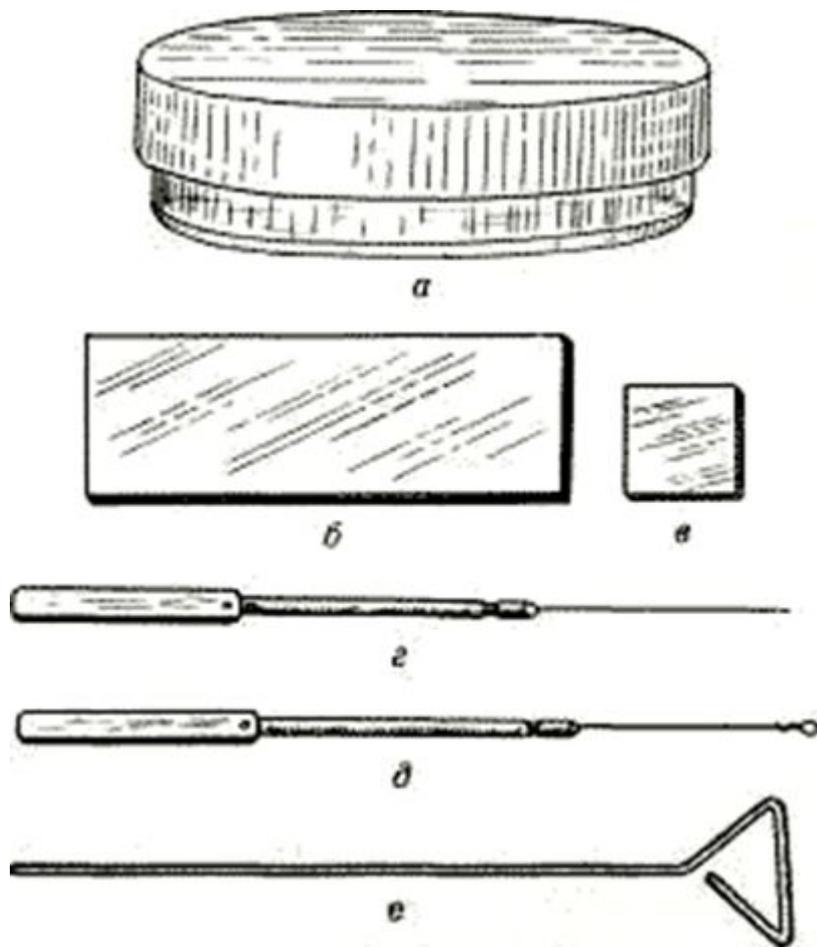
- микроскоп с иммерсионным объективом
- иммерсионное масло
- бактериологические петли (и шпатели)
- спиртовка или газовая горелка
- набор красителей
- емкости с водой и спиртом и емкость для промывки препаратов
- пипетки (стеклянные, пастеровские (с резиновым дозатором) и автоматические, со сменными стерильными наконечниками)
- предметные и покровные стекла и салфетки
- штатив для пробирок с культурами
- пинцет для извлечения стекол
- фильтровальная бумага для высушивания препаратов
- банка для отработанных стекол, для использованных наконечников
- дезинфицирующий раствор (3% раствор хлорамина)
- маркер по стеклу





Посуда микробиологическая должна быть

изготовлена из специального стекла, выдерживающего нагревание при высокой температуре, легко отмываться от загрязнений.



Микробиологическая посуда:

- а— чашка Петри;
- б— стекло предметное;
- в— стекло покровное;
- г— игла микробиологическая;
- д— петля микробиологическая;
- е— шпатель Дригальского.

