Разработка подходов к снижению плесневой контаминации CO2-инкубаторов

Выполнила:
Студентка IV курса, 406 группы
Мухортова А.А.
Научный руководитель:
к. б. н. Апрышко В.П.

2016

CO2-инкубатор

- Повышенный уровень CO2 (5-7%);
- Температура 37 °C;
- Относительная влажность 100%;

Цель работы

Изучить микотическую контаминацию CO_2-инкубаторов и разработать подходы к ее снижению на примере CO_2-инкубаторов ThermoForma в лаборатории клиники репродукции человека «Альтравита».

Задачи

- изучить имеющиеся литературные данные по микотической контаминации влажных CO2-инкубаторов;
- выделить и определить виды грибов, вызывающие контаминацию инкубаторов;
- определить источник заражения влажных CO2-инкубаторов в лаборатории ЭКО;
- оценить возможную опасность для эмбрионов при контаминации;
- изучить рекомендуемые методы дезинфекции инкубаторов и оценить, применимы ли эти методы при культивировании эмбрионов человека;
- разработать режим деконтаминации влажных CO2-инкубаторов.

Aspergillus niger

Таксономическое положение:

- Царство Fungi
- Отдел Ascomycota
- Класс Eurotiomycetes
- Порядок Eurotiales
- Семейство Trichocomaceae

Токсины: охратоксин, мальформин А

Paecilomyces variotii

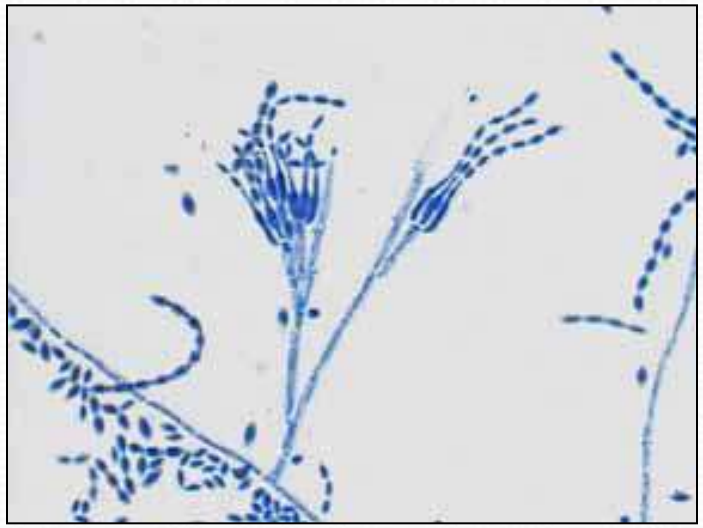
Таксономическое положение:

- Царство Fungi
- Отдел Ascomycota
- Класс Eurotiomycetes
- Порядок Eurotiales
- Семейство Trichocomaceae

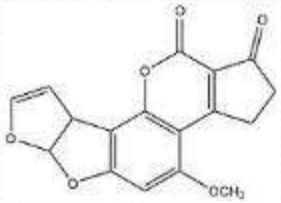
Токсины: неизвестны

Aspergillus fumigatus

Токсины: спорыньевые алкалоиды фестуклавин, фумигаклавин А, В, С, элимоклавин, ханоклавин I; тирамин; нейротоксины, вызывающие смертельную форму уремии, вещества, обладающие гемолитическими свойствами

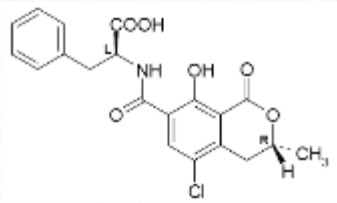


Влияние микотоксинов на эмбриональное развитие

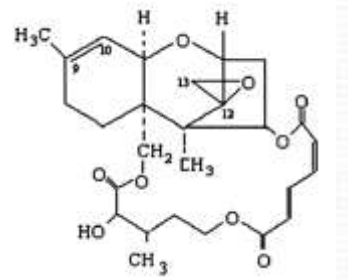


Афлатоксин B1

- Деструкция клеток;
- Подавление роста клеток;
- Ингибирование синтеза белка и ДНК;
- Снижение митотической активности;
- Хромосомные аберрации;
- Нарушение структуры мембран;
- Инициация липидного переокисления;
- Запуск апоптоза.



