

LABORATORUL DE MICROBIOLOGIE

Partea întâi

MICROBIOLOGIE GENERALĂ

LABORATORUL DE MICROBIOLOGIE

Laboratorul de microbiologie, prin construcție, compartimentare, dotări și funcționalitate trebuie să asigure:

- folosirea cât mai eficientă a forței de muncă;
- securitatea personalului, a colectivității și a probelor examinate.

1.1. PLANUL LABORATORULUI

1.1.1. Planul de ansamblu

Orice laborator de microbiologie presupune următoarele compartimente: de recepție, de investigații, de pregătire a sticlăriei, de preparare și condiționare a mediilor de cultură și a reactivilor, de depozitare (sticlărie, medii de cultură, reactivi), birou, dependențe pentru necesitățile igienice ale localului și personalului. Dimensionarea acestor compartimente este condiționată în ultimă analiză de numărul examenelor solicitate.

Laboratorul de microbiologie trebuie să funcționeze după principiul circuitului în sens unic, cel mai bine realizat prin dispunerea în lungul unui coridor a unor camere care nu comunică între ele, singurul acces în fiecare cameră fiind prin acest coridor (figura 1.1). În

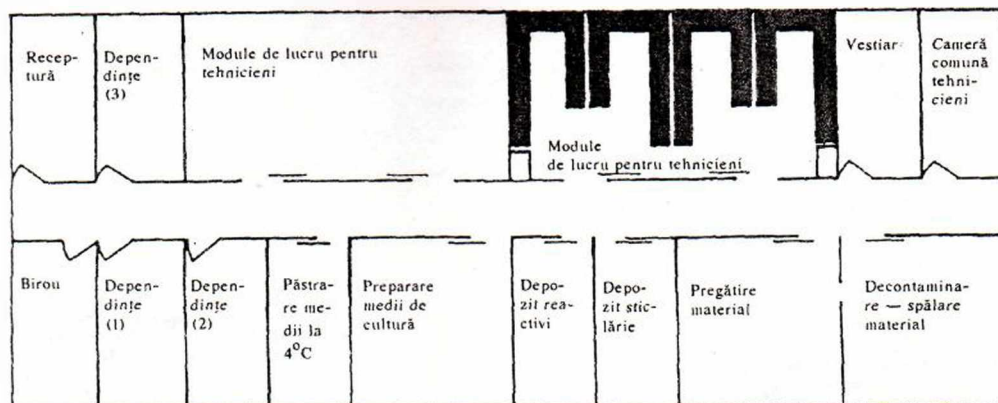


Fig. 1.1. Planul de ansamblu al unui laborator de microbiologie care lucrează cu 12 tehnicieni per tură pentru examenul prelevatelor patologice (sugestie). Observați gruparea modulelor de lucru în «U»

acest mod la o extremitate se efectuează activitățile «murdare», iar la cealaltă extremitate cele «curate». Plasarea diferitelor activități în lungul scalei «curat» spre «murdar» se face în funcție de riscul contaminării. Astfel la o extremitate sunt plasate camerele pentru prepararea și conservarea mediilor de cultură, iar la cealaltă extremitate cele pentru recepționarea și examinarea prelevatelor patologice.

1.1.2. Planul principalelor compartimente

Locurile de muncă trebuie concepute și dotate ca unități în care funcțiile specifice fiecărui compartiment sunt realizate independent de restul laboratorului. Numai în acest mod se pot evita deplasări inutile de persoane și materiale cu risc de contaminare și dăunătoare unei activități eficiente. Doar în cazuri excepționale se va permite deplasarea unor aparate (microscop, centrifugă etc.) dintr-o încăpere în alta, respectând întotdeauna sensul de la «curat» spre «murdar».

În compartimentul de investigație microbiologică sau serologică trebuie rezervați pentru fiecare tehnician cca 16 m², suprafață în care dotările pot fi dispuse ergonomic fără perturbarea reciprocă a aparatelor concomitent în funcție (de exemplu, microscopul nu poate funcționa pe aceeași masă cu centrifuga, frigiderul nu poate fi plasat lângă incubatorul de 37°C).

Pentru laboratoarele mici cu volum redus de analize, încadrate cu un singur tehnician, locul de muncă poate fi dispus liniar (figura 1.2) și presupune o masă sau o consolă de 2–6 m/75 cm cu blatul la cca 75 cm de la dușumea și un spațiu pentru picioare larg de cca 65 cm și tot atât de înalt, care permite așezarea confortabilă pentru lucru pe un scaun rotativ cu suport solid pentru spate.

Un modul în «L» asigură o suprafață mai mare de lucru și poate fi amplasat convenabil în colțurile încăperii. Pe latura mare se poate lucra în poziție așezat, iar latura mică poate fi înălțată la cca 95 cm pentru lucru în poziție ortostatică (figura 1.2).

Modulul în «U» este cel mai eficient pentru o gamă mai diversificată de examene sau examene cu etape multiple (de exemplu, centrifugare, microscopie, însămânțări ș. a.). Frontul minim de lucru pentru un tehnician este de 2 m liniari masă pe fiecare latură a literei «U», de unde rezultă necesară o suprafață de cca 10 m². Pentru activitatea concomitentă a 2 tehnicieni frontul de lucru trebuie să crească la 5,25 m masă pe latura dreaptă și cea stângă ale literei, ceea ce impune o suprafață minimă de 22 m² (figura 1.2).

Pentru laboratoarele mari, care funcționează cu mai mult de doi tehnicieni concomitent, cea mai eficientă este gruparea de module în «E» cu separarea lor parțială prin paravane longitudinale din sticlă (figura 1.2). Avantajele grupării modulelor de lucru în «E» sunt indiscutabile:

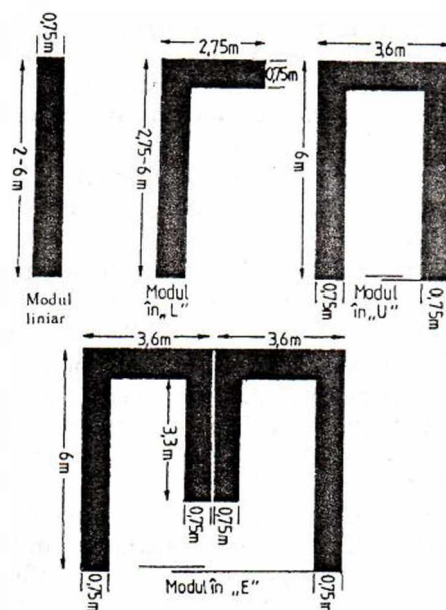


Fig. 1.2. Module de lucru pentru tehnicianul microbiolog, sugestii pentru configurații (după C. R. Baisden, 1985)

- front de lucru mai mare în raport cu suprafața ocupată;
- folosirea în comun de către 2—4 tehnicieni a incintelor pentru securitate microbiologică, a spațiilor de refrigerare, incubare etc.;
- utilizarea cărucioarelor prin spațiul comun în vederea aprovizionării modulelor de lucru cu materialele necesare elimină deplasările frecvente ale personalului;
- dă impresia individualității pentru fiecare tehnician, asigurând însă supravegherea permanentă a activității de către șeful laboratorului.