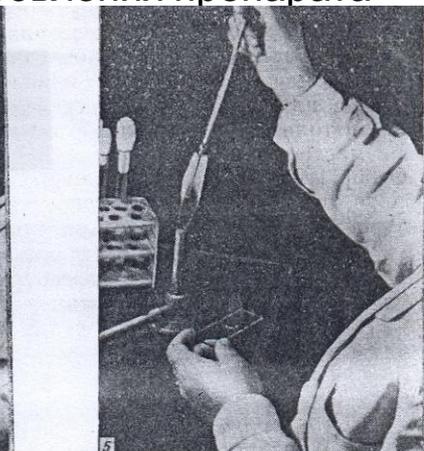
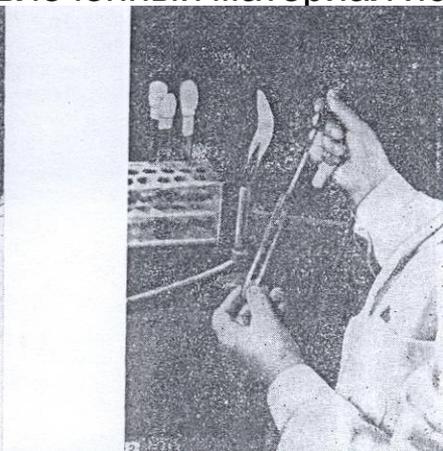
Стекла предметные (белые стекла с отшлифованными краями размером 26 x 76 мм, толщиной 1,1—1,4 мм); стекла покровные (квадратные стекла размером 14 x 14 или 18 x 18, толщиной 0,15—0,17 мм); чашки Петри, состоящие из двух круглых плоских чашек — крышки и дна. Наиболее употребительны чашки диаметром 10 см, высотой 1,5 см.

Работа с микробами: посев (инокуляция) – методические основы

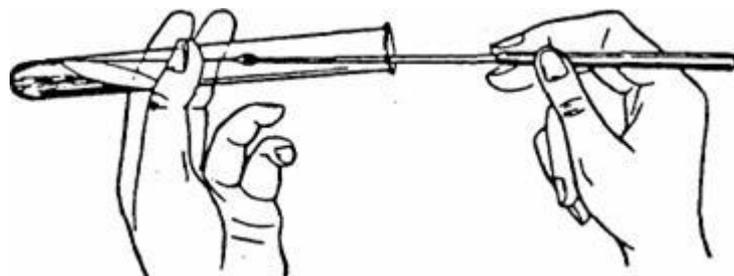
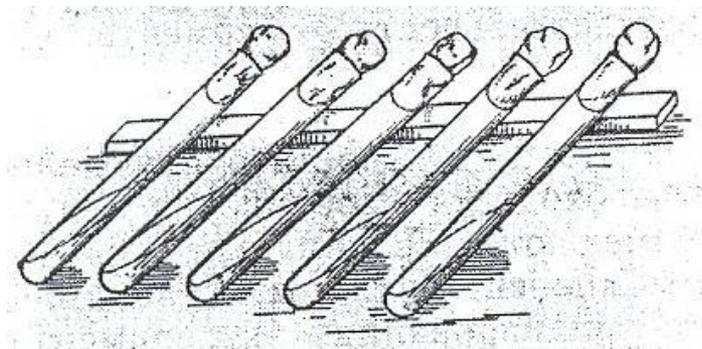
- Бактериологическую петлю (иглу) перед взятием клеток микроорганизмов стерилизуют. Для этого проволоку накаливают докрасна в пламени горелки и одновременно обжигают примыкающую к петле часть держателя, которая будет вводиться внутрь сосуда, содержащего микроорганизмы. Петлю рекомендуется держать в пламени горелки почти вертикально, чтобы проволока была равномерно раскалена на всем протяжении. При прокаливании необходимо помнить, что наивысшая температура развивается в верхней и периферической частях пламени, поэтому не следует опускать петлю непосредственно к фитилю спиртовки. Сразу же после стерилизации петлю вводят в сосуд с микроорганизмами. Чтобы не повредить клетки микроорганизмов, петлю вначале охлаждают, прикасаясь ею к внутренней поверхности сосуда или к питательной среде, свободной от клеток микроорганизмов, и только после этого захватывают небольшое количество микробной массы.