Охратоксин А



Трихотецен типа С

Методы дезинфекции CO2-инкубаторов и их ограничения

Дезинфектант	Ограничения
Мыльный раствор	Неэффективен против многих контаминантов
Biocidal ZF	Содержит хлорид бензалкония, его контакт с гиалуронатом в составе питательных сред Недопустим . Кроме того, производителем запрещено использование хлорных соединений при дезинфекции инкубатора.
Дезинфектанты, содержащие хлор	Производителем запрещено использование хлорных соединений при дезинфекции инкубатора. Крайне опасен для эмбрионов
Спирт	Крайне опасен для эмбрионов
Формальдегид	Крайне опасен для эмбрионов

Отбор проб

С полок и стенок каждого из 24 рабочих инкубаторов стерильным ватным тампоном брали по одной пробе методом мазка с поверхности (всего 6 проб с каждого инкубатора). Также были протестированы на наличие микроорганизмов упаковки, полки, стеклянные дверцы и стенки 8 новых (не введенных в эксплуатацию) CO_2-инкубаторов. Каждую пробу высевали на чашку Петри с сусло-агаром. Чашки инкубировали 7 - 14 дней при комнатной температуре

Отбор проб

Воздух в лаборатории проверяли на наличие контаминанта инкубатора аспирационным методом с помощью прибора Кротова. Исследуемый воздух при помощи центробежного вентилятора, вращающегося со скоростью 4000-5000 об/мин, засасывается в щель прибора и ударяется о поверхность открытой чашки Петри со средой. Содержащиеся в воздухе микроорганизмы оседают на питательный агар. Для равномерного распределения микроорганизмов по всей поверхности столик с находящейся на нем чашкой вращается. Из прибора воздух выводится через воздухопроводную трубку, которая соединена с ротаметром, показывающим скорость протягивания воздуха через прибор.

Отбор воздуха производили в шести точках лаборатории. В каждой точке отбирали по три пробы воздуха в пяти повторностях - общий объем воздуха в пробе составлял 100, 500 и 1000 л соответственно. Чашки инкубировали 7 – 14 дней при комнатной температуре.

Отбор проб

Воду из водяной рубашки 24 рабочих инкубаторов отбирали стерильной одноразовой пипеткой Пастера, пробу объемом 1 мл наносили на чашку Петри со средой сусло-агар и равномерно распределяли по всей поверхности стерильным шпателем, в пяти повторностях. Чашки инкубировали 7 – 14 дней при комнатной температуре.)

Состав сред коммерческих бакпечаток HiTouch FlexiPlate

Состав среды FL010

Компонент среды	Грамм/л
Биопептон	10,00
Дрожжевой экстракт	9,00
Глюкоза	50,00
Сульфат магния	2,10
Дигидроортофосфат калия	2,00
Диастаза	0,05
Гидрохлорид тиамина	0,05
Краситель-индикатор	0,026
Агар	15,00

Состав среды FL009

Компонент среды	Грамм/л
Пептон	23,00
Дрожжевой экстракт	2,00
Хлорид натрия	5,00
Лецитин	1,00
Полисорбат 80	7,00
Глюкоза	1,00
Бисульфит натрия	0,10
Краситель-индикатор	0,10
Агар	15,00

Состав сред коммерческих бакпечаток HiTouch FlexiPlate

Состав среды FL006

Компонент среды	Грамм/л
Экстракт картофеля	200,00
Глюкоза	20,00
Краситель-индикатор	0,03
Агар	15,00

Состав среды FL011

Компонент среды	Грамм/л
Грибной пептон*	10,00
Глюкоза	40,00
Агар	15,00

*Грибной пептон – смесь животных и растительных пептонов для обильного роста микотических организмов