În compartimentul de spălare și condiționare a sticlăriei dispoziția instalațiilor, aparatelor, mașinilor și a meselor de lucru trebuie să asigure fluxul nestânjenit al materialelor de la autoclavă (ele) pentru sterilizarea recipientelor contaminate spre bacul (mașina) de spălare, rastelul (dulapul) de uscare, mesele de ambalare și etuva(ele) de sterilizare (vezi și 2.3.2). Dispoziția liniară în lungul pereților este satisfăcătoare. Aceeași dispoziție este eficientă și în compartimentul de preparare a mediilor de cultură și reactivilor, unde trebuie să existe o incintă sterilă cu aer laminar pentru condiționarea mediilor de cultură care nu mai suportă sterilizări până la utilizare (de exemplu, turnarea plăcilor cu medii agarizate).

1.2. CONSTRUCȚIA ȘI INSTALAȚIILE

Conductele și rețeaua electrică trebuie incluse în pereți, iar când nu este posibil, urmează să li se asigure un traseu pe pereții culoarului cât mai mare. *Pereții interiori* trebuie să fie netezi și să permită spălarea și dezinfecția periodică. *Tavanul* urmează să absoarbă cât mai bine sunetele, să fie neted, simplu, fără profiluri care rețin praf. *Dușumeaua* trebuie să fie rezistentă, fără fisuri, ușor de spălat și dezinfectat.

Ușile glisante reduc curenții de aer în încăperile cu risc de contaminare. *Ușile batante* trebuie să asigure accesul spre culoar în încăperile termostatate la 4 sau 37°C (figura 1.1).

Laboratorul necesită următoarele *instalații*: electrică, de gaz, de apă rece, caldă și deionizată, de încălzire și de aer condiționat. Existența unei instalații centrale de aburi condiționează folosirea autoclavelor orizontale moderne. În limita posibilităților, o instalație centrală de vacuum și una de aer comprimat ameliorează mult condițiile de lucru.

Instalațiile de aer condiționat și de încălzire trebuie să asigure temperatură și umiditate constantă pe tot parcursul anului, reducând la minimum curenții de aer în ariile de activitate.

Sistemele exhaustoare vor fi prevăzute pentru locurile de lucru unde apar vapori iritanți (manipularea unor reactivi), aburi (funcționarea autoclavelor, mașinilor de spălat etc.) sau mirosuri neplăcute (culturi ale bacteriilor anaerobe, enterobacteriacee).

Iluminarea corectă a locurilor de lucru, fără reflexe sau umbre supărătoare, asigură precizia manipulărilor. Pentru aceasta tehnicienii vor lucra în fața ferestrelor, iar corpurile de iluminat și tuburile fluorescente, care asigură lumină «de zi», vor fi fixate pe tavan. Sursele suplimentare de lumină pot fi plasate după necesitățile fiecărui loc de activitate.

Este foarte important ca instalația electrică să facă față sarcinii impuse de funcționarea concomitentă a aparatelor din laborator sau din restul clădirii (mai ales când în circuit intră mari consumatori ca aparatura radiologică, stația centrală de aer condiționat etc.) și să asigure curentul sub tensiune stabilizată. Prizele vor fi prevăzute la distanțe de 1,5—2 m una de alta în compartimentele de lucru, inclusiv în lungul fronturilor de lucru multimodulare.

Chiuvete din materiale necorozive cu instalație de apă rece și caldă trebuie prevăzute la extremitatea fiecărui modul de lucru al tehnicienilor. Bacurile din compartimentul de spălare a sticlăriei impun aceleași exigențe.

1.3. MOBILIERUL

Mai convenabil este mobilierul de tip modular, care poate fi confecționat din lemn, oțel sau masă plastică rezistentă.

Blatul meselor trebuie să fie neted, neinflamabil, impermeabil și necoroziv, pentru a fi ușor de spălat și dezinfectat. Culoarea neagră evită reflexele supărătoare și permite urmărirea facilă a culturilor în plăci Petri, a reacțiilor de aglutinare pe lamă etc. Sticla *Securit* neagră satisface toate aceste exigențe.

Dulapurile cu ușă glisantă plasate pe masă și sub masa de lucru asigură depozitarea materialelor necesare fiecărui modul de lucru. Este indicată și ancorarea lor la perete.

Rafturile sunt necesare spațiilor de depozitare. Pentru sticlărie, medii de cultură și chimicale necorozive, mai convenabile sunt cele din lemn sau aluminiu.

1.4. ECHIPAMENTUL

Repartiția echipamentului de laborator depinde de profilul fiecărui loc de activitate (tabelul 1.1).

1.4.1. Microscopae și lupe

Microscopul optic cu fond luminos intră în dotarea fiecărui modul de investigație microbiologică. *O lupă de mână* este necesară pentru examinarea coloniilor, iar *o lupă stereoscopică* facilitează urmărirea coloniilor foarte mici.

Pentru *microscopia cu fond negru, cu contrast de fază și cu fluorescență* este necesară *o cameră obscură*.

Amănunte privind microscopaele vezi în capitolul 5.

1.4.2. Incubatoare, băi de apă sau de nisip

Incubatoare de 35—37°C cu volume adecvate pot fi repartizate la fiecare modul de lucru. Cele reglate la alte temperaturi vor fi repartizate numai modulelor unde sunt necesare și pot fi utilizate în comun.

Camerele termostatare la 35—37°C sunt necesare pentru incubarea culturilor în volume mari sau /și celor cu creștere lentă (de exemplu, cultivarea micobacteriilor, hemoculturii etc.). Pot fi amenajate în încăperi mici, speciale sau în colțul unei încăperi mari. Dacă încăperea este prea înaltă, se va instala un tavan improvizat. Pereții vor fi bine izolați termic, iar ușa, glisantă prevăzută cu garnituri de etanșare. Instalația de încălzire electrică, termostată, trebuie să asigure repartiția uniformă a temperaturii, controlate prin termometre plasate la 0,5 și 2 m de la podea. Suprafețele interioare placate cu material plastic, dușumeaua din scândură de lemn tare, cât și rafturile din aluminiu trebuie să

reziste la umiditatea proprie acestor incinte, precum și la spălarea și decontaminările frecvente necesare combaterii prafului și a mucegaiurilor.

