



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ
ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА
Федеральное казённое учреждение здравоохранения
«Иркутский ордена Трудового Красного Знамени
научно-исследовательский противочумный
институт Сибири и Дальнего Востока»

ОСОБЕННОСТИ МЕТОДИЧЕСКИХ ПРИЕМОВ И СПЕЦИФИЧЕСКИЕ УСЛОВИЯ РАБОТЫ С ВОЗБУДИТЕЛЯМИ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИЙ



УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ
ДЛЯ ВРАЧЕЙ-БАКТЕРИОЛОГОВ,
ЛАБОРАНТОВ

ИРКУТСК – 2022

Федеральная служба по надзору в сфере защиты
прав потребителей и благополучия человека
Федеральное казенное учреждение здравоохранения
«Иркутский ордена Трудового Красного Знамени
научно-исследовательский противочумный институт
Сибири и Дальнего Востока»

**ОСОБЕННОСТИ МЕТОДИЧЕСКИХ ПРИЕМОВ
И СПЕЦИФИЧЕСКИЕ УСЛОВИЯ РАБОТЫ
С ВОЗБУДИТЕЛЯМИ ОСОБО
ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИЙ**
(учебное пособие для врачей-бактериологов)

Иркутск – 2022

УДК 616.9-078
ББК 52.64
072

Особенности методических приемов и специфические условия работы с возбудителями особо опасных инфекций: учебное пособие для врачей-бактериологов. – Иркутск: ИНЦХТ, 2022 – 56 с.

ISBN 978-5-98277-358-6

Утверждено Ученым советом
ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский
противочумный институт Роспотребнадзора»

В учебном пособии отражены вопросы организации работы режимных лабораторий, защиты от биологических поражающих агентов, методы и средства обеззараживания.

В нем представлены основные методические приемы безопасной работы с материалом, зараженным или подозрительным на зараженность возбудителями I–II групп патогенности, при проведении бактериологических и молекулярно-генетических исследований.

Предлагаемое учебно-методическое пособие предназначено для организации и проведения практических занятий на курсах профессиональной переподготовки и повышения квалификации врачей, биологов и лаборантов по особо опасным инфекциям.

Авторы:

*Т.Ю. Загоскина, С.В. Балахонов, О.Б. Колесникова, Т.М. Долгова,
О.В. Гаврилова, О.А. Старикова, В.Ю. Колесникова*

ISBN 978-5-98277-358-6



© Коллектив авторов, 2022
© ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский
противочумный институт Роспотребнадзора, 2022
© ИНЦХТ, 2022

СОДЕРЖАНИЕ

1. Общие требования к организации работ в бактериологических лабораториях	4
1.1. Требования к помещению и оборудованию лабораторий	4
1.2. Обеззараживание помещений и оборудования лабораторий .	8
1.3. Обеззараживание и утилизация отходов деятельности лаборатории	12
2. Средства защиты	15
3. Методические приемы и особенности работы с возбудителями I–II групп патогенности	25
3.1. Организация рабочих мест и особенности методических приемов при посеве инфицированного материала	25
3.2. Пипетирование заразного материала	30
3.3. Микроскопические методы исследования	33
3.3.1. Приготовление мазков для окрашивания	33
3.3.2. Окраска мазков	36
3.3.2.1. Простой метод окраски	36
3.3.2.2. Окраска по Граму	36
3.3.2.3. Выявление капсул по методу Бурри-Гинса	37
3.3.2.4. Окраска спор по Пешкову	37
3.3.2.5. Окраска по методу Романовского-Гимзы	38
3.3.3. Приготовление раздавленной и висячей капли	38
4. Особенности техники безопасной работы с экспериментальными животными	40
4.1. Требования к размещению и оснащению помещений блока инфицированных животных	40
4.2. Вскрытие животных	44
4.3. Заражение лабораторных животных	49
Нормативные документы и рекомендуемая литература	54

1. ОБЩИЕ ТРЕБОВАНИЯ К ОРГАНИЗАЦИИ РАБОТ В БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИХ ЛАБОРАТОРИЯХ

1.1. Требования к помещению и оборудованию лабораторий

Вся работа с патогенными микроорганизмами проводится в лабораториях, которые, в зависимости от основных задач, могут быть научно-исследовательскими, диагностическими или производственными. Кроме того, лаборатории, как правило, специализированы и работают преимущественно с той или иной группой микроорганизмов (бактериальная, вирусная, риккетсиозная, грибковая и др.). Существует и более узкая специализация лабораторий. Например, работа бактериологических лабораторий может быть направлена на изучение анаэробных бактерий, лептоспир, возбудителя туберкулеза и др.

Условия работы лабораторий регламентированы степенью опасности микроорганизмов для человека. По этому признаку выделено четыре группы возбудителей инфекционных заболеваний (СанПиН 3.3686-21 приложение 1).

I группа – возбудители особо опасных инфекций: чума, натуральная оспа, лихорадки Ласса, Эбола и др.

II группа – возбудители высококонтагиозных бактериальных и вирусных инфекций: сибирская язва, туляремия, бруцеллез, холера, сеп, мелиоидоз и др.

III группа – возбудители бактериальных, грибковых, вирусных и протозойных инфекций, выделенные в отдельные нозологические группы (возбудители коклюша, столбняка, ботулизма, туберкулеза, кандидоза, малярии, лейшманиоза, гриппа, полиомиелита и др.). В эту группу включены аттенуированные штаммы бактерий I, II и III групп.

IV группа – возбудители бактериальных, вирусных, грибковых септицемий, менингитов, пневмоний, энтеритов, токсикоинфекций и острых отравлений (возбудители анаэробных газовых инфекций, синегнойной инфекции, аспергиллеза и амебиаза; аденовирусы, герпес-вирусы и др.), относящиеся к условно-патогенным микроорганизмам.

Особенности деятельности с использованием патогенных биологических агентов (ПБА) в лабораториях предусматривают их классификацию по уровню биобезопасности: базовые – уровень биобезопасности (УББ) 1 (осуществление всех видов работ с ПБА IV группы); уровень

биобезопасности (УББ) 2 (осуществление всех видов работ с ПБА III–IV группы, а также проведение работ с ПБА II группы, не сопровождающихся накоплением (культивированием или концентрированием) жизнеспособного патогена; изолированные – УББ 3 (осуществление всех видов работ с ПБА I (возбудитель чумы) – II группы, а также проведение работ с вирусами I группы, не сопровождающихся накоплением (культивированием или концентрированием) жизнеспособного патогена); максимально изолированные – УББ 4 (все виды работ с вирусами I группы патогенности, микроорганизмами, ассоциированными с клиническими проявлениями, характерными для ПБА I–II групп, таксономическое положение которых не определено, а степень опасности не изучена, экспериментальные исследования штаммов со множественной устойчивостью к антибиотикам и химиопрепаратам; аэриобиологические исследования с ПБА I–II групп) (СанПиН 3.3686-21 п. 143).

Большая часть микробиологических лабораторий работает с ПБА III и IV групп и только специализированные лаборатории с возбудителями I и II групп патогенности.

Любая микробиологическая лаборатория, в которой проводится работа с патогенными микроорганизмами, должна иметь санитарно-эпидемиологическое заключение о соответствии условий выполнения работ с биологическими агентами I–IV групп патогенности (опасности) требованиям Санитарных правил, должна располагать соответствующими оборудованием и материалами для исследования, а также иметь подготовленные кадры.

Особые требования предъявляют к лабораториям, в которых проводят работу с ПБА I–II групп патогенности – микроорганизмами (бактериями, вирусами, риккетсиями, грибами, хламидиями), включая генно-инженерно-модификационные; ядами биологического происхождения (токсинами); любыми объектами и материалами (полевой, клинический, секционный), подозрительными на содержание перечисленных агентов (СанПиН 3.3686-21 п. 162). Эти лаборатории размещают в отдельно стоящем здании. Допускается размещение в изолированной части здания (часть объема здания или сооружения, имеющая определенное назначение и ограниченная строительными конструкциями, имеющая отдельный вход, и не используемая для доступа в иное помещение, автономную систему приточно-вытяжной вентиляции). Лаборатория (организация/подразделение) должна иметь отдельный вход в «чистую» зону. Желательно располагать такие лаборатории на окраине города или за его пределами, а территорию, на которой расположена стационарная лаборатория, ограждать забором с камерами видеослежения. Лабораторию обеспечивают круглосуточной военизи-

рованной охраной, сигнализацией, средствами пожаротушения. Входная дверь лаборатории обозначена знаком «Биологическая опасность» и должна быть постоянно закрыта. На окна первого и цокольного этажей здания устанавливают металлические решетки.

Лабораторию обеспечивают, не нарушая правил техники безопасности, водопроводом, канализацией, электроэнергией, отоплением, вентиляцией, средствами связи.

Желательно иметь отдельный вход для производственной работы (доставка чистых биопробных животных, фуража и другого чистого материала).

Помещение лаборатории разделяют на «заразную» зону, где проводят манипуляции с ПБА и их хранение, и «чистую» зону, где не работают с ПБА. В «заразной» зоне располагают блок для работы с инфицированными животными (вскрытие, заражение, зоолого-паразитологические исследования), боксированные помещения для различных микробиологических манипуляций, комнаты для иммуно-серологических исследований, помещение для ПЦР-диагностики, комнаты, оснащенные боксами биологической безопасности (БББ) для работы, связанной с высоким риском образования аэрозоля (центрифугирование, гомогенизация, измельчение, интенсивное встряхивание, обработка ультразвуком, вскрытие ампул с ПБА, манипуляции с большими объемами и концентрациями ПБА), автоклавную для обеззараживания материала, термальную (при необходимости), комнату для ведения записей, туалет.

Набор помещений и их оснащение могут варьировать в зависимости от целей и задач лаборатории.

В «чистой» зоне предусмотрены: гардероб для верхней одежды, препараторская, моечная, средоварня, стерилизационная, помещение с холодильной камерой, кабинеты для работы с документами, подсобные помещения, туалет. Вход в «заразную» зону и выход из нее осуществляют через санитарный пропускник. При входе обязательно полное переодевание сотрудников в специальную одежду, при выходе перед переодеванием в личную одежду персонал проходит целевую санитарную обработку.

Помещение, где непосредственно проводится работа с ПБА, герметизируют и оснащают автономной системой приточно-вытяжной вентиляции, изолированной от других вентиляционных систем здания. Эту систему вентиляции оборудуют на выходе и при необходимости на входе фильтрами тонкой очистки (ФТО), проверенными на защитную эффективность. Периодически по плану контролируют эффективность работы фильтров. Эксплуатацию систем приточно-вытяжной вентиляции лабораторий осуществляют в соответствии с инструкцией, составленной на основании требований соответствующих нормативных документов.

Замену ФТО приточных и вытяжных систем проводят при планово-предупредительных ремонтах при достижении предельно допустимого перепада давлений, установленных проектом. Перед демонтажем фильтры и магистральный воздуховод обрабатывают парами формалина или аэрозолями дезинфектантов. Снятый фильтр помещают в крафт-мешок или другую упаковку и автоклавируют или сжигают. Работу по демонтажу фильтра проводят в костюме IV типа с использованием респиратора и резиновых перчаток (под рабочими перчатками).

Проверка боксов биологической безопасности II и III классов проводится при их установке и в процессе эксплуатации (ежегодно).

В помещениях «заразной» зоны лаборатории, за исключением комнат для содержания биопробных животных, в исключительных случаях (работа в условиях жаркого климата) допускается кондиционирование воздуха. При этом кондиционеры устанавливают на приточных вентиляционных системах до ФТО. Категорически запрещается работать с ПБА при включенных кондиционерах.

Водоснабжение лаборатории должно быть обеспечено техническими средствами защиты от подсоса и обратного тока воды. Категорически запрещен слив (сток) необеззараженных жидкостей в общую канализацию. Как правило, сточные воды перед сбросом в общегородской канализационный коллектор обеззараживают химическим (хлорирование), физическим (УФО) или термическим способами. Периодически (не реже 1 раза в месяц) эффективность обеззараживания контролируют бактериологическим методом, а также проверяют на остаточную концентрацию активного вещества применяемого дезинфицирующего средства.

Лаборатории, проводящие работу с ПБА I-II групп патогенности, обязательно исследуют сточные воды на содержание в них специфической микрофлоры. Краткость исследования проб сточных вод зависит от вида возбудителя, характера и объема проводимых работ.

Аварийную звуковую и/или световую сигнализацию устанавливают в комнатах, где проводят работу с ПБА. Кроме того, лабораторию оборудуют пожарной сигнализацией и средствами пожаротушения.

Помещение лаборатории должно быть светлым и достаточно просторным для обеспечения безопасного проведения лабораторной работы. Ширина проходов к рабочим местам – не менее 1,5 метров. Стены, потолок, пол должны иметь гладкую поверхность, легко моющуюся, непроницаемую для жидкостей и устойчивую к дезинфицирующим средствам. Стены и потолки окрашивают масляной краской светлых тонов или облицовывают глазурованной плиткой. Полы покрывают нескользкой плиткой, пластиком или линолеумом, тщательно заделывая

швы, поскольку помещение должно быть непроницаемым для грызунов и насекомых.

Лабораторное оборудование и мебель должны быть гладкими, без острых краев, шероховатостей и иметь покрытие, устойчивое к действию моющих и дезинфицирующих веществ. Для рабочих поверхностей столов используют химически- и термоустойчивые (выдерживающие действие температур до 170–200 °С) материалы. Следует создать хорошую освещенность для всех видов работ, обратив внимание на нежелательность бликующих поверхностей. Согласно рекомендациям IES- RP-CC012 (США), типовые значения освещенности должны составлять 770–880 лк на высоте рабочего места.

Если окна лаборатории ориентированы на юг, необходимо предусмотреть защиту рабочих столов от прямых солнечных лучей путем использования жалюзи из материала, устойчивого к дезинфектантам.

Лаборатории оснащают вытяжными шкафами, где проводят работу с кислотами, щелочами и растворителями. Вытяжной шкаф оборудуют светильниками, кранами горячей и холодной воды, сигнальной лампой вытяжного вентилятора, заземленными розетками.

Химические реактивы хранят в вентилируемых шкафах из нержавеющей стали или дерева, которые оснащают вентиляционной системой. Скорость потока воздуха в различных моделях должна составлять от 85 до 125 м³/ч.

Весы устанавливают на специальные антивибрационные столы, которые позволяют их правильно эксплуатировать.

Приборы, оборудование и средства измерения, используемые в работе лаборатории, должны быть аттестованы, технически исправны, иметь технический паспорт и рабочую инструкцию по эксплуатации с учетом требований биологической безопасности. Средства измерения регулярно подвергают метрологическому контролю. Используемые приборы должны соответствовать нормам безопасности и электромагнитной совместимости.