Контаминанты новых инкубаторов

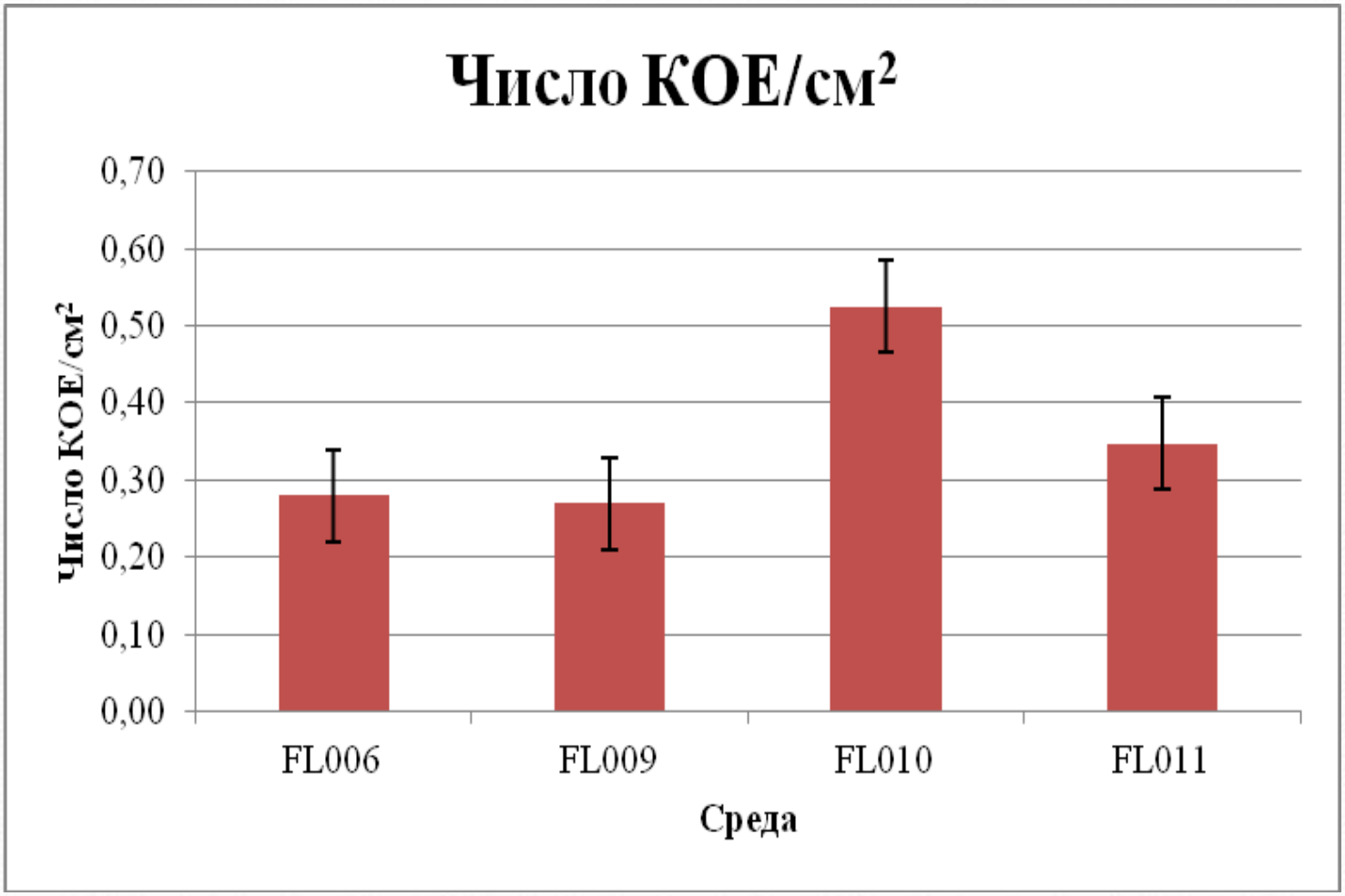
Контаминанты 8 новых (не введенных в эксплуатацию) инкубаторов и их составных частей:

- *Neurospora crassa* Shear and B.O.Dodge
- *Penicillium* sp. Link
- *Rhizopus* sp. Ehreb.
- *Fusarium* sp. Link
- *Aspergillus niger* Tiegh.
- *Paecilomyces variotii* Bainier