Отбор клеток микроорганизмов, выращенных на плотной среде в пробирке, осуществляют следующим образом:

- Пробирку с культурой берут в левую руку так, чтобы поверхность питательной среды с налетом выросших микроорганизмов была обращена кверху и хорошо видна. Пробирку держат в горизонтальном или несколько наклонном положении. В правую руку берут петлю так, как держат карандаш, и прокалывают ее в пламени горелки. Затем, не выпуская петли, мизинцем и безымянным пальцем правой руки прижимают ватную пробку к ладони, вынимают ее из пробирки и держат так всё время последующих манипуляций. Край открытой пробирки с культурой микроорганизмов обжигают в пламени горелки и после этого вводят в пробирку стерильную петлю. Взяв небольшое количество микробной массы с поверхности субстрата, вынимают петлю из пробирки, следя за тем, чтобы переносимый материал не касался стенок или краев пробирки.
- Горлышко пробирки снова обжигают в пламени горелки, затем обжигают ватную пробку и закрывают ею пробирку. Если конец ватной пробки загорится, то не следует бросать пробку. Ее нужно быстро ввести в пробирку, где вата сама потухнет. Ни в коем случае нельзя дуть на загоревшуюся пробку, так как это только усилит горение. Если в момент пересева ватная пробка упадет на стол или на пол, то не следует снова вставлять ее в пробирку. Нужно взять новую стерильную пробку и начать всю операцию заново. Закрытую ватной пробкой пробирку с культурой ставят в штатив, а извлеченный материал используют для приготовления препарата