Работа с ПБА I–II групп может проводиться только в лицензированных лабораториях, имеющих санитарно-эпидемиологические заключения о возможности проведения определенного вида исследований с конкретными микроорганизмами. Разрешение на работу утрачивает силу, если в лаборатории проведена перепланировка.

1.2. Обеззараживание помещений и оборудования лабораторий

Под микробным обеззараживанием понимается комплекс мероприятий, средств и методов, обеспечивающих снижение воздушного и по-

верхностного загрязнения рабочих помещений до требуемых уровней. Это понятие более широкое, чем понятие дезинфекция, которая служит лишь одним из элементов микробного обеззараживания.

Для обеззараживания различных объектов имеется большой выбор дезинфицирующих средств, а также комбинаций дезинфектантов и детергентов с приемлемой бактерицидной активностью и незначительным коррозионным действием. Однако средства и методы обеззараживания определяются в каждом конкретном случае в зависимости от вида ПБА и характера обрабатываемого объекта (СанПиН 3.3686-21 приложение 2).

Например, при работе с вегетативными формами бактерий I-II групп патогенности обеззараживание поверхностей (стол, оборудование, стены, двери) в помещениях «заразной» зоны лаборатории проводят 1%-м раствором хлорамина Б, 3%-м раствором перекиси водорода (время экспозиции 60 мин), 0,2%-м раствором ДП-2 (экспозиция 30 мин) или другим дезинфицирующим средством, обладающим бактерицидной активностью в отношении указанных агентов.

Режим обеззараживания аналогичных объектов в лаборатории, проводящей исследование со спорообразующими бактериями, отличается. В этом случае стол, стены, двери, оборудование и др. протирают двукратно с интервалом 30 мин 6%-м раствором перекиси водорода с 0,5 % моющего средства (экспозиция 120 мин) или двукратно с интервалом 30 мин орошают 1%-м активированным раствором хлорамина Б (экспозиция 120 мин), используя гидропульт, автомакс или распылитель типа «Квазар» (рис. 1).

Каждая серия поступающего в лабораторию дезинфицирующего средства должна проверяться на процентное содержание активного вещества. Так, содержание активного хлора (АХ) в хлорамина Б должно быть не менее 24 %. Перекись водорода медицинская может быть использована с содержанием перекиси водорода не менее 30 %.

Дезинфицирующие растворы для лабораторного использования готовит лаборант или дезинфектор под руководством врача или научного сотрудника в специально оборудованном помещении, надев халат, очки, маску, резиновые перчатки. На емкости с дезинфицирующим рабочим раствором должны быть указаны его название, концентрация и дата приготовления.

В лаборатории хранят не менее, чем недельный запас дезинфицирующих средств для непрерывного обеспечения текущей работы.

Следует отметить, что запрещено одновременное использование в пределах лаборатории перекись- и хлорсодержащих дезинфицирующих растворов, в связи с опасностью взрывоподобного характера протекания химической реакции при смешивании этих веществ.

Спецобработка помещений, оборудования и различных объектов лаборатории подразделяется на ежедневную (текущую) и периодическую (генеральную). В случае возникновения аварии, при которой создается реальная или потенциальная возможность попадания ПБА в воздух или поверхность оборудования лаборатории, обеззараживание проводится незамедлительно.

Текущую дезинфекцию рабочих поверхностей в микробиологических комнатах (боксах) проводит лаборант под контролем врача, используя соответствующий виду ПБА дезинфектант и режим обработки. После необходимой экспозиции младший персонал под наблюдением старшего делает влажную уборку помещения.

Каждую рабочую зону лаборатории обеспечивают индивидуальным промаркированным набором уборочного инвентаря, который не разрешается использовать для уборки других помещений. После каждой уборки тряпки и ветошь обрабатывают дезраствором, прополаскивают в воде и просушивают. Емкости также подвергают обработке.

Еженедельно в помещениях «заразной» зоны проводят генеральную уборку, используя дезинфицирующие средства. Протирают стены на высоту не менее 2 м, мебель, приборы, аппараты и др. Термостаты и холодильники (после очищения от наледи) один раз в месяц подвергают дезинфекционной обработке.

После влажной уборки проводят обеззараживание воздуха и поверхностей в помещениях «заразной» зоны ультрафиолетовыми лучами (УФ).

Бактерицидным действием обладает ультрафиолетовое излучение с диапазоном длин волн 205–315 нм, которое проявляется в деструктивно-модифицирующих фотохимических повреждениях ДНК клеточного ядра микроорганизма, что приводит к гибели микробной клетки в первом или последующем поколении. Однако следует учитывать, что УФ-излучение оказывает на микроорганизмы не только бактерицидное, но и мутагенное действие, приводя к появлению резистентных к данному фактору форм.

Более чувствительны к воздействию ультрафиолетового излучения бактерии в вегетативной форме и вирусы. Менее чувствительны грибы и простейшие микроорганизмы. Наибольшей устойчивостью обладают споровые формы бактерий.

Бактерицидные лампы вмонтированы в бактерицидные облучатели, которые подразделяются на открытые (потолочные, напольные или настенные), комбинированные (настенные) и закрытые. Открытые и комбинированные облучатели предназначены для обеззараживания помещения только в отсутствии людей или при кратковременном

их пребывании в помещении в защитных очках со светофильтрами. Бактерицидные облучатели устанавливают в соответствии с нормативными документами по их установке и эксплуатации.

Время УФ-облучения зависит от профиля лаборатории, габаритов помещения, типа бактерицидной установки, объекта обеззараживания (воздух, поверхность) и других показателей.

На помещение с бактерицидными облучателями заводят журнал регистрации и контроля их эксплуатации. В журнале фиксируются время горения и бактерицидная эффективность облучения.

При оценке бактерицидной эффективности ультрафиолетового облучения воздушной среды помещения или поверхностей в качестве санитарно-показательного микроорганизма принимается *Staphylococcus aureus*. Для контроля обсемененности воздуха в помещениях бактериологических и вирусологических лабораторий может быть использован седиментационный метод. В соответствии с этим методом на рабочий стол ставят две чашки Петри с 2%-м питательным агаром и открывают их на 15 минут. Посевы инкубируют при температуре 37 °С в течение 48 часов. При росте не более 4 колоний *S. aureus* на чашке, уровень микробной обсемененности воздуха считается допустимым.

Бактерицидные лампы, отработавшие гарантийный срок службы, указанный в паспорте, должны заменяться на новые. Для определения окончания срока службы могут быть использованы электрические счетчики, суммирующие общую наработку ламп в часах, или замеры радиометров, свидетельствующие о падении бактерицидного потока ниже номинального. Периодически (не реже одного раза в неделю) лампы следует очищать от пыли салфеткой, смоченной 70%-м раствором этилового спирта или дезинфицирующего средства, разрешенного к применению.

При экстремальных ситуациях для обеззараживания воздуха и поверхностей в боксированных комнатах «заразной» зоны лаборатории применяют аэрозольную дезинфекцию при условии герметизации помещения и отключении приточно-вытяжной вентиляции.

Аэрозоли представляют собой гетерогенные аэродисперсные системы с размерами частиц жидкой дисперсной фазы от 0,1 до 1000 мкм. Для аэрозольной дезинфекции выбирают системы с диаметром частиц 5–25 мкм. Распыление дезинфектанта проводят с помощью пневматической (ПВАН) или тубулирующей (ТАН) аэрозольных насадок. Источником сжатого воздуха для распыления служит компрессор производительностью не менее 300 м³/ч при рабочем давлении 3–4 атм или аэрозольный генератор. Можно пользоваться аппаратами типа «Квазар».

При аэрозольной дезинфекции наиболее приемлемы жидкие химические препараты (формальдегид, перекись водорода медицинская, Велтолен и др.). Концентрация дезинфектанта и режим обеззараживания зависит от вида ПБА, с которым велась работа в лаборатории.

Во время обеззараживания аэрозоль заполняет обрабатываемое помещение, оседает мельчайшими каплями на поверхностях стен, пола, оборудования и воздействует на обсеменяющие их микроорганизмы. Частично аэрозольные капли испаряются и в виде пара проникают в трудно доступные места.

При работе с формальдегидом после необходимой дезинфекционной экспозиции следует провести его нейтрализацию раствором аммиака.

Персонал, проводящий обработку, должен иметь кроме халата средства защиты органов дыхания, глаз и кожи (рис. 2).



Рис. 1. Опрыскиватель «Квazar».



Рис. 2. Проведение дезинфекции с помощью распылителя «Квazar».

1.3. Обеззараживание и утилизация отходов деятельности лаборатории

Все отходы деятельности лаборатории по степени эпидемиологической и токсикологической опасности подразделяются на следующие классы (СанПиН 2.1.3684-21):

- класс А (эпидемиологически безопасные отходы, по составу приближенные к ТКО) – отходы, не имеющие контакта с зараженными или условно зараженными ПБА I–IV групп патогенности (различная макулатура, упаковочный материал, негодная мебель, строительный мусор и др.);

- класс Б (эпидемиологически опасные отходы) – биологические отходы вивариев, иммуноклиник, мусор из помещений лаборатории, где не проводится работа с живыми ПБА I–IV групп патогенности, стеклянная лабораторная посуда из препараторских, стерильные отработанные ватно-марлевые материалы, бумажная макулатура из письменных комнат и др.;
- класс В (чрезвычайно опасные) – медицинские отходы из лабораторий, работающих с ПБА I–IV групп патогенности: отработанные посе́вы, остатки диагностического материала (сыворотки, сгустки крови, трупный материал и др.), вскрытые биопробные животные, остатки их корма, подстилочный материал от экспериментальных животных, пипетки, шприцы, тест-контроли работы автоклавов, ампулы из-под лиофилизированных культур, ватно-марлевый материал, макулатура из письменных комнат и другой отработанный материал, зараженный или подозрительный на зараженность бактериальными ПБА;
- класс Г – просроченные медицинские и иммунобиологические препараты (МИБП), питательные среды с истекшим сроком годности, химические реактивы, ртутьсодержащие предметы, приборы, оборудование.

К отходам деятельности лаборатории в зависимости от их класса предъявляют различные требования по обеззараживанию, сбору, временному хранению, транспортированию и утилизации.

Отходы класса А (неопасные) не требуют специального обеззараживания. Их собирают в пластиковые пакеты белого цвета, герметично закрывают и в твердых емкостях (например, баках) с крышками переносят к мусороприемнику для дальнейшего вывоза на полигон ТБО.

Отходы класса Б (опасные) подвергают обязательной дезинфекции на месте их образования в соответствии с действующими нормативными документами (СанПиН 2.1.3684-21). Обеззараженные отходы собирают в одноразовую герметичную упаковку желтого цвета. Для твердых отходов (иглы, шприцы, битая стеклянная посуда, пипетки и т. п.) используют твердую упаковку. Одноразовые емкости желтого цвета с отходами класса Б маркируют надписью «Опасные отходы – «Класс Б» с указанием названия лаборатории, кода учреждения, даты, фамилии ответственного за сбор отходов лица. Заполненные емкости помещают в влагонепроницаемые баки желтого цвета с той же маркировкой, герметично закрывают крышкой и переносят к металлическим контейнерам, которые размещены на специальной площадке хозяйственного двора учреждения (лаборатории). Дальнейшую утилизацию отходов проводят централизованно специальным автотранспортом на полигон ТБО или децентрализованно к месту кремации, если учреждение имеет крематорий для сжигания отходов.

Использованные для переноса (перевоза), временного хранения многоразовые емкости (баки, контейнеры) дезинфицируют и моют.

Отходы класса В (чрезвычайно опасные) подвергают обязательной дезинфекции на месте их образования в соответствии с действующими нормативными документами (СанПиН 3.3686-21, СанПиН 2.1.3684-21). Обеззараживание отходов проводят автоклавированием или обработкой дезрастворами. Эффективность работы автоклавов контролируют с помощью химических (каждый цикл автоклавирования) или биологических (ежемесячно) тестов. Путем автоклавирования обеззараживают жидкие и плотные питательные среды с посевами ПБА I–IV групп патогенности и без посевов; вскрытые ампулы из-под лиофилизированных культур; пробирки, флаконы, колбы с бактериальными взвесями; сыворотки; лабораторную посуду; обгоревшие ватно-марлевые пробки и другой материал, инфицированный или подозрительный на зараженность ПБА I–IV групп.

Жидкие питательные среды с посевами микроорганизмов после обеззараживания автоклавированием разводят водопроводной водой 1:2 и сбрасывают в канализацию. Рабочие растворы отработанных дезсредств после экспозиции в течение не менее 24 ч разводят водопроводной водой 1:2 и сливают в канализацию.

Лабораторные отходы класса В после обеззараживания в дезрастворах могут содержать ватные и ватно-марлевые тампоны, салфетки, вскрытые трупы мелких экспериментальных животных, трупы отловленных в природе грызунов, остатки корма и подстилочный материал из садков, где содержались лабораторные животные до и после экспериментов, шприцы, ампулы и флаконы с остатками вакцинных препаратов, сколы концов пастеровских пипеток и ампул и др.

После обеззараживания отходы класса В собирают в одноразовую упаковку красного цвета. Одноразовая упаковка может быть мягкой (пакеты) и твердой (одноразовые емкости). Каждая упаковка маркируется надписью «Чрезвычайно опасные отходы – «Класс В» с указанием названия лаборатории, кода, даты и фамилии ответственного сотрудника. Бактериальные культуры, вирусологически опасный материал, различные острые предметы, экспериментальных животных складывают в твердую герметичную упаковку, нетвердые отходы – в герметичную мягкую упаковку.

Все заполненные емкости укладывают в маркированные водонепроницаемые металлические баки (контейнеры) с плотными крышками и хранят до кремирования в специально отведенном месте в пределах лаборатории. Транспортирование отходов класса В для утилизации осуществляют только в закрытых кузовах специально применяемых для этих целей автомашинах, которые после вывоза подвергают спецобработке.

Подготовку отходов лабораторной деятельности к утилизации (сбор, упаковка, герметизация, размещение в емкости для временного хранения) осуществляет ответственное лицо из числа работников

лаборатории в СИЗ (халате, марлевой повязке, резиновых перчатках и при необходимости прорезиненном фартуке).

Отходы лаборатории класса Г (использованные люминесцентные лампы, ртутьсодержащие приборы) собирают в закрытые влагонепроницаемые емкости черного цвета с маркировкой «Отходы – «Класс Г» и хранят в специально выделенном помещении до утилизации, которая осуществляется в соответствии с действующими нормативными документами. Если во время работы повреждена целостность ртутьсодержащих приборов или термометров и ртуть вылилась, необходимо немедленно провести демеркуризацию.

Масла, минеральные (хлорводородная, азотная, серная) и сильные органические кислоты, щелочи утилизируют согласно действующим нормативным документам.