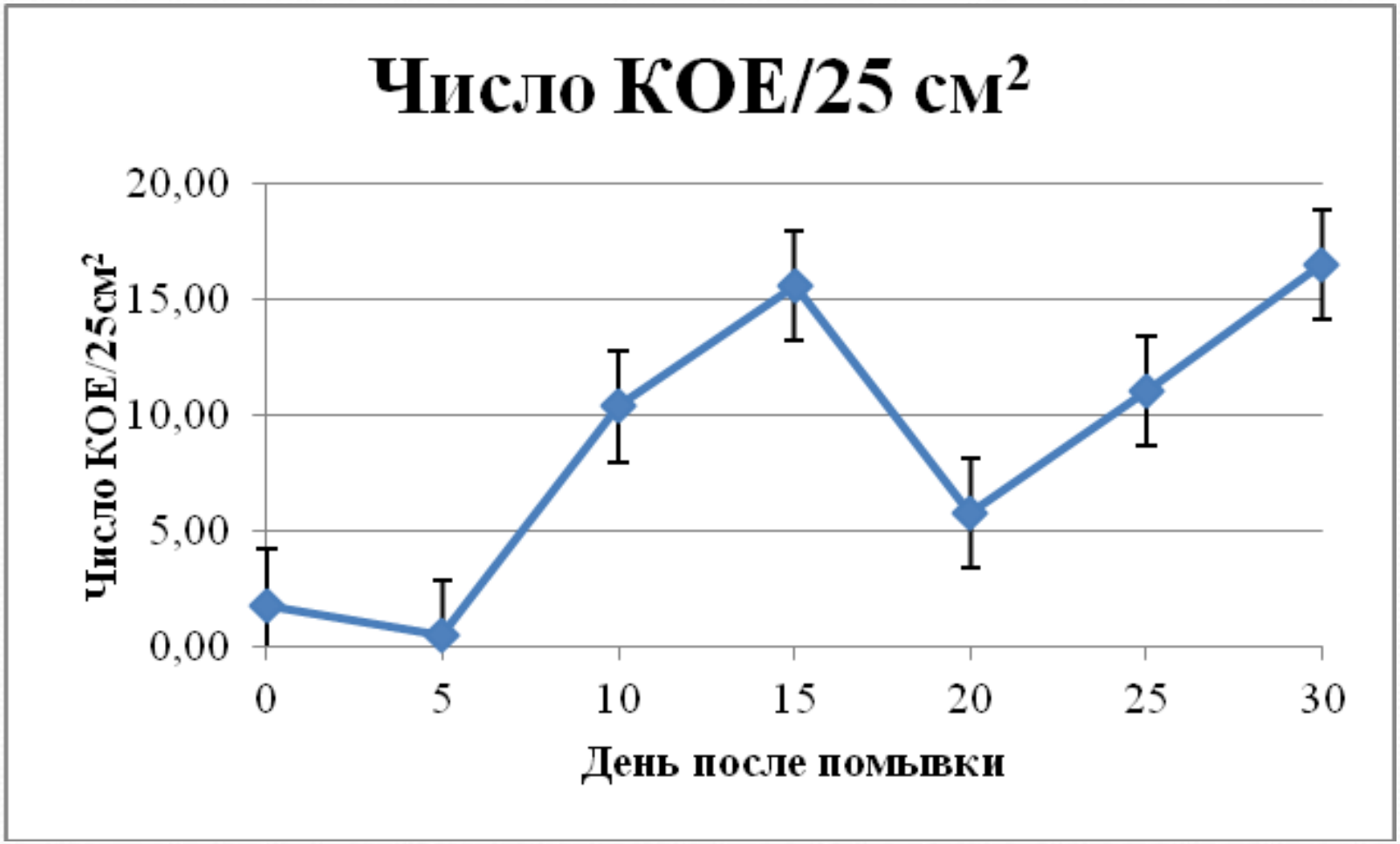
Число КОЕ/м3 воздуха лаборатории

Объем исследуемого воздуха (л)	Число повторностей	Общее число КОЕ	Число КОЕ на пробу	Число КОЕ/м3
100	14	2	0,14	1,43
500	9	5	0,56	1,11
1000	9	10	1,11	1,11

