

ОРИГИНАЛ

ФГБНУ ФИЦВиМ		
СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА (СОП)		<b>СОП 00559-01</b>
Название:	<b>Получение спорowego материала представителей рода <i>Bacillus</i></b>	Страница 1 из 9

Версия № 01	Дата введения: 29.09.2017
Причина пересмотра:	

Утверждение процедуры	Должность	Ф. И. О.	Подпись	Дата
Разработал	Главный научный сотрудник	Селянинов Ю.О.		«4» сентября 2017 г.
Разработал	Руководитель лаборатории Диагностики и мониторинга	Егорова И.Ю.		«4» сентября 2017 г.
Согласовал	Руководитель Государственной коллекции	Балышев В.М.		«4» сентября 2017 г.
Согласовал	Начальник ОСМК	Бобкова Т.Е.		«5» сентября 2017 г.
Утвердил	Директор института	Колбасов Д.В.		«11» 09 2017 г.

### 1. Цель

Устанавливает порядок получения спорowego материала представителей рода *Bacillus*.

### 2. Область применения

Данная стандартная операционная процедура применяется при получении спорowego материала бациллярной микрофлоры при ее депонировании в Государственную коллекцию микроорганизмов или плановом переосвежении.

### 3. Распределение ответственности

Ответственность за координацию работ, регламентированных настоящим СОП, несет начальник отдела Государственной коллекции микроорганизмов.

Ответственность за реализацию работ, регламентированных настоящей СОП, несут сотрудники, прошедшие обучение по получению спорowego материала представителей рода *Bacillus* и оценки его качества.

Получение спорowego материала осуществляют научные сотрудники, имеющие высшее ветеринарное, биологическое или медицинское образование, прошедшие обучение на специализированных курсах по работе с микроорганизмами II-IV групп патогенности, сдавшие зачет по биологической безопасности и допущенные к работам приказом директора ФГБНУ ФИЦВиМ.

Техническое обеспечение работ (стерилизация и обеззараживание посуды, инструментов, подготовка боксовых помещений, приготовление дезинфицирующих растворов) проводят лаборанты-исследователи.

Приготовление питательных сред для проведения процедуры получения спорowego материала штамма, осуществляют микробиологи и лаборанты-

ФГБНУ ФИЦВиМ		
СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА (СОП)		СОП 00559-01
Название:	Получение спорowego материала представителей рода <i>Bacillus</i>	Страница 2 из 9

исследователи, прошедшие обучение работе с сосудами, работающими под давлением.

#### **4. Требования безопасности**

4.1. Работу проводят согласно требованиям СП 1.3.3118-13 и СП 1.3.2322-08.

4.2. Безопасность труда при работе с биологическими объектами должна соответствовать требованиям ГОСТ 12.1.008.

4.3. Соблюдение ветеринарно-санитарного режима должно соответствовать СОП ОО 00069.

4.4. Соблюдение техники безопасности должно соответствовать Инструкции по охране труда для сотрудников подразделений ГНУ ВНИИВВиМ.

#### **5. Процедура**

##### **5.1. Общие положения**

5.1.1. Все работы с использованием культур микроорганизмов (возбудителя сибирской язвы) III группы патогенности проводят в боксированных помещениях, со штаммами, относящимися ко II группе патогенности, - в шкафах с ламинарным вертикальным потоком II класса с соблюдением принципа парности.

5.1.2. Подготовку боксового помещения, в котором проводятся работы с ПБА, проводят до начала работ, обеззараживание - по их окончании в соответствии с требованиями Инструкции по соблюдению требований ветеринарно-санитарного режима и противозидемической безопасности в подразделении.

5.1.3. Перед проведением работ готовят рабочий (6%) и аварийный (10%) растворы перекиси водорода по СОП АД-00011. Минимальный срок годности растворов перекиси водорода 2 суток. При удовлетворительных результатах контроля концентрации АДВ с помощью химических индикаторов срок годности растворов перекиси водорода может быть продлен.

Контроль концентрации АДВ в рабочих и аварийных растворах проводят при помощи химических индикаторов серии ДЕЗИКОНТ-ПЕРЕКИСЬ.