Вакцинные, диагностические и лекарственные препараты с истекшим сроком годности после обеззараживания путем автоклавирования измельчают, помещают в пакеты черного цвета и хранят до утилизации в водонепроницаемом герметически закрытом контейнере с маркировкой «Отходы – «Класс Г». В эти же контейнеры складывают ненужную картонную упаковку в мягких одноразовых маркированных пакетах черного цвета. Вывоз этих отходов на полигон ТБО осуществляют централизованно спец. автотранспортом.

2. СРЕДСТВА ЗАЩИТЫ

Основным правилом работы в режимных лабораториях является эффективная первичная изоляция персонала от ПБА, которая обеспечивается использованием одного (или более) из перечисленных средств:

- средства индивидуальной защиты (СИЗ);
- боксы биологической безопасности (БББ);
- изоляты из гибкой пленки аналогичного боксам стандарта.

Любые лабораторные манипуляции с микроорганизмами приводят к их рассеиванию в большей или меньшей степени во внешнюю среду. В связи с этим все работники микробиологических и вирусологических лабораторий вне зависимости от их устройства и оборудования должны применять средства индивидуальной защиты. Это предполагает использование той или иной спецодежды: классического противочумного костюма, пневмокостюма (типа «Антибелок»), изолирующего костюма типа КЗМ-1 с противогазом, пневмошлема, различных респираторов и т.п. В зависимости от характера выполняемой работы, степени ее опасности для персонала используют определенные типы

противочумных костюмов или их аналогов (СанПиН 3.3686-21 приложение 3). Разрабатываемые аналоги должны соответствовать типам классического противочумного костюма:

I тип – обеспечивает защиту кожных покровов рук, поверхности тела, лица, органов дыхания, органов зрения;

II тип – обеспечивает защиту кожных покровов рук, поверхности тела, лица, органов дыхания;

III тип – обеспечивает защиту кожных покровов рук, поверхности тела;

IV тип – обеспечивает защиту поверхности тела, кожных покровов рук.

Например, при работе в стационарных, полевых или передвижных лабораториях сотрудники надевают противочумные костюмы I-IV типов, изолирующие костюмы типа КЗМ-1 и другие разрешенные к применению защитные средства (рис. 3, 4). В стационарных максимально изолированных лабораториях при работе с ПБА I-II групп патогенности персонал использует пневмокостюмы типа «Антибелок-5», пневмосистемы (типа ЛИЗ) или их аналоги (рис. 5-7). При экстремальных ситуациях (например, авариях) работники применяют аварийный комплект защитной одежды типа Л-1, «Корунд» или их аналоги с фильтрующим противогазом (рис. 3, 8).



Рис. 3. Костюм изолирующий с автономным обеспечением подачи воздуха.



Рис. 4. Одноразовый костюм «Тайкем».



Рис. 5. Защитный костюм «Кварц».



Рис. 6. Комбинезон защитный и панорамная полумаска со сменными фильтрами.



Рис. 7. Защитный колпак с принудительной подачей воздуха.



Рис. 8. Защитный костюм «Л-1».

Существуют 4 основных типа классических противочумных костюмов, различающихся по целевому назначению:

I тип включает: большую противочумную косынку (120 × 120 × 150 см) или капюшон (шлем); противочумный халат (по типу хирургического, длиной до нижней трети голени, полы должны заходить друг за друга не менее чем на 15 см, у ворота длинные завязки или плотно прилегающие манжеты); одноразовые медицинские перчатки с удлиненными манжетами (хирургические), устойчивые к действию агрессивных химических веществ (дезинфектантов), при необходимости – с защитой от проколов и порезов; сапоги резиновые (или высокие водонепроницаемые бахилы); полотенце; для защиты органов дыхания и органов зрения используют: ватно-марлевую маску (из марли 125 × 50 см со слоем ваты 25 × 17 × 1,5 см весом 20 г), противоаэрозольный (противопылевой) респиратор (фильтрующую полумаску) класса защиты FFP 3 или изолирующую полумаску с противоаэрозольным или комбинированным фильтром класса защиты P3 (по противоярозольному компоненту) в комплексе с защитными очками с непрямой вентиляцией; изолирующую полнолицевую маску или противогаз с противоаэрозольным или комбинированным фильтром(ами) класса защиты P3 по противоярозольному компоненту; шлем, капюшон с системой принудительной подачи очищенного воздуха, снабженной противоаэрозольным или комбинированным фильтром класса защиты P3 по противоярозольному компоненту.

При вскрытии трупов людей или крупных животных дополнительно надевают водонепроницаемые фартук, нарукавники и вторую пару перчаток или перчатки с защитой от проколов и порезов.

II тип – большая косынка (капюшон), противочумный халат, респиратор или иное СИЗОД, одноразовые медицинские перчатки с удлиненными манжетами (хирургические), сапоги (или водонепроницаемые бахилы), полотенце. Отличается от костюма I типа отсутствием защиты органов зрения.

III тип – большая косынка (капюшон), противочумный халат, респиратор, одноразовые медицинские перчатки с удлиненными манжетами (хирургические), защитная обувь (глубокие галоши, сапоги или высокие водонепроницаемые бахилы), полотенце. Отличается от костюма I типа отсутствием защиты органов зрения и дыхания. При транспортировании инфицированного материала в автоклав костюм дополняют водонепроницаемым фартуком.

IV тип – шапочка (малая косынка), противочумный (хирургический) халат, медицинские перчатки.

Разработан порядок надевания и снятия противочумного костюма. При использовании аналогов противочумных костюмов, в том числе и одноразовых, порядок надевания и снятия определяется локальными актами организации.

К работе в пневмокостюмах допускаются только лица, не имеющие медицинских противопоказаний к ношению этого типа защитной одежды, прошедшие специальное обучение, инструктаж по правилам работы и сдавшие зачет. На централизованном специальном участке перед использованием пневмокостюм проверяют на целостность, а комплектные к ним фильтры ТОВ (В-0,4) – на оценку коэффициента проскока и фиксируют результаты в специальном журнале. Сотрудник лаборатории получает пневмокостюм под личную роспись и визуально проверяет его на целостность перед непосредственной работой. В соответствующих инструкциях регламентируется порядок надевания-снятия пневмокостюмов и правила работы в них.

После использования пневмокостюмы обрабатывают в дезинфицирующем душе, в парагазовых передаточных камерах и затем проверяют на целостность.

Для защиты органов дыхания надевают различные респираторы. Респираторы-капюшоны положительного давления представляют собой легкий капюшон из прозрачного материала, покрывающий голову, шею и плечи. Подача воздуха осуществляется из переносных баллонов со сжатым воздухом (запас воздуха на 15–20 мин) или через шланги, связанные с небольшим компрессором с ВД-фильтрами, который питается от батарей. Продолжительность их работы (6–7 ч) зависит от качества фильтров.

Маска-респиратор закрывает большую часть лица, обеспечивая надежную защиту глаз и дыхательных путей. Маска может иметь одновременно биологический фильтр системы ВД и химический патрон. Наличие химического патрона не обязательно, если респиратор применяется при биологической защите. Маска-респиратор должна плотно прилегать к лицу, чтобы обеспечить необходимую герметичность. При слабом натяжении крепящих маску лент вдыхаемый воздух минует фильтрующие элементы и снижает защитную способность маски. В помещениях, где содержание кислорода не соответствует нормативам, не разрешается применять респираторы с химическим патроном.

Полумаска-респиратор не защищает глаза, прикрывая только рот и нос. Блок с фильтрами системы ВД, размещенный сбоку маски, обеспечивает лучшую видимость, чем в случае его расположения впереди.

Наличие химического фильтра-патрона в полумаске-респираторе необязательно, если нет угрозы применения ОВ.

При необходимости защитить глаза можно использовать «очки-консервы», которые должны плотно прилегать к коже в области глаз.

Если нет опасности воздушной микробной инфекции для защиты глаз от химических веществ (в виде брызг) можно рекомендовать специальные козырьки (щитки). Козырьки должны полностью закрывать лицо и при необходимости легко откидываться назад.

Большинство лабораторных манипуляций, когда смешивают, встряхивают, измельчают или центрифугируют инфицированный материал, сопровождается образованием случайных аэрозолей. Бактериологическая петля при неправильном или невнимательном обращении, работа с пипеткой также создают целый ряд возможностей образования аэрозолей. Использование современных защитных боксов при работе с инфицированными материалами обеспечит удержание и контролируемое удаление из рабочей зоны образовавшихся аэрозолей. Выбор конструкции защитного бокса определяется степенью опасности ПБА, с которым предстоит работать.

Бокс микробиологической безопасности (БМБ) – вентилируемое ограниченное пространство, предназначенное для обеспечения защиты оператора и окружающей среды от аэрозолей, возникающих вследствие работ с потенциально опасными и опасными микроорганизмами, с помощью удаления воздуха в атмосферу путем фильтрации.

Каждый бокс должен быть сконструирован таким образом, чтобы воздух, удаляемый из бокса, был очищен высокоэффективными воздушными фильтрами типа HEPA/ULPA класса не ниже H14.

Различают боксы с частичным удержанием микроорганизмов (боксы I и II классов) и с полным их удержанием или изолирующие боксы (III класса).

Эффективность БББ контролируется проверкой работы фильтров, определением скорости потока воздуха, надежности общей изоляции и других инженерно-технических характеристик.

БББ I класса – это открытая спереди рабочая камера с принудительным удалением через ВД-систему отработанного воздуха. Удаляемый воздух очищается от частиц аэрозоля в предфильтре и в специальном фильтре тонкой очистки (ФТО) и выводится в центральную вытяжную систему лаборатории. Скорость движения воздуха в проеме передней панели бокса должна составлять 0,5–1,0 м/с, а высота проема \approx 20 см. Снижение или повышение скорости движения воздуха в проеме недопустимо (рис. 9).

Схема воздушных потоков БББ I

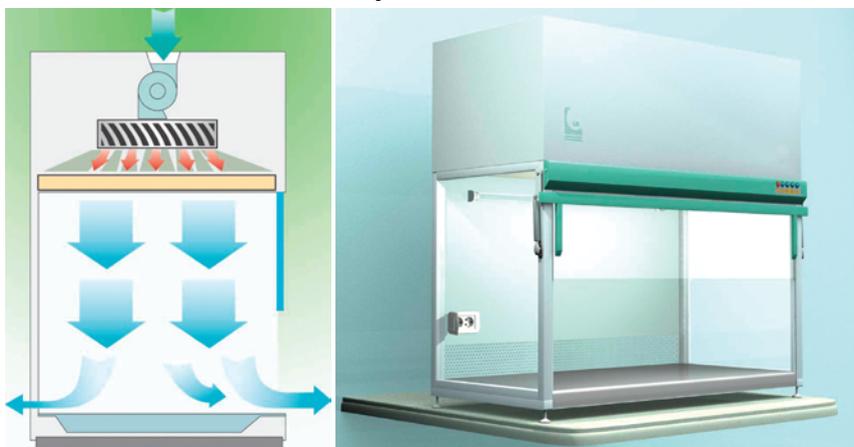


Рис. 9. Бокс биологической безопасности I класса.

Боксы I класса предназначены для работы с агентами низкой (микроорганизмы, которые обычно не вызывают заболеваний человека или животных) или умеренной (микроорганизмы, которые могут вызывать не представляющее серьезной опасности заболевание человека или животного и риск распространения инфекции невысок) степени риска, согласно классификации ВОЗ.

Боксы II класса (рис. 10) представляют собой защитные конструкции также с проемом в передней панели для рук работающего. В этих боксах создается нисходящий вертикальный ламинарный воздушный поток благодаря рециркуляции части засасываемого в бокс воздуха. Рециркулируемый и выводимый из бокса воздух очищается в высокоэффективных аэрозольных фильтрах.

Разработано два типа БББ II класса: тип А и тип Б. В боксах типа А минимальная скорость поступающего воздуха через рабочий проем высотой 20 см составляет 0,4 м/с. Скорость вертикального нисходящего потока воздуха внутри камеры такая же. Конструкция обеспечивает рециркуляцию около 70 % всего воздуха. В боксах типа Б воздух поступает внутрь устройства через изменяемый по вертикали рабочий проем со скоростью 0,5 м/с, а средняя вертикальная скорость нисходящего потока воздуха внутри камеры равна 0,25 м/с. Эта конструкция обеспечивает удаление около 70 % всего воздуха, протекающего через рабочую зону, и является предпочтительней конструкции типа А, поскольку исключает накопление в высоких концентрациях опасных

и токсичных агентов при работе с ними. Эффективная работа защитных боксов II класса достигается только при хорошо сформированном и тщательно поддерживаемом ламинарном потоке воздуха.

Схема воздушных потоков БББ II



Рис. 10. Бокс биологической безопасности класс II.

Все манипуляции в боксах проводятся ближе к задней стенке камеры на специальных поддонах с салфетками, смоченными дезинфицирующим раствором.

Поскольку не исключается загрязнение рук экспериментатора, необходимо использовать резиновые перчатки, которые после снятия оставляют в боксе. После окончания работы все извлекаемые из боксов предметы и материалы подвергают предварительному обеззараживанию непосредственно в боксах протиранием или погружением в соответствующие дезинфицирующие растворы и заключительной дезинфекции вне боксов.

Защитные боксы II класса используют для работ с микроорганизмами низкой категории риска, если лабораторные манипуляции сопровождаются массовым образованием аэрозолей или агентами с высоким уровнем риска для индивида и низким – для общества.

В боксах ББ II Б класса проводят диагностические исследования, связанные с изоляцией вирусов и риккетсий II группы патогенности. Если в помещении блока для работы с животными отсутствует приточно-вытяжная вентиляция или фильтры тонкой очистки на выходе вытяжной вентиляции, разрешается проводить работу с инфи-

цированными (кроме вирусов I группы патогенности) животными в боксах ББ II (А, Б) класса, а исследование на чуму – в боксах ББ II Б или III класса.

Защитные боксы III класса – полностью изолированная воздухопроницаемая камера, внутри которой создается пониженное давление (на 0,1–0,24 кПа ниже окружающего), что обеспечивает надежный барьер между инфицированным материалом и экспериментатором (рис. 11). Резиновые перчатки плечевого типа герметично заделаны в передней, а иногда и задней (при боксах двустороннего типа) панелях камеры. Засасываемый в бокс и выводимый из него вентилятором воздух очищается в предфильтре и в двух последовательно установленных высокоэффективных фильтрах. Жидкие отходы из бокса собирают в специальную емкость и подвергают термической обработке.