Băile de apă, pentru inactivarea unor suspensii microbiene și deocomplementarea serurilor sau incubarea unor reacții antigen-anticorp, trebuie termostatare și prevăzute cu capac, preferabil din sticlă, inclinat, pentru a permite scurgerea apei de condens.

Baia de nisip termostatare la 75—85°C este necesară pentru coagularea în pantă a unor medii de cultură și tyndallizarea lor.

Tablelul 1.1. Echipamentul compartimentelor din laboratorul de microbiologie

<i>Locul de muncă al microbiologului</i>	
Anse Pipete Pasteur Pensă Tampoane Baghete de lemn Etalon nefelometric Bec de gaz sau incinerator electric Lame și lamele de microscop Platină încălzitoare Stativ pentru colorații Baterie de coloranți și reactivi pentru microscopie Microscop, lupă Centrifugă și balanță pentru echilibrare Trompă de apă	Baie de apă Incubator Frigider Pipete gradate Propipete Plăci din material plastic cu godeuri pentru reacții serologice Eprubete Plăci Petri Stative pentru eprubete Țăvi pentru flacoane Containere pentru materialul contaminat Borcane pentru pipete contaminate Incintă de siguranță microbiologică
<i>Camera pentru receptura prelevatelor patologice¹</i>	
Registre Stative pentru eprubete Țăvi pentru flacoane Incubator de 37°C	Frigider Tampoane și recipiente pentru prelevarea probelor (sunt preluate prin delegații secțiilor din spital)
<i>Sectorul pentru spălarea și pregătirea sticlăriei</i>	
Autoclavă; de preferat verticală cu perete simplu Bacuri, lighene și căldări din plastic, seturi de perii și instalație pentru spălat pipete	Preferabil, o mașină pentru spălat sticlăria Dulap pentru uscat sticlăria spătată sau, în lipsă, rastele corespunzătoare Etuve Cutii pentru ambalarea materialelor de sterilizat
<i>Sectorul pentru prepararea/condiționarea mediilor de cultură și a reactivilor</i>	
Autoclavă (e) Baie de apă Baie de nisip Mic incubator de 60°C pentru testele biologice de sterilizare Balanță tehnică Balanță farmaceutică Balanță analitică Agitator electromagnetic	Pompă de vid sau trompă de apă Filtre sterilizante pentru lichide Distribuitoare pentru medii de cultură Incintă cu curent de aer laminar pentru repartiția aseptică a mediilor de cultură Seturi de recipiente pentru condiționarea mediilor de cultură și reactivilor
NOTĂ: În policlinici sectorul de receptură va fi prevăzut cu o cameră(e) pentru prelevarea probelor de la pacienții programați. Echipamentul necesar camerei de prelevare a probelor poate fi urmărit în capitolul 3, în funcție de nomenclatorul analizelor efectuate de laborator.	

1.4.3. Refrigeratoare

Frigiderile de 4°C cu volume corespunzătoare pot fi repartizate individual sau grupate pe module de lucru. Conservarea mediilor de cultură condiționate pentru lucru, a unor reactivi etc. în laboratoarele mari se face în *camere frigorifice*. *Conservatoarele de -25°C* vor fi instalate într-o încăpere separată.

1.4.4. Centrifuge

Centrifugele de 3 000 rot/min, care asigură sedimentarea bacteriilor din volume de 15—50 ml într-un interval de timp rezonabil, sunt suficiente pentru activitățile curente din laboratorul de microbiologie. Sunt de preferat cele cu rotor orizontal celor cu rotor angular, pentru că generează mai puțini aerosoli. Din aceleași motive de securitate microbiologică se vor folosi pentru centrifugare numai tuburi cu capac înșurubat sau aplicat. Câte o centrifugă, cu balanța pentru echilibrarea tuburilor, va fi repartizată la fiecare modul unde se impune sedimentarea bacteriilor și celulelor (examenul lichidului cefalorahidian, al urinei etc.).

Reguli pentru folosirea centrifugelor:

1. Se selectează două tuburi egale între ele ca lungime și grosime. În unul se repartizează fluidul de centrifugat, în celălalt, apă, la o înălțime egală, fără a depăși o limită de 2 cm sub buza tuburilor.

2. Se plasează tuburile în cupele perechi ale centrifugei și se așază vertical perechile tub—cupă în stativul de pe talerele balanței.

3. Folosind o pipetă Pasteur, se toarnă alcool de 70° în cupa mai ușoară până la echilibrare.

4. Se plasează în rotor, diametral opus, perechile cupă—tub echilibrate.

5. Se închide capacul centrifugei.

6. Se mărește treptat viteza de centrifugare până la accelerația dorită.

7. La sfârșit, se deschide centrifuga numai după oprirea completă a rotorului.

Precauții:

1. Se verifică dacă amortizoarele de cauciuc sunt în cupe; astfel se va evita spargerea tuburilor.

2. Se verifică echilibrul inițial al balanței.

3. Nu se va echilibra tubul de centrifugat cu un tub de altă formă sau cu un tub care conține material solid. Deși masele vor fi egale, poziția diferită a centrelor de greutate în timpul centrifugării va produce vibrații periculoase prin dezechilibrarea centrifugei.

4. Se verifică dacă perechile cupă—tub au fost plasate diametral opus, mai ales la rotoarele multiloculare.

5. Nu se centrifughează materialul infecțios în tuburi fără capac și nici în tuburi cu dop infundat, pentru că se va infunda și mai tare, cele de bumbac pătrunzând în fluidul din tub.

6. Nu se forțează cu mâna frânarea rotorului.

1.4.5. Balanțe

Sunt necesare următoarele tipuri de balanțe:

- Balanțe tehnice pentru prepararea mediilor de cultură, soluțiilor saline și a soluțiilor dezinfectante în volume mari.
- Balanțe farmaceutice pentru prepararea soluțiilor de coloranți și a soluțiilor de reactivi sau unor medii de cultură în volume mici.
- Balanță(e) analitică(e) pentru cântărirea exactă a antibioticelor etalon sau a unor reactivi în cantități mici.
- Balanțe pentru echilibrarea tuburilor de centrifugă: balanțe mici cu două talere prevăzute cu stativ pentru cupe.

1.4.6. Omogenizatoare, agitatoare, dispozitive de triturare a țesuturilor și rupere a celulelor

Curent, pentru triturarea și omogenizarea țesuturilor sunt folosite mojară sau, mai eficient pentru volume mici, tuburi Griffith. După caz, triturarea țesuturilor se poate face în stare nativă sau congelată, folosind sau nu substanțe abrazive (pulbere de cuarț, sticlă Pyrex etc.). În laboratoarele mari, pentru activitatea de cercetare pot fi utilizate omogenizatoare cu mare viteză cu cuțite și dezintegratoare ultrasonice.