Число КОЕ/см^2 в зависимости от используемой среды



Число КОЕ на бакпечатке диаметром 25 см^2

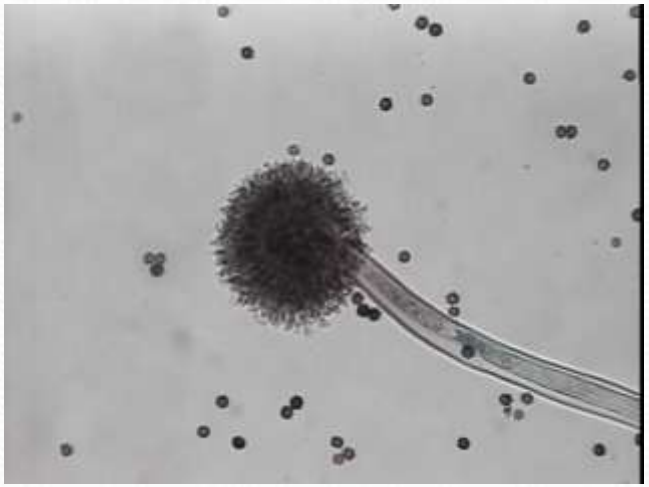


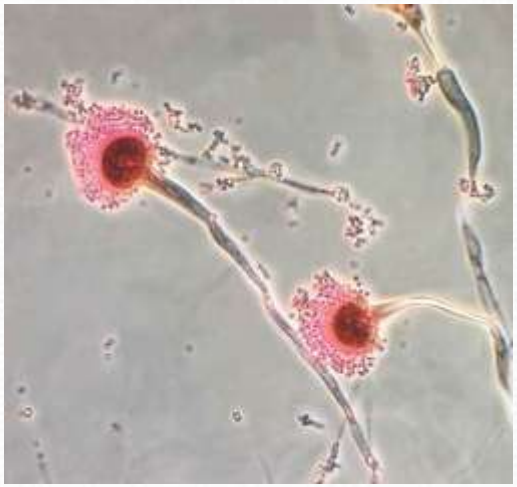
Выводы

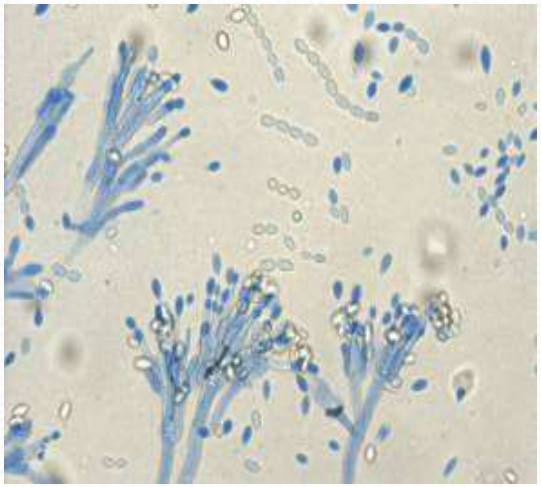
- Плесневый гриб *Paecilomyces variotii* – единственный контаминант внутренних поверхностей эксплуатируемых влажных CO_2-инкубаторов в лаборатории ЭКО клиники «Альтравита».
- В воздухе лаборатории и воде из водяной рубашки инкубаторов *P. variotii* не обнаружен, при этом воздух очень слабо контаминирован, а вода не заражена грибными агентами.
- С частей новых (не бывших в эксплуатации) инкубаторов и их упаковки выделены шесть видов плесневых грибов, в том числе и *P. variotii* .Исходя из этого, наиболее вероятно, что контаминирующий агент *Paecilomyces variotii* поступает в лабораторию с частями инкубатора от производителя.

Выводы

- Использование бакпечаток HiTouch FlexiPlate со средой FL010 подходит для разработки режима деконтаминации влажных CO_2-инкубаторов в лабораториях ЭКО.
- Мытье инкубаторов лаборатории ЭКО клиники "Альтравита" необходимо производить каждые десять дней.
- Требуется разработка безопасного метода дезинфекции влажных CO_2-инкубаторов.







Спасибо за внимание