Схема воздушных потоков БББ III

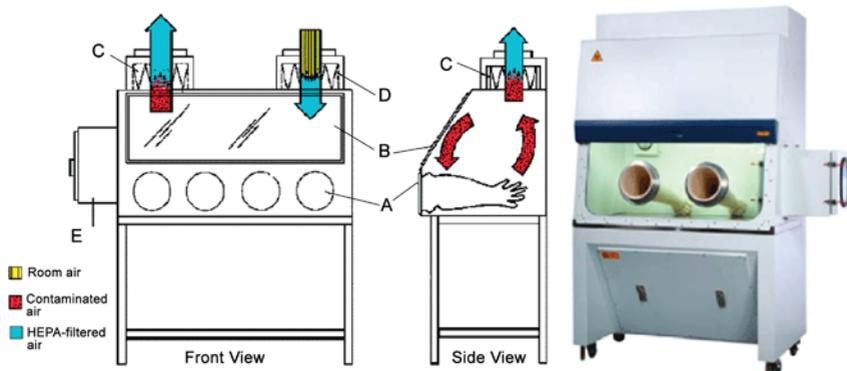


Рис. 11. Бокс биологической безопасности класс III.

Для проведения специальных исследований боксы III класса можно объединять в защитные технологические линии. Эти линии оснащают изолированными от окружающей среды и друг от друга инкубаторами, центрифугами, измельчителями, гомогенизаторами, рефрижераторами и другим оборудованием и приборами. Возможно изолированное содержание подопытных животных. Соединение отдельных элементов в линии осуществляется с помощью камер-шлюзов.

Камеры-шлюзы могут быть оформлены в виде автоклавов проходного типа. Места ввода коммуникаций и соединения боксов между собой герметизируют, чтобы исключить возможность утечки аэрозолей, как при работающих вентиляторах, так и в случае их неисправности или перерыва в подаче электроэнергии.

Перед началом работы в боксе включают вентиляцию, проверяют наличие отрицательного давления по шкале боксового манометра, наличие запаса дезинфицирующих средств и загружают материал. Все виды работ с ПБА проводят по принципу парности (не менее двух человек, один из которых врач или научный сотрудник).

Время непрерывной работы ограничивают четырьмя часами, после которых устанавливают 30–60-минутный перерыв.

Защитные боксы III класса предназначены для работы с ПБА любого уровня опасности, являясь в этом отношении универсальными для всех современных микробиологических и вирусологических лабораторий.

Максимально изолированные лаборатории, в которых работают с вирусами I группы патогенности, оборудуют боксами биологической защиты III класса. В них проводят исследование материала от больных людей с подозрением на особо опасное инфекционное заболевание, заражение культур ткани, членистоногих (на биомембране), биопробных животных (материалом из объектов окружающей среды, диких грызунов и членистоногих), заражение и вскрытие куриных эмбрионов, постановку серологических реакций с необеззараженными пробами. Исследование материала от больных с неясной этиологией, когда невозможно исключить наличие вирусов I группы патогенности, также проводят в БББ III класса.

В БББ III класса или отдельных боксированных помещениях проводят все манипуляции, связанные с высоким риском образования аэрозоля: центрифугирование, гомогенизация, измельчение, интенсивное встряхивание, обработка ультразвуком, вскрытие объектов с зараженным материалом, работа с большими объемами и высокой концентрацией ПБА и др.

Микологические лаборатории также оборудуют БББ III класса, поскольку отдельные манипуляции при работе с возбудителями глубоких микозов требуют максимальной изоляции. Так, все манипуляции с культурами мицелиальной фазы, изучение выживаемости грибов во всех фазах проводят в БББ III класса. Не разрешается открывать пробирки и матрацы с посевами мицелиальной фазы грибов вне боксов ББ.

При работе в БББ III класса сотрудники надевают противочумный костюм IV типа, дополненный резиновыми перчатками.

Изоляторы отрицательного давления из мягкой пленки представляют собой в основном бокс биологической безопасности III класса. Эта конструкция выполнена в виде мешка из мягкой пленки, смонтированного и укрепленного на металлической раме. В переднюю стенку изолятора герметично заделаны резиновые перчатки плечевого типа. Ввиду недостаточной прочности его использование ограничено. Только хорошо обученный и опытный персонал может быть допущен к работе с этим оборудованием.

3. МЕТОДИЧЕСКИЕ ПРИЕМЫ И ОСОБЕННОСТИ РАБОТЫ С ВОЗБУДИТЕЛЯМИ I–II ГРУПП ПАТОГЕННОСТИ

3.1. Организация рабочих мест и особенности методических приемов при посеве инфицированного материала

Безопасность работ с возбудителями особо опасных инфекций обеспечивается строгим соблюдением правил работы, требованием к лабораторным помещениям и их оснащению (см. выше), обучением и тренировкой персонала, а также диспансерным наблюдением за состоянием здоровья сотрудников. К работе с ПБА допускаются лица не моложе 18 лет с высшим и средним медицинским, биологическим, ветеринарным образованием, которые окончили соответствующие курсы специализации и не имеют противопоказаний к лечению специфическими препаратами и к работе в СИЗ. Сотрудников лаборатории, работающих с ПБА (кроме возбудителя холеры) и посещающих помещения «заразной» зоны, где ведутся исследования с заразным материалом, вакцинируют, предварительно проведя оценку уровня иммунитета одним из стандартных методов до и после вакцинации (ревакцинации). В исключительных случаях (наличие эффективных специфических средств лечения) к работе допускают лиц, имеющих медицинские противопоказания. Сотрудник лаборатории обязан немедленно сообщать руководителю подразделения о появлении симптомов заболевания, вызываемого возбудителем, с которым проводились исследования. В этом случае руководитель учреждения решает вопрос о необходимости изоляции и проведении специфического лечения.

Микробиологические лаборатории в зависимости от их назначения имеют тот или иной набор помещений: боксы с предбокскими, комнаты для проведения серологических исследований и люминесцентной микроскопии, помещение для ПЦР-диагностики и др.

Боксы с предбоксами, где проводятся манипуляции с ПБА, должны быть достаточно просторны, оснащены только необходимыми лабораторной мебелью и приборами. У входной двери помещают смоченный дезинфицирующим раствором коврик. Входную дверь бокса, оборудование, используемое для хранения, культивирования и транспортирования ПБА, обозначают знаком «Биологическая опасность» (допускается использование международного знака «Биологическая опасность» красного или красно-оранжевого цвета на желтом фоне).

В предбоксах, оснащенных водопроводом и раковиной для мытья рук, желательно с краном ножного управления, персонал надевает

и снимает СИЗ. На случай аварии в предбоксах предусмотрены емкости с дезинфицирующим средством и гидропульт.

Оснащение бокса должно способствовать предупреждению контакта исследователя с инфицированным материалом. Оборудование (в том числе лабораторные столы) изготавливается из материалов, непроницаемых для жидкостей, устойчивых к коррозии и действию дезинфицирующих средств.

Некоторые виды лабораторной работы и использование того или иного оборудования могут создавать опасность заражения бактериолога. Обычная проволочная бактериологическая петля, являясь традиционным лабораторным инструментом, при неправильном и невнимательном использовании приводит к образованию аэрозоля. При быстром прожигании петли с жидким инфицированным материалом происходит его вскипание, пленка лопается и образуется бактериальный аэрозоль. Для предотвращения этого явления предложены газовые и электрические приспособления для прожигания петли в экранированном пространстве. Безопасной альтернативой является применение пластиковых петель одноразового использования.

Предотвратить образование аэрозолей при обжиге бактериологической петли может применение правильной техники обеззараживания. Петлю подносят к пламени горелки так, чтобы между ней и оператором находилось пламя горелки. Осторожно нагревают сначала иглодержатель, затем саму петлю в нижней части пламени (где наиболее низкая температура) и постепенно переводят петлю в верхнюю часть пламени спиртовки. Таким образом, петлю прокаливают докрасна 2–3 раза.

Образованию аэрозолей при работе с бактериологической петлей способствует оставленное незамкнутым при изготовлении проволочное кольцо петли. Стандартная бактериологическая петля имеет диаметр замкнутого кольца 3 мм и, так называемый, хвостик, не превышающий 6 см.

Аварийная ситуация возникает, когда экспериментатор неправильно (без предварительного осторожного подсушивания) обжигает петлю с остатком агаровой бактериальной культуры: материал может обуглиться, отскочить от петли и упасть на стол. В этом случае необходимо прекратить работу, осмотреть поверхность стола, найти упавший комочек и убрать его с помощью пинцета и ватного тампона, смоченного в дезинфицирующем растворе, т. к. внутри комочка микроорганизмы остаются жизнеспособными. На место падения патогена накладывают тампон, смоченный дезсредством на 1 час, а находящиеся на столе предметы обрабатывают дезинфицирующим раствором. Ватные тампоны, бывшие в употреблении, опускают в емкость для отходов с дезраствором.

Не исключается образование бактериальных аэрозолей при посевах жидкой культуры и отборе с чашек Петри колоний микроорганизмов, если пользоваться неостывшей петлей. Во избежание этого достаточно работать одновременно двумя бактериологическими петлями, одна из которых остывает после прожигания, или применять одноразовый инструмент. Не рекомендуется остужать петлю о поверхность плотного агара с посевом во избежание разбрызгивания или гибели патогена, а также возможности его загрязнения посторонней микрофлорой, не заметной невооруженным глазом. Остудить петлю можно прикосновением ее к внутренней поверхности крышки чашки Петри.

Образование бактериальных аэрозолей возможно также при изготовлении мазков на предметных стеклах, постановке ориентировочной реакции агглютинации на стекле, смывах бактериальной культуры с поверхности агара, пипетировании инфицированного материала и других манипуляций наиболее часто применяемых в практике бактериологических исследований.

До начала работы с материалом, зараженным или подозрительным на зараженность возбудителями I–II групп патогенности, следует подготовить все необходимое.

На лабораторном столе справа от центра (условно «заразная» зона) размещают: фиксатор для мазков (банка с притертой или плотно закрывающейся крышкой с фиксирующей жидкостью), емкости с дезинфицирующими растворами для погружения отработанных предметных стекол, инфицированных отбросов, обработки рук, большой стерилизатор или высокий стеклянный цилиндр в металлическом корпусе для погружения использованных пипеток; от центра слева (условно «чистая» зона) помещают банки с предметными стеклами в 96° спирте, тампоны ватные стерильные и нестерильные в банке, чашки Петри с ватными тампонами, смоченными 70° спиртом (для текущей дезинфекции),



Рис. 12. Оборудование лабораторного стола.

бактериологические петли и иглы, пастеровские и градуированные пипетки, пинцет анатомический и скальпель, карандаш (ручка) по стеклу, спички. Все предметы на лабораторном столе расставляют таким образом, чтобы исключить перекрещивание рук в процессе работы и тем самым обеспечить удобство и безопасность манипуляций (рис. 12).

В центре стола на расстоянии не менее 30 см от края со стороны оператора размещают спиртовку на устойчивой подставке или горелку. Между работающим и спиртовкой на расстоянии не менее 10 см от края стола должна находиться широкая низкая кювета с дезинфицирующим раствором, над которой проводят все манипуляции с жидким материалом.

При работе с агаровой культурой и постановке некоторых лабораторных тестов вместо кюветы используют многослойные марлевые салфетки, смоченные дезинфицирующим средством.

Около бактериологического стола устанавливают бак с педалью или ведро для сбора незаразных отходов. Все емкости, используемые в работе, маркируют.

На специальном столике организуют покраску мазков.

В зависимости от целей и задач исследования врач (научный сотрудник) и лаборант заранее готовят все необходимое. Для проведения посевов отбирают и тщательно осматривают лабораторную посуду, поскольку незамеченный дефект может стать причиной инфицирования посуды, рук, окружающих предметов. Каждую бактериологическую пробирку осторожно простукивают о твердую поверхность, чтобы исключить невидимые трещины. Пробирки выбраковывают, если в стекле видны трещины, царапины, пузырьки воздуха. Колбы и флаконы также подлежат осмотру. Не используют сосуды со сколом в области горлышка. Тщательно осматривают посуду со средами. Если крышка чашки Петри с плотной средой запотела, ее заменяют на новую, взяв со стерильной чашки. Визуально просматривают все среды на наличие посторонней микрофлоры. Пробирки со средами предварительно проверяют на целостность и размещают в штативы. Пробирки должны входить в штативы без усилий. Рекомендуют на дно штатива класть фильтровальную бумагу, что позволит быстро обнаружить нарушение целостности пробирки при неосторожной работе. Если пробирки помещают в банку или стакан, то обязательно дно емкости выстилают слоем ваты или марли. Можно взять кружочек поролона. Все объекты, используемые для посева, маркируют: указывают название микроорганизма (материала), номер штамма (анализа), дату (при необходимости время) проведения работы. В отдельных случаях указывают особенности штамма (антибиотикоустойчивость, вирулентность и др.). Надписи делают таким образом, чтобы они не мешали в работе: на пробирках – в средней части, флаконах и колбах – ниже горлышка, на чашках Петри – на донышке чашки по краю. Надписи должны быть четкими.

Необходимые для работы объекты с незаразным материалом (физиологический раствор, дистиллированная вода, бакпрепараты, реактивы) также маркируют. Если посуда с питательными средами подписана,

но еще не засеяна и остается на лабораторном столе на какой-то срок, необходимо положить записку: «Подписано, но не засеяно».

Перед работой поверхность лабораторного стола протирают ватным тампоном, смоченным 70^о спиртом. С левой стороны стола, отступая от края, помещают среды и исследуемый материал. При необходимости засеять большое количество объектов на стол ставят не все сразу.

Техника посева зависит от характера высеваемого материала, консистенции питательной среды и цели исследования. Жидкий материал берут петлей или пипеткой. Пипеткой пользуются в том случае, когда материал засевают в большом количестве или точно отмеряемом объеме.

При посеве жидкого материала в жидкие среды обжигают петлю, большим, указательным и средним пальцами левой руки берут пробирку с исследуемым содержимым ниже горлышка так, чтобы рука была сверху, но не мешала наблюдению за движением петли. Пробирку подносят к пламени спиртовки. Безымянным пальцем и мизинцем правой руки захватывают пробку и, прижимая ее к ладони, вынимают. После забора материала горлышко пробирки обжигают, пробкуют и возвращают на прежнее место. Применяя такую же технику, проводят посев в пробирку материала, находящегося на петле. Аналогичным образом засевают флаконы и колбы.

Все манипуляции с заразным материалом проводят у пламени горелки строго над кюветой с дезинфектантом. При посеве в жидкие среды пробирку слегка наклоняют так, чтобы избежать выливания жидкости.

Во время работы бактериологическая петля должна постоянно находиться под визуальным наблюдением, чтобы исключить инфицирование верхней внутренней части пробирки или каких-либо предметов. Желательно оставлять остаток посевного материала прикосновением петли к внутренней стенке пробирки, флакона или колбы ближе к поверхности жидкости. При посеве агаровой культуры в жидкие среды необходимо тщательно растирать комочек посевного материала о внутреннюю стенку пробирки (флакона, колбы), постепенно смывая петлей микробную массу.