Agitatoare rectilinii (cu mișcare de du-te-vino) sunt folosite mai des pentru aerarea culturilor bacteriene în bulion. Agitatoarele rotative tip Vortex sunt utile fiecărui tehnician pentru omogenizarea tuburilor cu suspensii bacteriene, pentru solvirea rapidă a unei substanțe în volume mici în eprubete, iar cele electromagnetice pentru a favoriza solvirea unor substanțe la o temperatură dată în volum mediu de diluent (în flacoane Erlenmeyer).

1.4.7. Aparate pentru distilarea apei

Aparatele pentru distilat apa necesară mediilor de cultură trebuie să fie din sticlă. Pentru alte destinații apa poate fi distilată și în aparate metalice.

1.4.8. Distribuitoare pentru medii de cultură

În laboratoarele mici se poate folosi un dispozitiv cu pâlnie sau o pipetă Chamberlain.

Dispozitivul cu pâlnie. La o pâlnie cilindrică sau conică de 1—2 l, prevăzută cu capac, se adaptează un tub de cauciuc sau plastic autoclavabil terminat cu un tub de sticlă etilat. O clemă, manipulată manual, deschide și închide circuitul. Întregul dispozitiv, sterilizat la autoclavă, este fixat pe un stativ de retortă și permite repartizarea în tuburi a unor volume aproximativ egale, prin comparație cu un tub martor, în care este măsurat volumul dorit. Volumele egale de mediu se pot repartiza semiautomat, dacă la dispozitivul cu pâlnie se adaugă o seringă. Asepsia însă nu poate fi garantată, deci dispozitivul nu poate fi folosit la repartizarea mediilor care nu se mai pot steriliza înainte de utilizare.

Pipeta Chamberlain este mai convenabilă pentru repartizarea în plăci a mediilor agarizate. Pipeta cu tubulatură anexată se sterilizează la autoclavă. Aspirând cu gura prin tubul A, mediul sterilizat este introdus în balonul B până la nivelul dorit. Pentru repartizare, tubul C se introduce în recipientul de umplut inclinând balonul B. Scurgerea mediului încetează când balonul B este readus la orizontală, pentru ca nivelul fluidului să

ajungă sub orificiul superior al tubului C.

Pentru repartizarea unor volume exacte de mediu în laboratoarele mari sunt indicate *aparate automate de repartizat*, care funcționează cu pompă peristaltică sau cu pompă tip seringă acționate prin pedală, manual sau electric.

1.4.9. Containere pentru materialul contaminat

Găleți cu capac din tablă de cupru sau emailată, cu diametre și forme corespunzătoare autoclavelor din sectorul de spălare a sticlăriei, sunt folosite pentru colectarea materialelor reutilizabile de la fiecare loc de lucru.

Saci din material plastic rezistent sunt utilizați pentru colectarea și transportul către autoclavă și subsecvent la incinerator, al materialelor de unică folosință contaminate. Acești saci vor fi evident marcați: «Material contaminat de laborator. Pericol de infecție». Vor avea o anumită culoare pentru a nu fi confunziți cu sacii în care se transportă halatele murdare ale personalului de laborator.

Borcane cu soluție dezinfectantă pentru colectarea pipetelor gradate reutilizabile, separat de pipetele Pasteur, lame și lamele de microscop sau alte articole mici de unică folosință, trebuie prevăzute pentru fiecare loc de lucru.

1.4.10. Aparatură și dispozitive pentru sterilizare și dezinfecție (vezi capitolul 2)

1.4.11. Incinte de siguranță microbiologică (vezi 1.5.5)

1.4.12. Echipament din sticlă, plastic și articole mici de laborator

Recipientele utilizate în microbiologie trebuie să fie din sticlă neutră, pentru a nu altera pH-ul conținutului, și suficient de groasă, pentru a evita contaminarea mediului prin spargerea lor.

Articolele din plastic sunt de două categorii: cu unică folosință și reutilizabile. Cele cu unică folosință, cum sunt cutiile Petri, containerele pentru prelevate patologice, ansele calibrate, se distrug prin autoclavare, de aceea sunt ambalate și sterilizate de către producător. Cele reutilizabile pot fi sterilizate prin autoclavare.

Eprubetele trebuie să aibă gura dreaptă, fără bor. Cele mai convenabile dimensiuni sunt 120 × 12 mm pentru volume de 2—4 ml mediu, 160 × 16 mm pentru volume de 5—10 ml, 200 × 20 mm pentru volume de 10—15 ml și 250 × 25 mm pentru volume de 20 ml.

Tuburile Durham sunt mici tuburi de sticlă de 25—30 × 5—6 mm închise la un capăt și introduse cu gura în mediul de cultură lichid pentru a detecta formarea de gaz.

Baloanele cu fund plat și flacoanele Erlenmeyer cu volume de la 100 până la 1000 ml sunt utilizate pentru păstrarea mediilor de cultură preparate.

Curent, în laboratoarele noastre eprubetele și flacoanele sunt bușate cu dopuri de vată nehidrofilă învelită în tifon. Protecția temporară de contaminare poate fi asigurată prin acoperire cu o foiță de aluminiu. Cea mai sigură este însă închiderea eprubetelor și

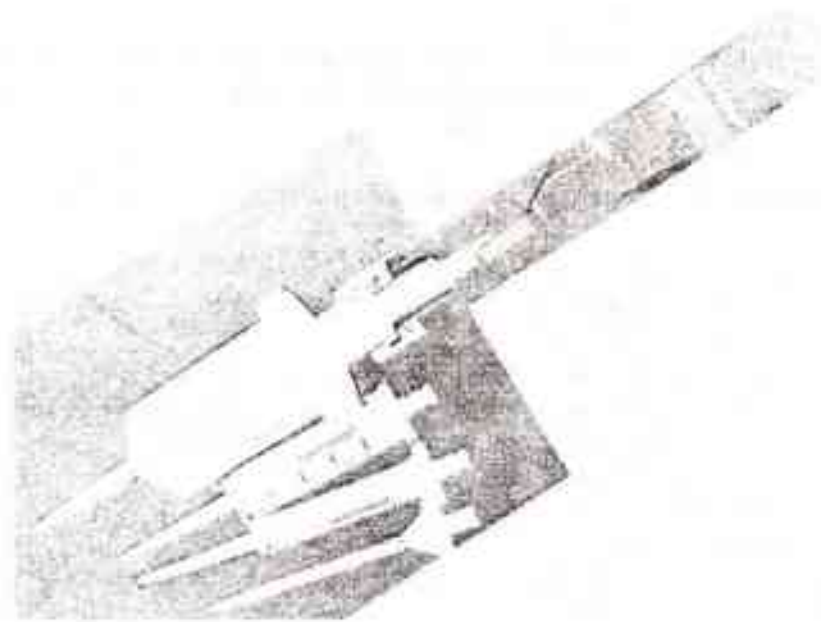


Fig. 1.3. Pipeta Ependorf digitală ajustabilă pentru volume variate

flacoanelor prin capace de polipropilenă înșurubate. Acestea sunt fabricate în diferite culori și sunt reutilizabile.