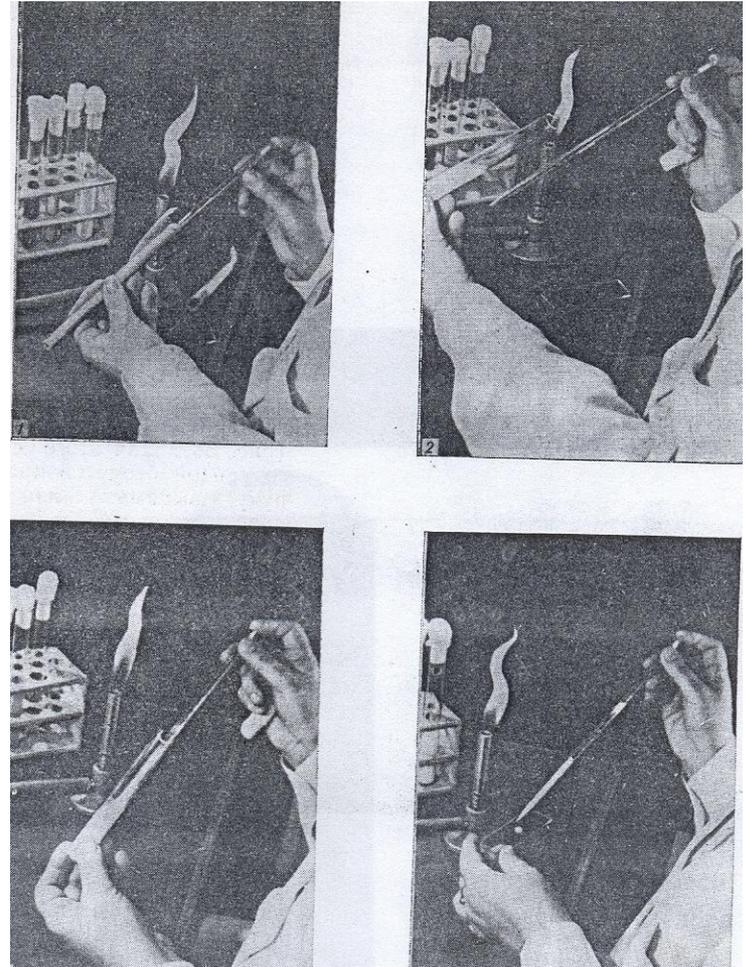


Если культуру пересевают на скошенную агаризованную среду, то петлю вводят в пробирку до конца и, слегка касаясь ею поверхности агара, проводят снизу вверх либо зигзагообразную, либо прямую черту - штрих. При этом стараются не повредить поверхность плотной среды. В случае посева в жидкую среду (в колбы или пробирки) петлю с микробной массой погружают непосредственно в среду. Оставшиеся на петле после посева или приготовления препарата клетки микроорганизмов тщательно сжигают в пламени горелки. Прокаливание петли в этом случае начинают с участка проволоки, примыкающего к кольцу, для того, чтобы микробная масса, оставшаяся на петле, подсохла. Затем петлю переводят в вертикальное положение и прокаливают докрасна. Такой порядок стерилизации петли необходим потому, что при быстром нагревании влажной микробной массы происходит ее разбрызгивание и образуется аэрозоль, загрязняющий воздух. Только после прокаливания петлю можно положить на место.



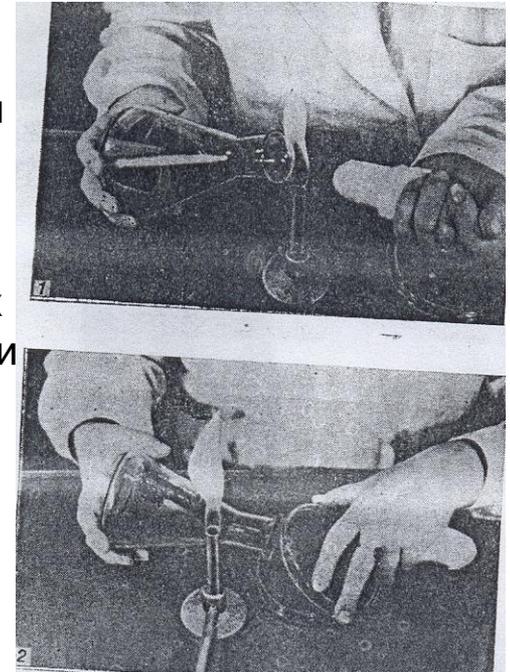
Из жидкой среды клетки берут следующим образом:

- Пипетку за верхний конец вынимают из бумаги или пенала, в которых она стерилизовалась, и вводят в пробирку или колбу с культурой, соблюдая все предосторожности, описанные выше. Отбирать жидкую культуру пипеткой можно с помощью резиновой груши. Использованную пипетку следует немедленно перенести в дезинфицирующий раствор, например 3-5% водный раствор фенола или 2% раствор хлорамина, не касаясь ею окружающих предметов.

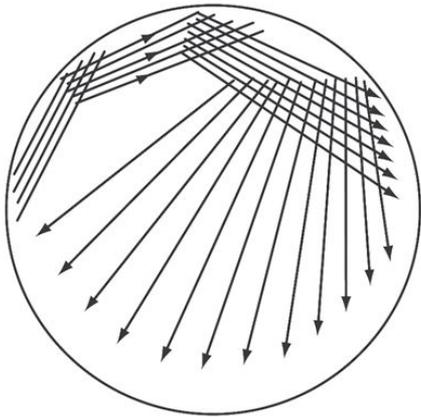


Рассев микроорганизмов из жидкой питательной среды на поверхность плотной среды в чашке Петри