В случае инфицирования внутренней верхней части пробирки (флакона, колбы) перед пробкованием необходимо обжечь (прокалить) горлышко посуды, остудить и запробковать. Если пробка при этом обгорит, ее следует заменить на новую стерильную. При малейшем подозрении на прикосновение петли с заразным материалом к наружной поверхности посуды ее обеззараживают, погружая в дезинфицирующий раствор.

При посеве исследуемого материала на пластинчатый агар чашку Петри держат в левой руке таким образом, что дно ее лежит на ладони, а крышка слегка приподнята большим, указательным и средним пальцами (рис. 13). Крышку открывают с таким расчетом, чтобы мож-

но было, не задевая края чашки и внутреннюю поверхность крышки, произвести посев петлей, пипеткой или шпателем. Таким образом, все манипуляции проводят под защитой крышки. Засеянную бактериологической петлей или шпателем чашку сразу переворачивают крышкой вниз и ставят на стол.

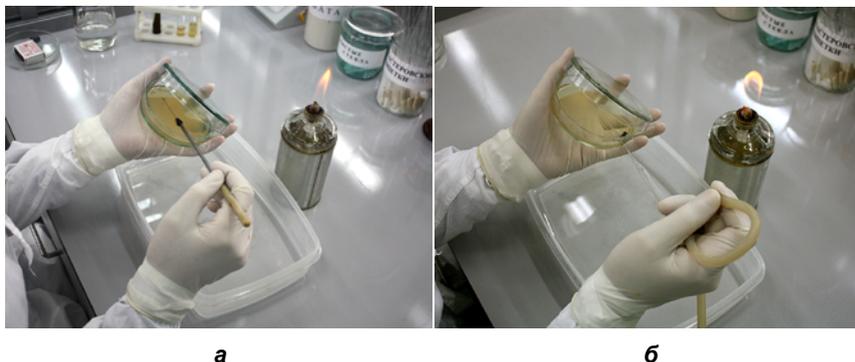


Рис. 13. Посев заразного материала на пластинчатый агар бактериологической петлей (а) и пастеровской пипеткой (б).

3.2. Пипетирование заразного материала

При посеве бактериальной взвеси, титровании сывороток и проведении других исследований пользуются различными пипетками. Работа с пипеткой, как упоминалось выше, создает целый ряд возможностей образования бактериальных аэрозолей. В ряде случаев бактериолог может заразиться в результате ранения острыми краями или концами разбитой инфицированной пипетки. Вместе с тем, строгое соблюдение технических приемов при проведении лабораторных исследований с помощью пипеток предупреждает или сводит до минимума наиболее распространенные аварийные ситуации. Основное правило при пипетировании – пользоваться специальными устройствами даже при работе с незаразным материалом (розлив физиологического раствора, титрование диагностических сывороток и др.).

Для работы с пипетками разработано и введено в практику много специальных приспособлений. Однако наибольшее распространение получил резиновый баллон герметично соединенный с резиновым шлангом, состоящим из трех отрезков (два по 80–90 см и один 30–40 см). Резиновые трубки соединены между собой двумя так называемыми контролками из пастеровского стекла (4–5 см) рыхло заполненными серой ватой. Они способны задержать исследуемый материал при случайном

его засасывании дальше пипетки. В просвет третьего отрезка шланга в 7–15 см от его конца вставлен хорошо опаянный равномерно круглый стеклянный шарик. Его диаметр строго соответствует просвету резиновой трубки. Для удобства работы баллон можно, но необязательно, поместить в деревянную оправу в виде ножной педали. Вместо резиновой груши рекомендуют брать помпу для надувания резиновых изделий.

При пипетировании применяют различную лабораторную посуду, в том числе пипетки: стеклянные градуированные и неградуированные, одноразового использования, пастеровские, изготовленные в лабораторных условиях из стеклянных трубок (дрота) различного диаметра. Для особо точной мерной работы необходимы градуированные пипетки с указанием ГОСТа.

Пипетки должны быть абсолютно чистыми и хорошо обезжиренными. На стекле плохо обезжиренной пипетки при выливании содержимого остается большое количество капель, вследствие чего слитый объем жидкости не будет соответствовать тому количеству, которое указано на шкале деления.

Перед стерилизацией верхнее отверстие пипетки, которое должно быть равномерно оплавлено и не иметь сколов, рыхло заполняют ватой на 10–15 мм. Это необходимо, чтобы задержать заразный материал при случайном засасывании его до конца пипетки. Пипетки упаковывают в специальные металлические пеналы или заворачивают в бумагу индивидуально или по 5–10 штук, делая пометку на пакетах о расположении верхней части пипеток, и стерилизуют.

Необходимую для работы лабораторную посуду тщательно просматривают (см. выше), маркируют и расставляют на столе слева. Слева помещают пипетки, разводящую жидкость, исследуемый материал и др. Правая часть стола остается свободной. До работы открывают стерилизатор с дезинфектантом.

Для того чтобы начать пипетирование необходимо нажатием ногой на баллон выпустить из него часть воздуха. При этом одновременно большим и указательным пальцами правой руки сдавливают стенку резинового шланга у бусинки и в образовавшийся просвет воздух выходит из груши. После этого убирают ногу с резинового баллона. На пипетку надевают конец шланга и располагают ее между средним и безымянным пальцами правой руки. Между большим и указательным пальцами находится шланг с бусинкой, при этом мизинец и безымянный пальцы остаются свободными.левой рукой берут пробирку с жидким содержимым (исследуемый материал, сыворотка и др.), мизинцем и безымянным пальцами правой руки распробковывают ее у пламени горелки. Конец пипетки опускают в жидкость и слегка нажимают большим и указатель-

ным пальцами на бусинку. В образовавшееся пространство поступает воздух, увлекая за собой материал. После того, как достаточное количество жидкости набрано, шланг над бусиной опускают, и она закрывает просвет трубки. Воздух в нее больше не поступает, а жидкость в пипетке удерживается на нужном уровне. Осторожно, не касаясь внутренней стенки пробирки, вынимают пипетку и, после обжигания горлышка пробирки и последующего пробкования, ставят ее в штатив, далее берут ту пробирку, в которую переносят исследуемый материал. Осторожно, не касаясь стенок пробирки, вводят в нее пипетку. Кончик пипетки опускают ниже уровня жидкости в пробирке и начинают осторожно выпускать содержимое пипетки. Можно сливать материал по внутренней стенке сосуда, надавливая ногой на резиновый баллон и одновременно расслабляя резиновый шланг у бусины. В результате давления на баллон воздух из него поступает в шланг и через щель над бусиной в пипетку, выдавливая из нее жидкость. После посева одновременно убирают ногу с баллона и отпускают бусину. Осторожно вынимают пипетку, обжигают, пробкуют пробирку и возвращают ее в штатив. После этого конец пипетки опускают в дезинфектант, находящийся в стерилизаторе, выпускают содержимое и полностью заполняют внутренний канал пипетки дезинфицирующим раствором, избегая образования пузырьков воздуха. Затем осторожно двумя руками снимают шланг пипетирующего устройства и легким движением руки затапливают пипетку.

Аналогичным образом засевают флаконы и колбы.

При посеве исследуемого материала с помощью пипетки на пластинчатый агар применяют метод раскатывания или рассева шпателем. После внесения материала чашку Петри, не переворачивая, необходимо поставить на салфетку, смоченную дезраствором, и погрузить пипетку в дезинфектант. Только после этого, держа чашку двумя руками, инокулированный материал осторожно раскатывают по поверхности среды до полного впитывания или распределяют его стерильным шпателем. Стерилизацию шпателя можно провести непосредственно перед рассевом. Шпатель помещают в стакан со спиртом и обжигают его перед непосредственной манипуляцией.

Очевидно, что технически сложно проводить посев пипеткой в пробирки, флаконы, колбы, поскольку в правой руке необходимо держать пипетку и пробку и одновременно работать левой.

Работа в паре более безопасна и удобна. Врач, проводящий пипетирование, садится справа, а помощник, распробковывающий пробирки, флаконы, колбы, распределяющий материал по агару, слева.

При работе с пипеткой надо внимательно следить за тем, чтобы зараженный конец пипетки не пачкал горлышко посуды, чтобы с пипетки не падали

капли заразного материала на стол и окружающие предметы. Необходимо, чтобы правая рука бактериолога всегда находилась в фиксированном неподвижном положении, а конец пипетки – над центром кюветы с дезраствором. Категорически запрещается подносить пипетку с инфицированным материалом к огню или проводить ее через пламя горелки.

В процессе пипетирования не допускаются резкие движения, чрезмерное оттягивание стенки шланга над бусиной, сильное нажатие ногой на баллон.

После окончания пипетирования конец шланга, в который вставлялась пипетка, протирают 70^о спиртом, дезинфектантом или обрабатывают обжиганием после опускания в 96^о спирт. Периодически всю систему обеззараживают кипячением.

Для работы ножным пипетирующим устройством необходим определенный навык, который обычно приобретается быстро.

3.3. Микроскопические методы исследования

При микробиологической диагностике бактериальных инфекций используют различные методы, в том числе бактериоскопический. Он основан на изучении морфологических признаков возбудителя, тинкториальных свойств, особенностей локализации в тканях и клетках пораженного макроорганизма. Использование специальных методов окраски позволяет выявить некоторые морфологические структуры микроба (наличие спор, включений, капсул, жгутиков и др.).

В микробиологических лабораториях применяют как обычные методы оптической микроскопии окрашенных препаратов, так и специальные: в темном поле зрения, фазово-контрастный, люминесцентный и электронный. Темнопольная микроскопия применяется для обнаружения в неокрашенных препаратах (раздавленная или висячая капли) возбудителей сифилиса, возвратного тифа, лептоспироза и других болезней, а также для изучения подвижности микроорганизмов (например, холерного вибриона).

3.3.1. Приготовление мазков для окрашивания

Приготовление мазков осуществляют на заранее подготовленном рабочем месте. На лабораторном столе должны находиться только материалы и предметы, необходимые для данного исследования: изучаемый объект, пробирка с физиологическим раствором, бактериологическая петля, пастеровские пипетки, анатомический пинцет, банка с чистыми обезжиренными стеклами, простой карандаш, спиртовка, чашка Петри, салфетка, емкость с дезинфектантом, кювета с дезраствором, на которую устанавливают специальный мостик для размещения предметных стекол (рис. 14).



Рис. 14. Оборудование лабораторного стола для приготовления мазков.

Отдельно оборудуют место для окраски мазков.

Мазки для микроскопии готовят из культур микробов, выращенных в жидкой питательной среде или на агаре, различного клинического материала (кровь, мокрота, гной, моча, смывы из зева и носа и др.), органов трупа (животного, человека) и др.

На поверхность лабораторного стола расстилают марлевую салфетку, смоченную дезинфицирующим раствором. На салфетку помещают крышку от чашки Петри, на которую кладут предметное стекло. Предметное стекло или несколько стекол можно разместить на мостике. Предварительно на зашлифованном крае стекла простым карандашом делают необходимую маркировку (вид исследуемого материала, номер анализа, дату и др.).

Объекты, из которых предполагают делать мазки, располагают слева от спиртовки.

Техника приготовления препаратов определяется физическими свойствами исследуемого материала. Жидкий материал наносят в центр предметного стекла бактериологической петлей и плавными круговыми движениями распределяют по поверхности в виде кружка диаметром 8–10 мм. Нельзя допускать резких прерывистых движений, которые приводят к разбрызгиванию заразного материала и образованию аэрозоля. Если мазок делают из агаровой культуры, то сначала на предметное стекло бактериологической петлей или пастеровской пипеткой наносят каплю или несколько капель (если на одном стекле делают несколько мазков) физиологического раствора. Затем бактериологической петлей, слегка прикоснувшись к посеву, забирают небольшое количество агаровой культуры и тщательно растирают ее в капле жидкости. Необходимо следить за тем, чтобы заразный материал не располагался близко к краям предметного стекла.

Мазок из крови готовят следующим образом. Чистое обезжиренное предметное стекло размещают в чашке Петри на двух спичках, которые служат мостиком и облегчают перенос готового препарата в фиксирующую жидкость. Бортики чашки ограничивают движение стекла с заразным материалом в процессе приготовления мазка. Исследуемую кровь наносят бактериологической петлей или пастеровской пипеткой у правого края

стекла. Более узкое шлифованное стекло устанавливают перед каплей крови под углом 40–45° и подводят к капле крови до соприкосновения с ней. После того как кровь растечется по шлифованному краю, стеклом делают скользящее движение справа налево, равномерно распределяя кровь тонким слоем по поверхности стекла, не доходя 1,0–1,5 см до левого края. Использованное шлифованное стекло опускают в дезинфектант.

Толщина мазка зависит от объема исследуемой капли крови и величины угла между стеклами: чем острее угол, тем тоньше мазок. Правильно приготовленный мазок имеет розово-желтый цвет и одинаковую толщину на всем протяжении.

Приготавливая мазки из мокроты или гноя, посуду с исследуемой пробой располагают как можно ближе к предметному стеклу. Исследуемый материал переносят бактериологической петлей или стерильным анатомическим пинцетом на стекло и осторожно растирают в капле физиологического раствора. Категорически запрещается раздавливать исследуемый материал между двумя стеклами.

После подсушивания (на воздухе!) мазков стекла, размещенные на мостике, с помощью анатомического пинцета захватывают за край и над кюветой с дезинфицирующим раствором опускают в емкость с фиксирующей жидкостью. Аналогичным образом поступают с готовыми препаратами, находящимися в чашке Петри.

Категорически запрещается фиксировать мазки в пламени горелки, поскольку микроорганизмы при этом не погибают.

При погружении в фиксирующую жидкость нескольких предметных стекол с мазками, необходимо следить за тем, чтобы они не слипались, иначе не произойдет обеззараживание материала.

Пинцет после каждой манипуляции опускают в спирт, а затем обжигают. Крышку чашки Петри или мостик, которые использовали для приготовления препаратов, также дезинфицируют: мостик протирают влажным тампоном, смоченным в дезинфектанте, а чашку Петри погружают в дезинфицирующий раствор. То же самое делают с марлевой салфеткой. Использованный физиологический раствор подлежит обеззараживанию путем автоклавирования.

В качестве фиксирующей жидкости при исследовании материала, зараженного или подозрительного на зараженность бактериальными возбудителями I–II групп патогенности, используют метиловый или этиловый спирты, смесь Никифорова (равные объемы этилового спирта и эфира), ацетон, пары формалина.

Чаще всего препараты фиксируют в 96°-м этиловом спирте и в смеси Никифорова. Мазки из культуры микроорганизмов фиксируют не менее 20 мин; из материала, содержащего белковое вещество (мокрота, гной

и др.), – не менее 40 мин; мазки-отпечатки органов – не менее 1 часа. Мазки из споровой культуры, материала, подозрительного на зараженность спорообразующими бактериями (например, возбудителем сибирской язвы), материала от больных с неясной этиологией необходимо фиксировать в 96°-м этиловом спирте, содержащем 3 % H_2O_2 .