Cuții Petri. Cuțiile din sticlă sunt încă larg utilizate. Cele din sticlă borosilicat suflată nu se zgârie, sunt perfect plate și ușor de stivuit, dar sunt scumpe, fragile și impun atenție la spălare. Cele din sticlă presată sunt mai groase, au striuri și fundul mai mult sau mai puțin convex, se zgârie ușor, dar sunt mai ieftine și mai rezistente.

Cuțiile Petri din plastic cu utilizare unică sunt ieftine, perfect plate, ușor de manipulat și stivuit, dar presupun o industrie specializată capabilă să le producă.

Recipiente pentru prelevate patologice. În țările dezvoltate se folosesc containere universale din plastic dispozabil, cu volum de 28 ml și capac înșurubat. Pentru probele cu volum mare sunt indicate borcane rezistente cu capac înșurubat. În lipsa acestor facilități se poate recurge la flacoane farmaceutice cu gură largă și capac înșurubat, borcane din sticlă cu volum de 200—400 ml și capac înșurubat sau aplicat (mai puțin sigur).

Pipete Pasteur. Furnizorii industriali oferă pipete Pasteur din sticlă sau polipropilenă scurte și lungi, cu calibrul de 6—7 mm. Acestea se sterilizează, ca și pipetele gradate, ambalate în cutii de aluminiu. În lipsă, pot fi manufacturate în laborator din tub de sticlă.

Pipetele gradate din sticlă cu capacitate de 1; 2; 5; 10 și 25 ml se folosesc bușate cu vată nehidrofilă la extremitatea de sucțiune pentru a preveni contaminarea fluidului pipetat cu microbi din propipetă. Eventualele mustăți de vată din afara orificiului trebuie arse în flacăra înainte de a adapta pipeta la propipetă, altfel adaptarea nu este etanșă din cauza vatei prinse între sticla pipetei și propipetă și se va pierde din conținutul pipetei.

Propipetele. În laboratorul de microbiologie aspirarea cu gura a fluidului în pipete este interzisă. Pipetarca se va face numai cu propipete. Cea mai simplă propipetă este o pară de cauciuc adaptată la extremitatea de sucțiune. Pipetări exacte și mai comode permite

o pară de cauciuc prevăzută cu supape sau diferite tipuri de propipete automate cu volume reglabile, la care se adaptează pipete gradate sau vârfuri din plastic disposable (figura 1.3).

Lame și lamele de microscop. Pentru necesitățile microscopiei în microbiologie sunt suficiente lamele cu margini simple, mai ieftine decât cele cu margini polisate. Reamintim că obiectivele puternice sunt corectate numai pentru laméle cu grosimea de 0,17 mm (sau nr. 1), de formă pătrată, livrate în cutiuțe cu 100 bucăți.

Stative și panere. Pentru tuburi și flacoanele cu medii de cultură sunt indicate stative autoclavabile din propilenă sau metal acoperit cu propilenă, care reduc riscul spargerii eprubetelor, un dezavantaj al stativelor din metal. Stativele din lemn sunt neigienice.

Coșurile din sârmă sunt riscante pentru incubarea și transportul eprubetelor cu culturi: riscul spargerii și scurgerii lichidului. Pentru eprubete sunt mai convenabile cutii din propilenă, iar pentru flacoane, tăvi din aluminiu dimensionate pentru 10—100 flacoane, după calibrul lor. Coșurile din sârmă rămân rezervate numai recipientelor cu material neinfecțios.

Firul de însămânțare este confecționat din sârmă inoxidabilă de platină sau crom-nichel cu grosime în funcție de consistența materialului microbial de manipulat. Este fixat într-un portfir din metal, care trebuie ținut perfect curat prin frecare periodică, ușoară, cu șmirghel fin, a extremității inferioare pentru îndepărtarea materialului carbonizat. Portfirul din sticlă este contraindicat.

Firul drept (perfect drept) se utilizează pentru însămânțări prin înțepare, *ansa* (firul buclat la o extremitate), pentru însămânțarea în medii lichide și pentru epuizarea inoculului în striuri pe suprafața mediilor solide, iar *firul spatulat*, pentru manipularea coloniilor microbiene cu consistență deosebită (figura 1.4).

Etalorul de inoculum este o baghetă din sticlă cu diametrul de 3—4 mm cudadă în L prin încălzire în flacără la cca 36 mm de extremitate. Se folosește pentru cantificarea bacteriilor prin dispersia uniformă pe placa cu mediu agarizat a unui volum dat de inoculum.

Becuri de gaz. Becurile Bünsen oferă o flacără cu temperaturi de la 700 la 1000°C, în funcție de aerare, care se face la presiunea atmosferică, prin două orificii diametral opuse la partea inferioară a becului. Becurile Mecker oferă o flacără mai mare și mai fierbinte: de la 700 la 1200°C, când aerarea se face la presiunea atmosferică, prin coroana de orificii de la baza becului, sau 1700°C, când arderea se întreține cu aer comprimat.

Alte articole de dimensiuni mici necesare locului de lucru al microbiologului. Pensa de disecție, bisturiul, foarfecile pot fi ținute la dispoziție, împreună cu ansele, într-un pahar conic. Tampoanele de vată similare celor pentru prelevarea exsudatelor de pe suprafețe (figura 3.1) sunt necesare etalării inoculului pentru antibiograma difuzimetrică. Tijele porttampon din lemn (baghete) sterilizate în cutii de aluminiu sunt utile pentru manipularea probelor de spută, bucățile de pânză pentru dezinfecția curentă a suprafețelor sau după scurgeri accidentale de material infecțios.