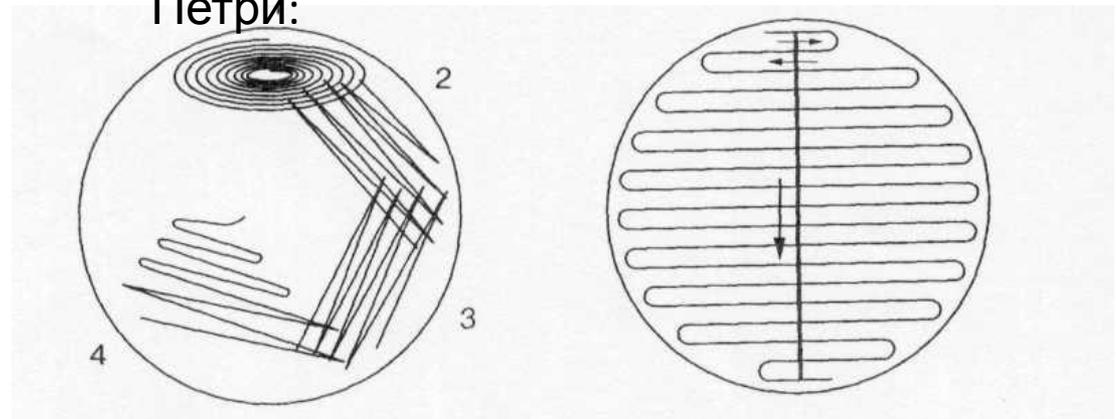
Расплавленную на кипящей водяной бане стерильную питательную среду, содержащую агар, разливают в стерильные чашки Петри. Для этого сосуд со средой берут в правую руку, вынимают из него пробку, зажимая ее мизинцем и безымянным пальцем левой руки. Затем обжигают горлышко сосуда в пламени горелки и, приоткрыв большим и средним пальцами левой руки крышку чашки Петри, быстро наливают в чашку расплавленную среду в таком количестве (10-15 мл), чтобы дно чашки было полностью покрыто. Крышку тотчас закрывают и чашку оставляют на горизонтальной поверхности до тех пор, пока не застынет среда. Для посева приоткрывают крышку чашки Петри и на поверхность плотной среды наносят каплю или «петлю» жидкой культуры, которую осторожно распределяют стеклянным стерильным шпателем (шпатель Дригальского) либо петлей. Все описанные манипуляции следует проводить около пламени горелки (но не в пламени), по возможности быстро, чтобы не загрязнить культуру посторонними микроорганизмами. Не рекомендуется делать резкие движения и ходить около лица, работающего с чистой культурой, так как движение воздуха увеличивает вероятность случайного ее загрязнения. После пересева пробирку или другие сосуды, в которых выращивают микроорганизмы, помещают в термостаты, где с помощью терморегуляторов поддерживается постоянная температура. Неаккуратное обращение с культурами микроорганизмов приводит к возникновению бактериального аэрозоля.



Техника посева, порядок нанесения бактериальной культуры на поверхность агаризованной питательной среды в чашке Петри **методом истощающего штриха**: отбирают материал для посева петлей и на поверхности плотной среды проводят штрихи в таком порядке, как указано на рисунке. Перед каждым новым направлением штрихов петлю стерилизуют в пламени горелки.



Другие виды техники посева на плотную питательную среду в чашки Петри:



Глоссарий

1. Биозащита
2. Биобезопасность
3. Патогенность
4. Вирулентность
5. Антисептика
6. Асептика
7. Дезинфекция
8. Стерилизация
9. Особо опасные инфекции
10. Контаминация

1.	2.	3.	4.
----	----	----	----

1. Возбудители данного заболевания относятся ко 2-й группе по степени их биологической опасности. Их впервые в 1886 году обнаружил английский учёный Дэвид Брюс.
2. Группа острых заразных заболеваний человека, которые способны к внезапному появлению, быстрому распространению и массовому охвату населения; характеризуются тяжелым течением и высокой летальностью. К ним относят чуму, натуральную оспу, желтую лихорадку.
3. Показатель фекального загрязнения объектов окружающей среды, выраженный количеством кишечных палочек в 1 л воды.
4. *Pseudomonas aeruginosa* это...



Ребус!

Спасибо за внимание!