Фиксированные мазки окрашивают. Метод окраски определяется целью и задачами исследования.

Фильтровальная бумага, использованная для просушивания стекол с мазками в процессе окрашивания, подлежит автоклавированию или обеззараживанию в дезинфектанте. Смывные воды (после обработки мазков) обеззараживают в соответствии с видом возбудителя.

Стекла с мазками после просмотра погружают в дезинфицирующий раствор.

3.3.2. Окраска мазков

Способы окрашивания мазков делятся на простые и сложные. Простая окраска позволяет быстро ознакомиться с морфологией микробов и их расположением в мазке.

Сложные или дифференциальные методы основаны на особенностях физико-химического строения микробной клетки. Они применяются для детального изучения структуры клетки, а также для характеристики и дифференциации одних видов бактерий от других.

3.3.2.1. Простой метод окраски

Фиксированный мазок красят каким-либо одним красителем, например, фуксином водным (1–2 мин) или метиленовым синим (3–5 мин), промывают водой, высушивают с помощью фильтровальной бумаги и микроскопируют.

3.3.2.2. Окраска по Граму

Метод окраски по Граму является самым универсальным из сложных способов окраски. Все бактерии по своему отношению к этому методу разделяются на грамположительные (грамположительные) – окрашивающиеся по Граму (микробы сине-фиолетового цвета) и грамотрицательные (грамнегативные) – неокрашивающиеся по Граму (микробы красно-сиреневого цвета).

Окраска по Граму имеет важное дифференциально-диагностическое значение и широко используется в микробиологии. К грамположительным микроорганизмам относятся стафилококки, стрептококки, возбудители дифтерии, сибирской язвы и др., к грамотрицательным – гонококки, менингококки, кишечная палочка, возбудители холеры, чумы, туляремии, бруцеллеза и др.

Основная ошибка, допускаемая при окраски по Граму, состоит в переобесцвечивании мазка этиловым спиртом. В этом случае грамположительные бактерии утрачивают первоначальную окраску генциановым фиолетовым и воспринимают окраску фуксином. Грамотрицательные микроорганизмы в свою очередь могут сохранять сине-фиолетовый цвет. Чтобы избежать этих ошибок необходимо строго соблюдать технику обесцвечивания мазка.

Окраска по Граму проводится следующим образом:

- на фиксированный мазок помещают полоску фильтровальной бумаги 2×4 см и наливают на нее карболово-спиртовый раствор генцианового фиолетового на 1–2 мин;
- снимают бумажку, сливают остаток краски, не промывая препарат водой, наливают раствор Люголя на 1–2 мин;
- раствор Люголя сливают, предметное стекло с помощью пинцета погружают 2–3 раза в стаканчик со спиртом (до отхождения фиолетовых струек красителя);
- препарат тщательно промывают водопроводной водой;
- докрашивают мазок водно-спиртовым раствором фуксина в течение 2 мин;
- окрашенный препарат после промывания водой высушивают на воздухе или фильтровальной бумагой и микроскопируют.

Удобной модификацией метода является способ Синева, при котором пользуются заранее приготовленными полосками фильтровальной бумаги, пропитанной красками и затем высушенной. Полоски кладут на фиксированный мазок, смачивают водой и прижимают их пинцетом к стеклу. Излишнюю воду сливают. В остальном техника окраски аналогична оригинальному методу.

3.3.2.3. Выявление капсул по методу Бурри-Гинса

На предметном стекле бактериологической петлей смешивают каплю взвеси микробных клеток с каплей туши и при помощи стекла со шлифованным краем делают мазок таким же образом, как мазок из крови, высушивают и фиксируют.

На мазок наносят водный раствор фуксина на 1–2 мин, промывают водой, высушивают на воздухе и микроскопируют.

Бактерии окрашиваются в красно-сиреневый цвет, а неокрашенные капсулы контрастно выделяются на черном фоне.

3.3.2.4. Окраска спор по Пешкову

Фиксированный мазок окрашивают 20 сек синькой Леффлера, нагревая стекло над пламенем горелки до закипания краски. Далее мазок промывают водой и докрашивают 0,5% водным раствором нейтрально-

го красного в течение 30 с. Краску смывают водой. Мазок высушивают и микроскопируют.

Споры окрашиваются в голубой или синий цвет, вегетативные формы микробов – в розовый.

3.3.2.5. Окраска по методу Романовского-Гимзы

Этот метод окраски применяют главным образом при микроскопии мазков-отпечатков из органов и мазков крови.

Краситель Романовского-Гимзы состоит из метиленового синего, эозина и азура, благодаря чему он окрашивает элементы крови, ткани органов, микроорганизмы в разные цвета. Перед окраской препаратов краситель разводят 10–20 раз дистиллированной водой (рН 7,0–7,2). Степень разведения меняется в зависимости от серии красителя и рН воды. Поэтому каждую новую серию краски рекомендуют проверять на контрольных мазках.

Фиксированный препарат помещают в чашку Петри мазком вниз на две подставки (из предметного стекла, разрезанного вдоль пополам, или двух спичек).

Краску подливают сбоку препарата так, чтобы мазок полностью соприкасался с краской. Окраска длится от 30 мин до одного или нескольких часов, после чего мазок промывают дистиллированной водой (рН 7,0–7,2) и высушивают на воздухе.

Можно проводить окрашивание препарата, погружая стекло в стаканчик с красителем.

Краситель Романовского-Гимзы окрашивает протоплазму форменных элементов ткани в голубовато-синий цвет, ядра клеток – в фиолетово-красный. Тела микробных клеток приобретают нежно-фиолетовый цвет. Например, в мазках-отпечатках органов погибших от туляремии грызунов хорошо видны нежно-фиолетовые бактерии туляремии на фиолетово-красном или голубовато-синем фоне клеточных элементов ткани.

3.3.3. Приготовление раздавленной и висячей капли

Для приготовления раздавленной капли используют хорошо обезжиренное стекло, так как на поверхности пыльных и жирных стекол микробы не фиксируются.

Для проверки чистоты стекла достаточно нанести на него каплю водопроводной воды или физиологического раствора. На чистом стекле капля растекается по всей поверхности, на жирном – дробится на множество мелких капель или приобретает шаровидную форму.

Обычно чистые обезжиренные стекла хранят в контейнере со спиртом или со смесью Никифорова, а перед приготовлением препаратов их извлекают пинцетом и насухо вытирают. Держат стекла пальцами за края.

На середину предметного стекла, помещенного на специальный мостик (см. выше), бактериологической петлей диаметром 3–4 мм или стерильной пастеровской пипеткой наносят каплю жидкого исследуемого материала (бульонная культура, моча, спинномозговая жидкость и др.). При исследовании агаровой культуры предварительно готовят взвесь микроорганизмов в небольшом количестве физиологического раствора. Затем с помощью анатомического пинцета каплю накрывают чистым покровным стеклом таким образом, чтобы его края не выступали за края предметного стекла. Желательно разместить покровное стекло по отношению к предметному «ромбом».

При приготовлении висячей капли чистое покровное стекло помещают на крышку от чашки Петри, наносят в центр каплю исследуемого материала и накрывают его предметным стеклом с луночкой. Предварительно края луночки смазывают вазелиновым маслом. Предметное стекло с луночкой накладывают на покровное так, чтобы капля находилась в центре лунки. Затем стекло осторожно переворачивают и капля свисает в центре герметически закрытой полости лунки, что предотвращает ее высыхание.

Препараты висячей или раздавленной капли микроскопируют, слегка затемняя поле зрения, конденсор при этом опускают, регулируя поступление света вогнутым зеркалом.

При просмотре микроорганизмов в висячей капле под малым увеличением ($\times 8$) микроскопа находят край капли. Установив резкость изображения, поднимают вверх объектив и наносят на покровное стекло каплю иммерсионного масла. Под контролем зрения опускают иммерсионный объектив ($\times 90$) до легкого соприкосновения с маслом. Затем очень медленно, поднимая объектив, устанавливают фокус изображения и доводят четкость микровинтом. Если изображение не получено, все манипуляции повторяют вновь. При утрате ориентировки, наугад поднимать и опускать иммерсионный объектив запрещено, т. к. такой прием приводит к аварийной ситуации – раздавливанию стекла.

Если пользоваться сухим объективом, то вначале под малым увеличением ($\times 8$) находят край капли, устанавливают объектив $\times 40$ и под контролем зрения опускают объектив почти до соприкосновения линзы со стеклом (умышленно переходя фокусное расстояние). Затем, наблюдая в окуляр, поднимают объектив вверх до появления изображения. Четкость устанавливают микровинтом.

После окончания просмотра препарата объектив следует высоко поднять и снять стекло с предметного столика.

Препарат с раздавленной каплей разбирают, проводя все манипуляции над емкостью с дезинфицирующим раствором. Анатомическим

пинцетом слегка сдвигают покровное стекло за край предметного. Сдвинутый край покровного стекла захватывают пинцетом и осторожно отделяют от предметного. Покровное стекло с заразным материалом и предметное стекло с луночкой аккуратно опускают в дезинфектант. Пинцет обжигают в пламени спиртовки, предварительно смочив спиртом. Аналогичным образом разбирают камеру с висячей каплей.

В том случае, если луночка предметного стекла в процессе работы не инфицирована, то его можно использовать для приготовления висячих капель из следующих проб. Вместе с тем, луночка считается условно заразной, поэтому не следует прикасаться к ней перчатками работника и предметами, находящимися на лабораторном столе, а по окончании работы предметное стекло с луночкой необходимо погрузить в дезраствор.

Если во время просмотра висячей или раздавленной капли произошла авария – покровное стекло оказалось раздавленным, необходимо сразу поднять объектив и приступить к ее ликвидации. Предметное стекло с осколками покровного с помощью анатомического пинцета опускают в дезраствор. Если осколки покровного стекла прилипли к линзе объектива микроскопа, их осторожно снимают пинцетом и опускают в дезинфектант. При этом емкость с дезраствором необходимо поднести как можно ближе к микроскопу. Пинцет погружают в дезраствор. После этого приступают к обеззараживанию микроскопа. Объектив 3–4 раза протирают тампоном, смоченным в дезрастворе, меняя каждый раз вату и чередуя влажный и сухой тампоны. Столик микроскопа также дезинфицируют. Используемые тампоны и пинцет погружают в дезраствор. Руки бактериолога (в резиновых перчатках) подлежат обработке путем погружения в дезинфектант на 2–3 минуты. После этого перчатки замачивают в дезинфицирующем растворе.

4. ОСОБЕННОСТИ ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОЙ РАБОТЫ С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМИ ЖИВОТНЫМИ

4.1. Требования к размещению и оснащению помещений блока инфицированных животных

В работе диагностических, научно-исследовательских и производственных лабораторий широко используют различных животных. Лабораторные животные служат для диагностики некоторых инфекционных заболеваний, моделирования инфекционных процессов, изучения вирулентности и токсигенности штаммов микроорганизмов, постановки биологической пробы с целью выделения возбудителя и др.

Кроме того, они являются донорами, у которых берут кровь для получения сыворотки, плазмы, эритроцитов.

Для экспериментальной работы используют беспородных (конвенциональных) белых мышей, белых крыс, хомяков, морских свинок и кроликов.

Крупные животные (овцы, лошади, ослы, обезьяны) также являются объектами исследований. В частности, на овцах проверяют эффективность вакцин против бруцеллеза и сибирской язвы, на обезьянах – против чумы, туляремии и других инфекционных заболеваний. Лошадей, крупный рогатый скот используют в качестве продуцентов различных иммунобиологических препаратов. Отдельные вопросы эпизоотологии, эпидемиологии и профилактики природно-очаговых инфекций изучают на отловленных в природе грызунах.

Многие виды исследовательской работы предполагают контакты персонала с лабораторными животными, которые могут быть как естественно, так и экспериментально инфицированы возбудителями болезней, представляющими опасность для людей. В связи с этим необходимо создать сотрудникам лабораторий безопасные условия труда. Соответствующее внимание необходимо уделять и экспериментальным животным.

В настоящее время разработан целый ряд нормативно-технических документов по размещению и проектированию вивариев, разведению и содержанию лабораторных животных.

Действующие СанПиН 3.3686-21 регламентируют требования к проведению исследований на лабораторных, диких позвоночных животных и членистоногих, их содержанию, а также обеззараживанию и последующей утилизации отработанных животных.

Все манипуляции по приему, первичной обработке и вскрытию поступивших на исследование грызунов, заражению, вскрытию, содержанию биопробных животных и членистоногих, а также научно-исследовательскую работу с использованием экспериментальных животных проводят в специальных помещениях для инфицированных животных. Эти помещения должны быть отдельным самостоятельным или изолированным от основной лаборатории блоком. Планировка и набор помещений блока для инфицированных животных варьируют в зависимости от ПБА, с которым проводятся исследования, вида размещаемых животных и характера выполняемых работ (например, аэрозольный метод заражения требует особых условий). Заражение, взятие проб крови и вскрытие мелких лабораторных животных при работе с ПБА I–II групп проводят в боксе микробиологической безопасности (или защитном боксирующем устройстве).

Заразный блок обязательно должен включать комнаты для одевания СИЗ, снятия СИЗ, приема и первичной обработки материала, зоолого-паразитологической работы, заражения и вскрытия живот-

ных, содержания биопробных животных (одна или несколько комнат), обеззараживания материала (автоклавная), мытья и хранения тары для биопробных животных, ведения записей.

Вход персонала в блок для работы с инфицированными животными осуществляют через помещение для надевания средств индивидуальной защиты, а выход – через помещение для снятия и обеззараживания средств индивидуальной защиты.

При работе в блоке для инфицированных животных не допускается в одной и той же комнате надевать СИЗ и снимать их после работы с ПБА.

Комнату для одевания защитной одежды оборудуют зеркалом, шкафами с необходимым запасом СИЗ, столом для регистрации времени и характера предполагаемой работы, заполнения этикеток на экспериментальных животных и полкой, на которую помещают металлические контейнеры с необходимыми для работы материалами (например, питательные среды, взвеси бактериальных культур, фиксатор для мазков-отпечатков и др.).

В комнате для снятия и обеззараживания защитных костюмов размещают емкости с дезрастворами для обеззараживания рук, обработки наружных поверхностей сапог (калош), замачивания халатов, капюшонов (косынок), полотенец, нарукавников, фартуков, резиновых перчаток; емкость с раствором соды (моющего средства) для погружения ватно-марлевых масок (для последующего кипячения) и банку с 70° спиртом для погружения очков-консервов.