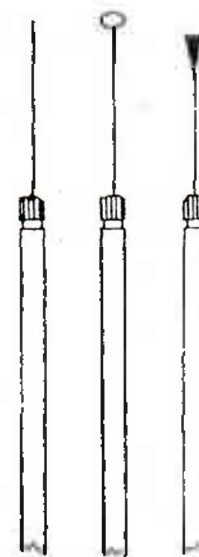


Fig. 1.4. Fire pentru însămânțare

1.5. REGULI DE COMPORTARE ȘI REGIMUL ANTIEPIDEMIC

Activitatea în laboratoarele de microbiologie implică riscul contractării unor infecții, care pot fi grave. Prevenirea infecțiilor de laborator și răspândirii lor eventuale în colectivitate impune cunoașterea:

- riscului potențial reprezentat de microorganismele manipulate;
- căilor prin care ele pătrund în organism;
- metodelor corecte de limitare a accesului acestor organisme la căile de transmitere și porțile de intrare în organism.

1.5.1. Clasificarea microorganismelor în funcție de riscul infecțios

Organizația Mondială a Sănătății clasifică agenții infecțioși în patru grupe de risc infecțios individual și pentru colectivitate (tabelul 1.2).

Tabelul 1.2. Clasificarea agenților infecțioși în raport cu riscul infecției de laborator (după O. M. S., 1983)

Grup	Risc	Exemple
I	Individual redus Colectiv redus	Microbi nepatogeni pentru adultul sănătos; posibil oportuniști pentru gazda imunocompromisă: <i>Staph. epidermidis</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , vaccinuri vii atenuate:
II	Individual moderat Colectiv redus	<ul style="list-style-type: none"> ■ Nematode (stadii infective), trematode, cestode, protozoare parazite pentru om ■ Fungi dermatofiji sau oportuniști ■ Bacterii: <ul style="list-style-type: none"> Bacili dizenterici Bacil difteric Bacili tifici <i>Clostridium tetani</i> Salmonele netifoidice Micobacterii condiționat Vibrioni patogene Stafilococi aurii Spirocheși Pneumococi <i>Legionella</i> ■ Virusuri: <ul style="list-style-type: none"> Virusul gripal Enterovirusuri Herpesvirusuri umane Agenți ai encefalopatiei Poxvirusuri spongiforme transmisibile (altele decât virusul variolei) ■ Numai pentru microscopie, izolare și identificare uzuală: <ul style="list-style-type: none"> Streptococi plogeni <i>Yersinia pestis</i> Meningococi <i>Bacillus anthracis</i> Gonococi <i>Clostridium botulinum</i> <i>Pseudomonas pseudomallei</i> Virusul CML ■ Numai la microscopia și insămânțarea prelevatelor patologice: <ul style="list-style-type: none"> Bacilii tuberculozei <i>Brucella</i> <i>Francisella tularensis</i> Fungi dimorfi ■ Numai la manipulări nonpropagative (serologie, colorarea amprentelor de organe): <ul style="list-style-type: none"> Rickettsii (tifos exantematic, Virusurile hepatitelor febre pătate) B, C <i>Coxiella burneti</i> HIV

Tabelul 1.2 (continuare)

Grup	Risc	Exemple
III	Individual mare Colectiv redus	<ul style="list-style-type: none"> ■ De la inoculare până la identificare: Rickettsii (tifos, febre pătate) <i>Coxiella burneti</i> ■ Numai la manipularea culturilor: Bacilii tuberculozei <i>Brucella</i> <i>Francisella tularensis</i> ■ Numai la manipularea materialelor cu spori infecțanți (sol, cultura formelor filamentoase): Fungi dimorfi ■ Numai când există risc de aerosoli: concentrare de material infecțios, manipularea culturilor în cantități mari: Gonococ <i>Pseudomonas pseudo-</i> Meningococ <i>mallei</i> <i>Bacillus anthracis</i> Virusurile hepatitelor B,C <i>Clostridium botulinum</i> Virusul CML ■ Numai când este risc de aerosoli sau se manipulează tui- pini rezistente la antibiotice: <i>Yersinia pestis</i>
IV	Individual mare Colectiv mare	Virusurile febrei hemoragice: Junin, Marburg, Congo-Crimea, Omsk, Lassa, Ebola, Machupo Virusul encefalitei acariene de primăvară-vară

1.5.2. Cai de transmitere și porți de intrare în organism ale infecțiilor de laborator

Agenții infecțioși pătrund în organism prin mucoasa digestivă (ingestie), prin pulmoni (inhalare), prin piele (injectare) și prin conjunctiva oculară (tabelul 1.3).

Riscul ingestiei de agenți infecțioși apare în cursul pipetării cu gura, a introducerii în gură a degetelor și obiectelor de pe mesele de laborator (creioane, țigări, alimente) contaminate prin scurgeri sau stropiri neobservate ori fiind insuficient dezinfectate.

Tabelul 1.3. Doze infecțioase pentru 25–50% din voluntari (după W. E. Barkley și A. G. Wedum, 1977)

Boală sau agent cauzal	Cale de pătrundere	Doză ¹
Febră Q	Inhalare	10
Tularemie	Inhalare, transcutan, ingestie	10
Sifilis	Intradermic	57
<i>Shigella flexneri</i>	Ingestie	180
Antrax	Inhalare, transcutan, ingestie	1300
Febră tifoidă	Ingestie	10 ⁵
<i>Shigella sonnei</i>	Ingestie	≥10 ⁵
Holeră	Ingestie	10 ⁶
<i>Escherichia coli</i>	Ingestie	10 ⁸

¹Doza în număr de organisme

Riscul inhalării apare la manipulări generatoare de aerosoli ale materialelor

infecțioase (tabelul 1.4). Mari generatoare de aerosoli sunt culturile liofilizate la deschiderea sau spargerea fiolelor (1 215 particule viabile/m³ aer, respectiv 43 551/m³) sau spargerea unor flacoane cu cultură (13 959 particule viabile/m³).

Tabelul 1.4. Rangul particulelor viabile din eșantioane de aer prelevate în cursul unor proceduri de laborator sau accidente generatoare de aerosoli (după W. E. Barkley și A. G. Wedum, 1977)

Procedură de laborator	Particule viabile
Pipetarea a 50 ml cultură în eprubetă de 50 ml	0—5,5
Scoaterea dopului de bumbac de la un tub centrifugat	0,8—5,0
Scoaterea dopului de bumbac umezit după agitarea unui flacon	0—35
Epuizarea inoculului pe placă Petri	0—20
Introducerea ansei fierbinți în 100 ml cultură	6—24
Decantarea într-un flacon a culturii centrifugate	0—115
Agitarea unei culturi în omogenizator cu capacul insuficient strâns	77—1246
Spargerea unui tub de 50 ml în centrifugă	80—1800

Stropii de fluid infecțios ajunși în ochi pot determina infecții grave.

Transmiterea transcutană a infecțiilor de laborator se poate realiza prin înțepături cu ace de seringă, pipele Pasteur sau cioburi de sticlă contaminate, prin contaminarea plăgilor tăiate, zgâriate, a abraziunilor, chiar minuscule, nesensizate.

Infecțiile de laborator sunt contractate pe căi diferite și cu doze mai mari decât în mod natural. De aceea evoluția lor este atipică și frecvent gravă.

1.5.3. Clasificarea laboratoarelor în funcție de exigența siguranței antiinfecțioase

Un laborator este autorizat să manipuleze microorganisme cu un anumit grad de risc numai în măsura în care personalul este pregătit, are dotările necesare și poate aplica metodele de siguranță pentru a preveni răspândirea agenților infecțioși în mediul unde sunt manipulați sau menținuți. Organizația Mondială a Sănătății a stabilit patru niveluri de exigență: nivelurile 1 și 2 corespund laboratoarelor de bază, nivelul 3 laboratoarelor cu regim restrictiv și nivelul 4 celor cu regim de maximă restricție (tabelul 1.5).

Nivelurile 1 și 2: laboratoarele de bază în care se manipulează microorganisme cu risc de gradul I sau II. Exigentele privind construcția, instalațiile, mobilierul și echipamentul sunt cele prezentate mai sus (vezi 1.1—1.4). Siguranța antiepidemică este asigurată dacă în aceste condiții de dotare și facilități se utilizează o bună tehnică microbiologică (vezi capitolele 2, 3, 6, 10), iar intrarea în toate spațiile cu risc biologic este corect marcată (figura 1.5).



Fig. 1.5. Semnul internațional pentru risc biologic

Tabelul 1.5. Clasificarea laboratoarelor după nivelurile de exigență ale siguranței antiinfecțioase (după O. M. S., 1983)

Grupe de risc	Laboratoare		Exigențe impuse	
	clasifi- care	exemple	regim de activitate	echipament de siguranță
I	Nivel 1: de bază	Din învățământul secundar	BTM ¹	Fără. Lucru pe masă des- chisă
II	Nivel 2: de bază	Clinice De sănătate publică Din învățământul universitar	BTM plus halat de protecție; semnalizarea riscului biologic	Lucru pe masă deschisă plus incintă de siguranță pentru activități generatoare de aerosoli
III	Nivel 3: regim restrictiv	Din laboratoare de analiză specializate	Nivelul 2 plus halat, mască, mănuși de protecție și acces controlat	Incintă de siguranță pentru toate activitățile
IV	Nivel 4: regim de maximă restricție	Din laboratoare care lucrează cu microorganisme foarte periculoase	Nivelul 3 plus control strict al evacuării aerului, apelor reziduale și materialelor dis- pozabile	Incintă de siguranță de clasa III

¹ BTM: Bună tehnică microbiologică.

Nivelul 3: laboratoarele cu regim restrictiv, în care se manipulează microorganisme cu risc de gradul III. **Exigențe:**

- controlul strict al comunicării încăperilor; nu se admit tavane improvizate și alte comunicări între încăperi decât prin ușă care poate fi zăvorâtă;
- ventilație în sens unic cu presiune negativă în camerele de lucru și filtrarea aerului extras din încăperi;
- manipularea microorganismelor numai în incinte de siguranță contra aerosolilor (clasele I și II);
- semnalarea riscului biologic (figura 1.5) la intrarea încăperilor și acces restrictiv în încăperi.

Nivelul 4: laboratoarele cu regim de maximă restricție, în care se manipulează microorganisme cu risc de gradul IV, funcționează în regim de *exigență specială* care depășește scopurile acestei cărți.

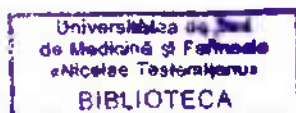
1.5.4. Barierele antiinfecțioase

În laboratoarele de microbiologie diferențiem trei bariere antiinfecțioase:

- bariere primare, care previn răspândirea unui microb în laborator;
- bariere secundare, care protejează personalul în cazul depășirii accidentale de către microorganisme a barierelor primare;
- bariere terțiare, care previn răspândirea în comunitate a microorganismelor care au depășit barierele primare și secundare.

Barierelor primare reunesc tehnici și echipamente prin care se previne formarea de aerosoli și accesul microorganismelor la personal:

1. Toate prelevatele patologice și umorile organismului sunt potențial infectante. Se etichetează cu însemnul riscului biologic probele care provin de la pacienți cu SIDA și cu hepatite sau pot conține alte microorganisme din grupele III și IV de risc.



2. Nu se pipetează cu gura. Se folosesc numai propipete sau dispozitive de pipetare.
3. La locul de lucru, nu se introduce în gură nici un obiect: propipete tubulare, etichete, creioane, pixuri, țigări, pipă, degete, alimente, băuturi.
4. Se restrânge la strictul necesar folosirea obiectelor ascuțite: ace de seringă (dacă pot fi înlocuite cu canule), pipete Pasteur din sticlă (dacă pot fi înlocuite cu pipete capilare din plastic).
5. Sticlăria ciobită sau cu fisuri se înlocuiește.
6. Se respectă întocmai tehnica de centrifugare a materialului infecțios. Suspensiile microorganismelor din grupele III și IV de risc se centrifughează numai în centrifugă cu cupe închise.
7. Se folosesc numai anse de inoculare complet închise, cu buclă de maximum 3 mm, pentru a evita descărcarea spontană, și firul nu mai lung de 5 cm, pentru a reduce vibrațiile care pot descărca materialul manipulat.
8. La manipularea cu anșa a materialelor vâscoase (de exemplu spută) sau puțin aderente la spatulă (de exemplu culturi de micobacterii) firul se descarcă, înainte de înroșire, într-un flacon cu nisip spălat și alcool de 96°C. Astfel se evită împrăștierea pe masă de particule infecțioase la introducerea firului în flacăra. Alternativ, se folosește un bec Bunsen cu flacăra înconjurată de un cilindru din sticlă de borosilicat.
9. Se verifică dacă omogenizatoarele folosite nu elimină aerosoli în cursul funcționării. Se efectuează toate omogenizările, inclusiv cele în mojar sau tub Griffith, pe un pătrat de 40/40 cm din hârtie de filtru imbibată cu soluție dezinfectantă (vezi 2.2.2).
10. Se asigură permanent la locul de lucru un recipient cu soluție dezinfectantă activă (vezi 2.3.1).
11. Se dezinfectează masa și suprafețele de lucru la terminarea activității și după orice vărsare de produs infecțios sau de câte ori se suspectează o contaminare accidentală.
12. La spargerea accidentală a unui recipient cu cultură sau produs patologic, locul se acoperă cu o pânză și se toarnă deasupra o soluție dezinfectantă. Se lasă pe loc 30 minute. Măinile se protejează cu mănuși și, folosind un cardon rigid, se trag resturile pe un fâraș pentru autoclavare.
13. La fiecare loc de lucru se folosesc:
 - găleți cu capac (sau pungi fixate în găleți) pentru colectarea separată a materialelor reutilizabile și de unică folosință contaminate; acestea se înlocuiesc și se autoclavează zilnic;
 - borcane cu soluție dezinfectantă pentru pipete și mici obiecte reutilizabile, care se golește zilnic, pentru decontaminare în continuare, și se toarnă soluție dezinfectantă proaspătă.
14. Nici un material contaminat după folosire nu părăsește laboratorul înainte de a fi sterilizat.
15. Microorganismele din grupul III de risc se manipulează numai dacă laboratorul este autorizat și numai în incinte de siguranță.
16. Pentru prelevarea și transportul probelor se folosesc numai recipiente rezistente, de preferat incasabile, bine închise.
17. Pentru expedierea prin poștă se ambalează și se etichetează materialul infecțios conform instrucțiunilor O. M. S. (1983), reglementărilor poștale naționale și internaționale.