В этой комнате выделяют место (столик или полка) для контейнера, выносимого из заразного помещения. Наружную поверхность контейнера тщательно обрабатывают дезинфектантом перед выносом из вскрывочной.

После снятия, в установленном порядке (перед зеркалом), защитного костюма руки обрабатывают 70° спиртом и моют с мылом под водопроводным краном.

Помещение для приема и первичной обработки заразного материала должно иметь собственный вход и сообщаться со вскрывочной (можно через «передаточное» окно). Комнату оборудуют столами для регистрации и размещения поступающего на исследование материала и холодильником.

В комнате для зоолого-паразитологической работы проводят определение вида, величины, возраста грызунов, их очес, сбор эктопаразитов, разборку гнезд грызунов и подготовку паразитологического материала к исследованию.

Помещение для заражения и вскрытия животных должно быть достаточно просторным и смежным с комнатой для содержания биопробных

(зараженных) животных. Целесообразно, чтобы оно сообщалось через шлюзы с автоклавной, где проводят обеззараживание материала. В комнате размещают столы для вскрытия и заражения животных, настольный или напольный бокс биологической защиты для проведения конъюнктивального и интранозального заражения, шкаф для инструментов, холодильник для хранения трупов животных, небольшой столик для ведения протоколов опытов, электроприборы для кипячения инструментов и шприцов, емкости различных объемов с дезинфицирующими средствами.

Стол для заражения (рис. 15) и вскрытия (рис. 16) животных должны иметь невысокие бортики и полку под столешницей на расстоянии 15–20 см от пола. Поверхности стола и полки покрывают водонепроницаемым материалом (лучше антикоррозионным металлом). На полке под столом размещают емкости с дезинфектантом для дуршлага (для стекания жидкости с трупа животного), корнцанга, которым захватывают трупы животных, и эмалированную миску, над которой их переносят на вскрывочную доску.



Рис. 15. Рабочее место для заражения биопроб.



Рис. 16. Рабочее место для вскрытия мелких лабораторных животных.

Необходима большая емкость с дезинфицирующим раствором для замачивания животных перед вскрытием.

Для обеззараживания лабораторной посуды используют бачки или ведра с дезинфицирующими средствами. Для отработанных животных целесообразно иметь эмалированные ведра с ножной педалью для открывания крышки.

На стол для вскрытия животных ставят металлическую или эмалированную кювету с доской (50 × 35 см) из мягких пород дерева. Доска должна быть без сучков и трещин.

Металлическая или эмалированная кювета (большой таз) понадобится также для заражения лабораторных животных. Над кюветой операто-

ры набирают в шприц инокулюм, заражают животных и сбрасывают в нее мелкие отходы (тампоны, бумажную обертку со стерильных тампонов, спички и др.). Для заражения белых крыс и мышей в корень хвоста лучше иметь мелкосетчатые металлические каркасы с отверстием для хвоста.

Для содержания биопробных животных предусмотрены одна или несколько (если необходимо одновременно размещать животных, инфицированных разными ПБА) так называемых биопробных комнат. На стеллажах, которыми оборудованы эти помещения, размещают банки с зараженными животными. При работе с белыми крысами и дикими грызунами стеклянные банки с животными помещают в металлические сетчатые или перфорированные баки с фиксированной крышкой. Зараженных кроликов содержат в закрытых металлических ящиках, поставленных в металлические кюветы.

В сибирезвенных лабораториях стеллажи облицовывают железом, чтобы можно было их обрабатывать прожиганием (например, паяльной лампой).

Комнату для обеззараживания отработанного материала оборудуют автоклавом (лучше проходным), нагревательными приборами (газовые или электрические плиты, стерилизаторы и др.), шкафами, рабочим столом. Проходной автоклав устанавливают таким образом, чтобы его загрузка осуществлялась со стороны вскрывочной. Для проведения обеззараживания при помощи дезсредств следует иметь емкости различных размеров, которые при необходимости можно также размещать в любом помещении заразного блока: в комнате для снятия СИЗ, в биопробной, вскрывочной и там, где проводят зоолого-паразитологическую работу.

Помещение для мытья и хранения чистых банок, кроме прямого назначения, можно использовать для содержания до опыта чистых лабораторных животных и подготовки их к исследованию (измерение температуры, взвешивание, удаление шерсти), непродолжительного хранения кормов и подстилочного материала. Это помещение оборудуют ванной, стеллажами и шкафами.

4.2. Вскрытие животных

Поскольку целью биологического метода исследования является выделение патогена и его последующая идентификация, необходимо перед вскрытием животного подготовить специальные среды, определяемые видом возбудителя, предметные стекла для мазков-отпечатков органов, фиксатор, стерильные шприцы. Могут понадобиться пропитанные мертиолятом натрия (1:1000) фильтровальные бумажки для забора крови из сердца (для серологических исследований), стерильные деревянные палочки для посева органов при исследовании на бруцеллез и др.

Перед вскрытием оборудуют рабочее место. На вскрывочной доске размещают спиртовку на устойчивой подставке, два стакана с инструментами (хирургический пинцет, скальпель и ножницы в одном, анатомический пинцет и ножницы в другом), погруженными в 96° спирт (1/3 объема стакана), ступку или чашку Петри для приготовления суспензии органов, стеклянную воронку, штатив, на который можно положить предметные стекла. Понадобятся также пробирки с физиологическим раствором и стерильным песком для растирания в ступке органов вскрываемого животного, бактериологическая петля, пастеровские пипетки и простой карандаш. На столе с левой стороны кюветы расставляют питательные среды и стерильные чашки Петри, с правой – банку с нестерильными ватными тампонами и кристаллизатор с дезраствором для обработки рук (рис. 16). Аналогично оборудуют БМБ для вскрытия животных.

Банки с биопробными животными, которых необходимо вскрыть, переносят из биопробной во вскрывочную комнату таким образом, чтобы не касаться внутренней поверхности горлышка. Выживших биопробных животных умерщвляют хлороформом (эфиром), которым смачивают ватный тампон и бросают в банку. Банку плотно накрывают крышкой или не пропускающим воздух материалом.

Все манипуляции с трупами животных проводят только инструментами, держа их за верхнюю часть. Перед вскрытием животное захватывают корнцангом и погружают в дезинфицирующий раствор до полного намочения шерсти, после чего помещают на дуршлаг для освобождения от излишней жидкости и переносят на вскрывочную доску. После этого корнцанг погружают в дезинфектант. Перенос животного и корнцанга осуществляют только над дезраствором (рис. 17).



Рис. 17. Подготовка животного к вскрытию.

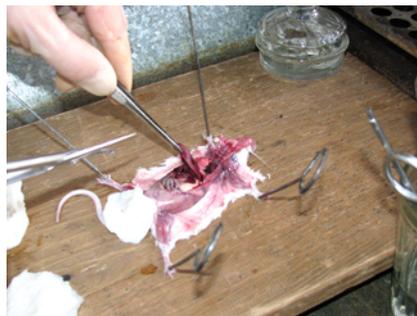


Рис. 18. Фиксация, вскрытие и посев органов биопробного животного.

Животное помещают на вкрывочную доску и с помощью двух пинцетов растягивают за лапки, чтобы снять трупное окоченение. Хирургическим пинцетом, который держат в левой руке, захватывают левую верхнюю лапу животного и прикалывают ее в области пясти к доске. Такую же манипуляцию проделывают с правой задней лапкой, прикалывая ее к доске в области плюсны и т. д. Приколышам придают наклонное положение, чтобы они не мешали в работе (рис. 18).

После каждой манипуляции в ходе исследования экспериментатор должен обрабатывать руки дезраствором и насухо вытирать их полотенцем, чтобы исключить возможность падения инструментов с заразным материалом из мокрых рук.

Перед тем как приступить к вскрытию, необходимо смочить в дезинфицирующем растворе 3–4 ватных тампона, отжать и поместить их на вкрывочную доску. Одним тампоном обрабатывают шерсть животного и прикрывают отверстие мочеиспускательного канала, чтобы предотвратить возможное разбрызгивание содержимого мочевого пузыря во время вскрытия, другие тампоны используют для протирания инструментов перед обжиганием.

Вскрытие трупов следует проводить таким образом, чтобы исключить внесение микроорганизмов с поверхности в глубину тканей и перенос микробов из одного органа на другой. Поэтому следует тщательно обрабатывать инструменты после каждой манипуляции и обжигать перед началом работы.

При вскрытии используют хирургический пинцет и ножницы, которыми одним движением рассекают кожу по средней линии брюшка от половых органов до нижней челюсти и делают разрезы в стороны к четырем лапкам. Осторожно отделяют кожные лоскуты скальпелем или сомкнутыми браншами ножниц (при вскрытии мелких грызунов), приподнимая кожу хирургическим пинцетом. При правильном вскрытии паховые и подмышечные лимфатические узлы остаются на кожных лоскутах, а подчелюстные и шейные – на мышцах шейной области. И использованные инструменты обрабатывают ватными тампонами, погружают в спирт и заменяют другим набором инструментов (рис. 18).

После осмотра подкожной клетчатки и лимфатических узлов проводят посев кусочка измененного лимфатического узла (бубона) на среды методом отпечатков, захватив его анатомическим пинцетом. Затем делают отпечатки на двух предметных стеклах. При необходимости посеять материал в пробирки со скошенным агаром используют бактериологическую петлю, которую накаляют, прижигают к ней исследуемый материал и сеют методом отпечатков. После посева остаток органа снимают с петли пинцетом и только после этого прожигают

петлю. Оставшийся на кожном лоскуте лимфоузел вырезают и переносят в ступку (чашку Петри) для биопробы.

Далее приступают к вскрытию брюшной и грудной полостей. Обжигают инструменты, захватывают хирургическим пинцетом брюшную стенку в области лобка, надрезают ее и, введя неглубоко в брюшную полость закругленный конец ножниц, делают два дугообразных разреза вправо и влево к нижним ребрам. Затем надрезают нижние ребра, рассекают диафрагму по краю грудной клетки и продолжают разрезать с обеих сторон грудную клетку до верхних ребер. Образовавшийся лоскут из грудины и ребер откидывают на мордочку животного. Инструменты очищают от следов крови с помощью тампонов и погружают в спирт.

После осмотра органов и оценки патологоанатомической картины приступают к посеву органов брюшной полости: печени, селезенки, парааортальных лимфатических узлов. С помощью анатомического пинцета и ножниц отсекают маленькие ($\approx 5 \times 5$ мм) кусочки органов и, держа их пинцетом, сеют на чашки Петри и делают мазки-отпечатки. Часть материала (свежие кусочки) отбирают для приготовления суспензии органов. После каждой манипуляции инструменты тщательно очищают от следов крови, органов и погружают в спирт (рис. 18).

При исследовании животных на туляремию делают посев органов бактериологической петлей (см. выше), на бруцеллез – стерильными деревянными палочками. В последнем случае кусочек органа помещают на конец палочки, осторожно вносят ее в пробирку со скошенным агаром и растирают материал о внутреннюю стенку пробирки над поверхностью агара. Образовавшуюся массу тщательно втирают в поверхность среды. Исползованную палочку погружают в дезраствор.

Кровь из сердца забирают пастеровской пипеткой, которую вводят в полость правого желудочка через предварительно «припеченное» накаленным скальпелем место. При этом сердце фиксируют анатомическим пинцетом.

У мелких грызунов отсекают верхушку сердца и, используя бактериологическую петлю, выступившие капли крови сеют на пластинчатый агар и в жидкие среды.

При необходимости забора крови для серологических исследований ею пропитывают фильтровальные бумажки с мертиолятом натрия. Пинцетом бумажки помещают в чашки Петри или в пробирки, если перед забором крови их свертывают в трубочку с помощью двух пинцетов.

Если животное загнившее, для посева берут костный мозг из трубчатой части бедренной кости. Кость предварительно освобождают от мышц, подкладывают под место предполагаемого разреза стерильный марлевый или ватный тампон и под прикрытием стеклянной во-

ронки рассекают ее. Придерживая пинцетом отрезок кости, бактериологической петлей или иглой забирают материал для посева.

У мелких грызунов исследуют головной мозг. На вскрывочную доску помещают слой ваты, смоченный дезраствором. Двумя пинцетами закрывают внутренние органы вскрытого животного кожными лоскутами и переворачивают труп спиной кверху на приготовленный ватный матрасик. Корень хвоста фиксируют приколышем. Отсепаровывают кожу головы за ушками, фиксируют ее хирургическим пинцетом, вводят острые концы в глазницы, и под прикрытием стеклянной воронки, которую держит помощник, рассекают кости черепа в области мозжечка. Не вынимая пинцет из глазниц, слегка приподнимают отсеченную часть черепа, чтобы обнажить мозг и бактериологической петлей берут материал на исследование.

В процессе посева, как уже упоминалось, делают мазки-отпечатки свежими кусочками органов на двух (или более) стеклах:

- лимфатические узлы – четыре отпечатка
- легкие – два
- печень – один
- селезенка – три
- кровь – одна узкая полоса поперек стекла

Мазки-отпечатки не должны быть толстыми.

При вскрытии животного в протоколе отмечают состояние подкожной клетчатки и лимфатических узлов в паху, подмышечных впадинах. Учитывают их величину, форму и цвет. При осмотре органов грудной полости обращают внимание на наличие экссудата в полости плевры, гиперимии или ишемии (малокровие) легких. Регистрируют состояние органов брюшной полости, отмечая наличие очагов поражения (абсцессов).

После окончания вскрытия, осторожно извлекают приколыши, придерживая лапки животного пинцетом. Подносят как можно ближе бак с дезраствором для сбора отработанных трупов и, захватив двумя хирургическими пинцетами кожные лоскуты животного, опускают его в емкость. Туда же сбрасывают использованные тампоны. Тщательно обрабатывают вскрывочную доску смоченными в дезрастворе тампонами. Переносят в фиксатор предметные стекла с мазками-отпечатками. При всех манипуляциях используют пинцет. Чашки Петри, пробирки с посевами, штатив перед тем как поместить в бикс для транспортировки протирают смоченными в дезрастворе салфетками или ватными тампонами.

Для заражения биопробных животных используют суспензию органов вскрытого животного. Вначале органы под прикрытием воронки измельчают ножницами, если их собирали в чашку Петри, или растирают с помощью пестика и стерильного песка, если использовали ступку. В об-

разовавшуюся массу постепенно добавляют физиологический раствор 1:4–1:5 и эмульгируют. Суспензию для заражения набирают в шприц через стерильный ватный тампон. Для посева суспензии на пластинчатый агар используют бактериологическую петлю.

4.3. Заражение лабораторных животных

Использование определенного вида лабораторных животных и метода заражения определяется целью и задачами исследования. Разработаны следующие способы введения исследуемого материала биологическим моделям: накожный, внутрикожный, подкожный, внутримышечный, внутрибрюшинный, в переднюю камеру глаза, интратрахеальный, интраназальный, внутрикишечный, субокципитальный.

Некоторые методы заражения требуют предварительной подготовки животного. Так, при накожном и внутрикожном способах инокуляции материала удаляют волосяной покров в области брюшка или спины животного. Внутрикишечное и субокципитальное введение патогена проводят под наркозом.

Учитывая высокую степень риска инфицирования персонала лаборатории при интраназальном и интратрахеальном способах заражения, все манипуляции с животными проводят в боксах биологической безопасности. Особые требования по размещению, планировке, оборудованию, техническому обслуживанию и режиму работы предъявляют к аэрозольным лабораториям, проводящим ингаляционное заражение животных возбудителями I–II групп патогенности.

Наиболее часто в практических лабораториях используют белых мышей, морских свинок, хомячков и кроликов, применяя подкожный, накожный, внутрибрюшинный методы введения инфицирования материала, а также заражение в корень хвоста или вену.

В исследование берут только здоровых животных, определенных массы тела и возраста.

Перед заражением животных рассаживают в банки или металлические ящики (кролики), на которые прикрепляют заранее заполненные этикетки. В этикетке указывают вид и вес животного, номер (по журналу регистрации биопроб), вид и количество (объем, доза) вводимого материала, метод инокуляции, дату заражения и фамилию экспериментатора.

Для обеспечения безопасных условий при заражении животных необходимо строго соблюдать специально разработанные методические приемы. Особые требования предъявляют к подготовке шприцев.

Перед стерилизацией шприцы тщательно осматривают, чтобы исключить наличие трещин в цилиндре. Поршень должен свободно двигаться в цилиндре, но не пропускать жидкость за поршень. Проверяют

проходимость иглы, укладывают в стерилизатор анатомический пинцет, иглы и шприцы таким образом, чтобы рядом с цилиндром лежал подпорный к нему поршень.

Готовят рабочее место (рис. 19) и собирают простерилизованные шприцы.



Рис. 19. Оборудование стола для заражения мелких лабораторных животных.



Рис. 20. Исходное положение шприца при заражении лабораторных животных.

Чтобы избежать разбрызгивания инокулята при заражении животных, которое может произойти при случайном отсоединении иглы от цилиндра под давлением выпускаемой жидкости, необходимо с помощью пинцета плотно насадить иглу на канюлю собранного шприца. Желательно пользоваться специальным устройством, фиксирующим иглу, или шприцем с навинчивающейся иглой. Разрешается применять шприцы одноразового использования, у которых игла неотделима от цилиндра.

Проверяют притертость иглы к канюле цилиндра. Для этого наполняют шприц водой из стерилизатора, а затем под давлением выпускают ее. О пригодности шприца к работе с заразным материалом свидетельствует отсутствие капель воды в месте соединения иглы с канюлей и за поршнем в цилиндре. Шприц насухо протирают стерильным ватным тампоном.

Работа по заражению животных проводится в паре. Помощник распробковывает пробирку с исследуемым материалом и наклоняет ее таким образом, чтобы врач мог набрать необходимое количество. Чтобы исключить случайное выливание содержимого пробирки, желательно пользоваться пробиркой с углублением в верхней части стенки. Для того чтобы избежать попадания в шприц пузырьков воздуха, следует полностью погрузить иглу в жидкость срезом книзу и медленно продвигать поршень.

При необходимости удалить пузырек воздуха из шприца следует с помощью пинцета насадить на иглу стерильный ватный тампон, перевести шприц в вертикальное положение иглой вверх и осторожно его выдавить. После этого пинцетом снимают с иглы тампон, погружают его в дезинфектант, а пинцет – в стакан со спиртом. Более безопасный способ набора инфицированного материала из чашки Петри или ступки.

При заражении материалом, содержащим сравнительно крупные частицы (суспензии органов исследуемых животных и человека, членистоногих, пищевых продуктов и др.), его набирают в шприц через стерильные марлевые или ватные тампоны.

После того как материал набран в шприц, категорически запрещается прикасаться рукой к игле или месту соединения ее с цилиндром.

При необходимости освободить руки работающего после набора инокулята, шприц можно положить в чашку Петри, предварительно наколов на иглу стерильный ватный или марлевый тампон. При этом шприц должен лежать устойчиво и не касаться иглой и канюлей бортика чашки.

Все манипуляции, связанные с набором инфицированного материала из пробирки и заражением животных, проводят над кюветой (тазом) с дезинфицирующим раствором.

Шприц с инокулятом держат строго горизонтально между большим, средним и безымянным пальцами правой руки. Указательный палец, оставаясь свободным, не должен касаться (до момента заражения) поршня (рис. 20).

Использованные шприцы обеззараживают кипячением или дезинфицирующим раствором. Чтобы исключить опасность разбрызгивания заразного материала при разборке шприца, следует придерживаться определенных правил. Остаток неиспользованного после заражения материала медленно выпускают в дезинфектант, погрузив иглу шприца в раствор. Затем, держа шприц иглой вниз, над емкостью (стерилизатор, кастрюля) с водой или дезраствором, осторожно пинцетом снимают иглу и опускают ее в жидкость. Наклоняют шприц канюлей вверх и пинцетом медленно вытягивают поршень и также погружают его в жидкость. После этого вводят одну браншу пинцета внутрь цилиндра и осторожно затапливают его.

Если использовались шприцы с насадкой, вынимают только поршень, остальные детали разбирают после обеззараживания. Пинцет помещают в стакан со спиртом или дезинфицируют вместе со шприцами.

При подкожном методе заражения исследуемый материал (0,1–0,2 мл, максимально 0,5 мл белой мышке, хомячку; 0,5–1,0 мл морской свинке) вводят экспериментальной модели в область бедра. Помощник фиксирует животное (белая мышь, хомячок, морская свинка) руками или корнцан-

гом (крыса) и подносит к экспериментатору в растянутом виде брюшком кверху. Если инокулюм вводят в левую лапку белой мыши или хомячка необходимо захватить левой рукой ушки и складку кожи в области затылка, а правой – хвост и задние лапки животного и наоборот (рис. 21).



Рис. 21. Подкожный (внутримышечный) метод заражения белой мыши.



Рис. 22. Внутрибрюшинный метод заражения морской свинки.

При заражении крыс помощник фиксирует корнцангом кожу в области затылка животного, хвост и заднюю лапку прижимает рукой к корнцангу, а свободную заднюю лапку, в которую предполагается вводить материал, держит другой рукой.

Морских свинок берут рукой так, чтобы одна передняя лапка располагалась между большим и указательным, другая – между указательным и средним пальцами помощника. Фиксированные лапки отводят кзади. Задние лапки фиксируют между большим, указательным и средним пальцами другой руки помощника.

В момент заражения руки помощника должны располагаться в одной плоскости с животным, чтобы исключить возможные аварийные ситуации.

Заражающий над кюветой с дезинфектантом в правой руке держит шприц с исследуемым материалом, левой рукой с помощью анатомического пинцета спиртовым ватным тампоном протирает место инокуляции материала, оставляет тампон на руке помощника, этим же пинцетом слегка приподнимает кожу животного вверх и вводит иглу срезом кверху строго под кожу. Затем экспериментатор переносит пинцет на муфту иглы, чтобы зафиксировать ее на шприце, и медленно надавливает на поршень указательным пальцем. После введения материала необходимо сразу убрать указательный палец с поршня, пинцет – с канюли шприца и под прикрытием спиртового тампона вывести иглу из-под кожи. Используемый тампон опускают в дезраствор.

Заражающий разбирает шприцы (см. выше), а помощник помещает животное в банку, которая должна стоять вблизи работающих. Не касаясь горлышка банки, животное головой вниз опускают в нее на глубину не более 5–6 см и освобождают сначала голову, а затем задние лапки.

Внутрибрюшинный метод заражения применяют с целью ускорения биологического исследования материала. В этом случае для биопробы можно брать только так называемый «чистый» материал (например, кровь).

Техника внутрибрюшинного метода заражения отличается от подкожного способом подачи животного. В момент непосредственного введения исследуемого материала лабораторное животное должно располагаться вертикально головой вниз. В этом положении кишечник смещается в сторону диафрагмы, что уменьшает возможность его повреждения в момент инъекции.

Мелких лабораторных животных помощник сразу подает головкой вниз, брюшком к экспериментатору. Заражающий обрабатывает место введения инокулята спиртовым тампоном, захватывает анатомическим пинцетом складку кожи вместе с брюшиной несколько выше проекции мочевого пузыря и вводит иглу, прокалывая кожу и брюшину одновременно.

При заражении морских свинок помощник располагает фиксированное животное сначала в горизонтальном положении брюшком вверх, а головкой к правой руке экспериментатора. Заражающий протирает нижнюю часть брюшка спиртовым тампоном, захватывает пинцетом складку кожи, отступая 0,5–0,8 см от белой линии живота в правую сторону по отношению к животному, приподнимает кожу и прокалывает ее. Затем фиксирует этим же пинцетом муфту иглы. В это время помощник осторожно переводит животное в вертикальное положение головой вниз, а заражающий следит за иглой, устанавливая ее перпендикулярно к брюшку животного. Затем экспериментатор колющим движением вводит иглу в полость брюшины. Последующие манипуляции не отличаются от выше указанных при подкожном методе заражения (рис. 22).

Накожный метод заражения применяют при исследовании материала, который содержит большое количество посторонней микрофлоры (загнивший труп грызуна, мокрота, содержимое кишечника, погадки птиц, земля и др.). Перед заражением кожу в области брюшка животного освобождают от волосяного покрова. У кроликов, морских свинок и крыс шерсть выстригают ножницами с закругленными концами. Для полного удаления волосяного покрова используют депилятор (за 2–3 дня до постановки опыта). Помощник крепко фиксирует животное и подает его в растянутом виде строго горизонтально, чтобы избежать стекания

капель инфицированного материала с поверхности кожи в момент заражения. Заражающий обрабатывает эпилированный участок стерильным ватным тампоном, смоченным стерильной водой или физиологическим раствором, и скарифицирует лезвием скальпеля до появления капель крови кожу в области предполагаемого заражения. Затем заражающий с помощью пастеровской пипетки, скальпеля или пинцета наносит на кожу небольшое количество (2–3 капли или 0,5–1,0 г) исследуемого материала. Если необходимо заразить животное мокротой, используют ватный тампон, накрученный на деревянную палочку. При исследовании отдельных органов (грызуна, человека) вырезают небольшой кусочек, которым делают отпечатки на скарифицированной коже биопробного животного. После нанесения исследуемого материала следует тщательно втереть его в кожу тупой поверхностью скальпеля под прикрытием стеклянной воронки или крышки от чашки Петри. Воронку или чашку Петри, которые использовали в работе, сразу погружают в дезинфицирующий раствор.

Заражение в корень хвоста. При заражении этим методом используют белых мышей и белых крыс. Белых мышей помощник подает экспериментатору в горизонтальном положении спинкой вверх, оставляя не фиксированным хвост. Для заражения белых крыс необходимо иметь специальные металлические каркасы или банки с металлическими крышками, в средней части которых сделано небольшое отверстие для хвоста. В исключительных случаях животное можно фиксировать с помощью корнцанга. Исследуемый материал вводят животному в подкожную клетчатку в области корня хвоста.

Крыс и мышей можно заразить в боковую вену хвоста. Перед введением материала хвост животного смазывают ксилолом или толуолом, чтобы вызвать набухание вены. Для введения материала лучше пользоваться туберкулиновыми иглами.

НОРМАТИВНЫЕ ДОКУМЕНТЫ И РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».
2. СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных,

общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

3. Использование ультрафиолетового бактерицидного излучения для обеззараживания воздуха в помещениях: руководство. – М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2005. – 46 с.

4. Методические указания по применению бактерицидных ламп для обеззараживания воздуха и поверхностей в помещениях МУ 11-16/03-06 от 28.02.95. – М.: Минздрав-Медпром России, 1995.

5. Федеральный закон от 30.12.2020 № 492-ФЗ «О биологической безопасности в Российской Федерации».

6. Дроздов С.Г., Гарин Н.С., Джиндоян Л.С., Тарасенко В.М. Основы техники безопасности в микробиологических и вирусологических лабораториях. – М.: Изд-во Медицина, 1987. – 256 с.

7. Левинсон У. Медицинская микробиология и иммунология / Пер. с англ. // Под ред. В.Б. Белобородова. – М.: Лаборатория знаний, 2021. – 547 с.

8. Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований // Под ред. А.С. Лабинской, Л.П. Блинковой. – СПб.: Лань, 2021. – 588 с.

9. Особенности методических приемов при работе с возбудителями инфекционных болезней человека I и II группы патогенности бактериальной этиологии: руководство / Сост. В.С. Уралева, М.М. Гулида, С.А. Лебедева и др. – РнД, 1989. – 208 с.

10. Практическое руководство по биологической безопасности в лабораторных условиях. – 3-е изд. – Женева: ВОЗ, 2004. – 190 с.

11. Руководство по медицинской микробиологии. Общая и санитарная микробиология. Книга I // Под ред. А.С. Лабинской, Е.Г. Волиной. – М.: Изд-во БИНОМ, 2020. – 1080 с.

12. Ющук Н.Д., Венгеров Ю.Я. Инфекционные болезни. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2021. – 1104 с.

13. Электронное учебно-методическое пособие «Стандартные операционные процедуры проведения микробиологических исследований». – URL: <http://school.microbe.ru>.

14. Электронное учебно-методическое пособие «Ликвидация аварий при работе с патогенными биологическими агентами». – URL: <http://school.microbe.ru>.

15. Электронное учебно-методическое пособие «Работа в боксе микробиологической безопасности». – URL: <http://school.microbe.ru>.

16. Электронное учебно-методическое пособие «Заражение и вскрытие лабораторных животных». – URL: <http://school.microbe.ru>.

**ОСОБЕННОСТИ
МЕТОДИЧЕСКИХ ПРИЕМОВ
И СПЕЦИФИЧЕСКИЕ УСЛОВИЯ РАБОТЫ
С ВОЗБУДИТЕЛЯМИ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИЙ**
Учебное пособие для врачей-бактериологов

Корректор *Булкина С.В.*
Оригинал-макет *Арсентьев Л.И.*
Художник *Фалеев К.А.*

Сдано в набор 02.06.2022. Подписано в печать ##.06.2022. Бумага офсетная.
Формат 60x84^{1/16}. Гарнитура Cambria.
Усл. печ. л. 3,25. Тираж 130 экз. Заказ № 023-22.

ИНЦХТ
Иркутск, ул. Борцов Революции, 1. Тел. (395-2) 29-03-37.
E-mail: arleon58@gmail.com

УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ ДЛЯ ВРАЧЕЙ-БАКТЕРИОЛОГОВ, ЛАБОРАНТОВ



ISBN 978-5-98277-358-6



9 785982 773586