Barierile secundare protejează personalul de microorganisme scăpate prin barierele primare.
1. În tot timpul activității se poartă halat, șorț și capelină de protecție curate, corect încheiate și legate. Echipamentul de protecție se păstrează separat de hainele și lenjeria pentru exterior.

La manipularea probelor provenite de la bolnavi cu hepatită sau SIDA sau care conțin alte microorganisme din grupul III de risc se poartă șorț din plastic peste lenjeria de protecție și se îmbracă mănuși chirurgicale din cauciuc.

2. Se dezbracă și se lasă la locul de lucru echipamentul de protecție ori de câte ori ne deplasăm în alte zone de activitate (vestiar, birou, cantină etc.).

3. Se spală mâinile după manipularea materialelor infecțioase și înainte de a părăsi locul de lucru. Este de dorit, pentru aceasta, o chiuvetă separată de cea de la masa de lucru.

4. Se protejează sub pansament hidrofob orice soluție de continuitate de pe tegumentul expus (abraziuni, zgârieturi, tăieturi).

5. Tot personalul se supune controlului medical periodic.

6. Se raportează șefului de laborator și cabinetului medical orice boală intercurentă. Poate fi o infecție profesională.

7. Se comunică aceluiași autorități:

- sarcina imediat după ce survine; poate fi contraindicată manipularea anumitor microorganisme;

- eventualele tratamente cu steroizi sau medicamente imunosupresive; pot fi o contraindicație pentru continuarea activității în mediul cu risc infecțios.

8. Tot personalul urmează să fie supus vaccinărilor programate de conducerea unității.

9. În laboratoarele unde se manipulează bacilii tuberculozei personalul trebuie să fie vaccinat BCG sau controlat tuberculinopozitiv și supus anual controlului radiologic preventiv.

Barierile terțiare reunesc echipamente și facilități de protecție suplimentară a personalului și prevenție a răspândirii agenților infecțioși în afara laboratorului: incintele de siguranță microbiologică, controlul curenților de aer creați prin instalațiile de ventilație și încălzire, filtrele exhaustoarelor de aer, instalațiile de neutralizare a apelor reziduale.

1.5.5. Incintele de protecție microbiologică

Incintele de securitate microbiologică au rolul de a capta și reține aerosolii infectanți, care apar în cursul unor manipulări, protejând astfel personalul de inhalarea acestora. Se împart în clasele I, II și III. Cele din clasele I și II se folosesc pentru manipularea microorganismelor din grupul III de risc în laboratoarele clinice și în laboratoarele cu regim restrictiv, iar cele din clasă III pentru manipularea microorganismelor din grupul IV de risc. Operatorul lucrează cu mâinile și antebrațul în interiorul incintei și observă mișcările printr-o fereastră.

În incinta de clasă I aerul, pus în mișcare de un ventilator, pătrunde frontal și antrenează aerosolii printr-un filtru, după care este eliminat în atmosferă, unde eventuale particule nereținute de filtru sunt făcute inofensive prin diluție. Incinta este eficientă la un flux al aerului cu minimum 0,75 m/s. Filtrele trebuie schimbate când fluxul de aer scade sub această viteză. Un indicator de flux și un avertizor monitorizează funcționarea incintei.

Incinta de clasă II asigură recircularea prin filtre a 70% din aer, încât suprafața de lucru este scăldată cu aer practic steril. Aproximativ 30% din aer este eliminat în atmosferă complet debarasat de aerosoli și este înlocuit cu aer din cameră antrenat spre filtrele de la intrarea incintei fără a ajunge ca atare în aria de lucru. În lipsa unei boxe cu flux laminar de aer, pentru turnarea aseptică a unor medii de cultură, se poate folosi o incintă de siguranță de clasă II.

Incinta de clasă III este complet închisă. Operatorul își introduce mâinile în aria de lucru prin mănuși fixate etanș la aparat. Aerul este admis și evacuat prin filtre.

La amplasarea incintei de securitate microbiologică în încăperi trebuie evitați curenții de aer creați de circulația personalului, de ușă sau fereastră. Amănunte privind verificarea fluxului de aer, schimbarea filtrelor și dezinfecția acestor incinte pot fi găsite în cărțile tehnice însoțitoare.

Pentru o funcționare eficientă, în incintă se introduc numai materialele strict necesare. Manipulările se fac în mijlocul ariei de lucru. Sunt interzise surse de căldură (flacăra, microincineratoare), pentru că perturbă fluxul de aer; se lucrează cu anse dispozabile din material plastic. Măinile se scot din incintă numai după 2—3 minute de la terminarea lucrului, interval necesar aspirării aerosolilor, și, imediat, sunt spălate până la cot, având în vedere o contaminare posibilă în cursul lucrului.

1.5.6. Regimul substanțelor toxice, corozive și inflamabile

Toate flacoanele care conțin asemenea substanțe, ca și locurile de depozitare a lor, vor fi marcate prin etichete cu însemnele convenționale categoriei (toxic, inflamabil). Instrucțiuni suplimentare vor fi afișate după caz (de exemplu, fumatul și flacăra deschisă interzise). În rețetele pentru prepararea reactivilor, asemenea ingrediente vor fi semnalate cu mențiunea «precauție».

1.5.7. Aspecte organizatorice

Accesul la orice activitate în laboratorul de microbiologie este condiționat de însușirea, verificată, a instrucțiunilor privind regimul antiepidemic specific. Șeful laboratorului poate delega un subordonat pentru realizarea programului de securitate a activității în diferitele compartimente ale laboratorului, dar rămâne unic responsabil pentru eficiența lui și pentru eventuale incidente și accidente.