##### **5.2. Оборудование и инвентарь:**

- ведро;
- ветошь для мытья пола – 1 м;
- воронка полимерная диаметром 100 мм – 1 шт;
- горелка газовая ГОСТ 21204 – 1 шт;
- груша резиновая с силиконовым шлангом ТУ9398-005-05769082-2003 – 1 шт;
- ёмкость для общелабораторного применения – 1 шт;
- ёмкость Коплина – 1 шт;

ФГБНУ ФИЦВиМ		
СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА (СОП)		СОП 00559-01
Название:	Получение спорового материала представителей рода <i>Bacillus</i>	Страница 3 из 9

- ёрш пробирочный – 1 шт;
- клиническая лабораторная центрифуга ЦЛн16 с ротором 6х50;
- корнцанг – 1 шт;
- микроскоп СХ41 прямой;
- пипетка стеклянная серологическая – 2 шт;
- прибор для упаковки стеклянных и резиновых изделий методом термосварки – 1 шт;
- пробирки стеклянные бактериологические по ГОСТ 25336 - 5 шт;
- стаканы центрифужные полистироловые объемом 50 см<sup>3</sup> - 2 шт;
- стерилизатор паровой автоматический ВКА-75 «ПЗ»;
- стерилизатор огневой – 1 шт;
- термостат типа водяная баня цифровой (Bio San);
- хладотермостат ХТ 3/40-2;
- холодильник бытовой «Атлант» (4°С);
- швабра;
- шкаф ламинарного вертикального потока (БМБ);
- штатив для лабораторных изделий – 1 шт.

### 5.3. Сырье и материал:

- бумага пергаментная, ГОСТ 1341-84 – 50 г;
- бумага фильтровальная лабораторная, ГОСТ 12026-76 -10 г;
- вата гигроскопическая по ГОСТ 5556 – 0,1 кг;
- вода дистиллированная по ГОСТ 6709 – 5 дм<sup>3</sup> ;
- глюкозный агар Сабуро - 20 см<sup>3</sup>;
- глюкозный бульон Сабуро – 30 см<sup>3</sup>;
- зажим для пакета для деструкции – 1 шт;
- зонд-тампоны – 10 шт;
- индикатор МедИс-132/20 – 5 шт;
- картофельный или пшеничный агары – 50 см<sup>3</sup>;
- колпачок-пробка алюминиевый – 5 шт;
- комбинезон защитный противочумный одноразовый – 10 шт;
- маркер перманентный – 1 шт;
- марля – 1 кг;
- маски медицинские (12-ти слойные) – 5 шт;
- мясопептонный агар (МПА) – 20 см<sup>3</sup> ;
- мясопептонный бульон (МПБ) по ГОСТ 20730 - 20 см<sup>3</sup>;
- мыло антибактериальное жидкое – 50 см<sup>3</sup>;
- набор красителей для окраски спор по способу Ожешки – 1 наб;
- набор красителей для окраски по Циль-Нильсену 1 наб;
- набор красителей по Граму - 1 наб;
- очки защитные – 2 шт;
- пакет для деструкции – 1 шт;
- перекись водорода 33%-ная - 3 кг;

ФГБНУ ФИЦВиМ		
СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА (СОП)		СОП 00559-01
Название:	Получение спорowego материала представителей рода <i>Bacillus</i>	Страница 4 из 9

- перчатки латексные медицинские двукратного хлорирования – 10 пар;
- петля бактериологическая - 1 шт;
- полотенце бумажное рулонное – 2 шт;
- порошок стиральный «Зифа» - 0,3 кг;
- рулоны для стерилизации с индикатором - 0,1 рул;
- спички ГОСТ 1820-2001 -1 кор;
- спирт этиловый по ГОСТ Р 51652 – 100 см<sup>3</sup>;
- среда Китта-Тароцци – 40 см<sup>3</sup>
- стекла предметные со шлифованным краем – 5 шт;
- стерильный 30 %-ный водный раствор химически чистого глицерина – 50 г;
- флаконы пенициллиновые на 10 см<sup>3</sup> – 2 шт;
- халат медицинский ГОСТ 24760-81 - 2 шт;
- химический индикатор серии ДЕЗИКОНТ-ПЕРЕКИСЬ – 8 шт.;
- цилиндры измерительные ГОСТ 25336-82Е емкостью 250 и 1000 см<sup>3</sup> – 2 шт;
- чашки Петри стандартные диаметром 100 мм по ГОСТ 25336 – 2 шт;
- чепчик – 2 шт;
- шпатель L- образный – 2 шт;
- эфир медицинский ФС 42-3643-98 – 20 см<sup>3</sup>;

#### **5.4. Подготовка боксовых помещений и посуды к работе**

Подготовку боксовых помещений к работе проводят по СОП АД-00003. Учет ресурса работы бактерицидных ламп, замеров показателей микроклимата в лабораторных помещениях, проведения текущих и генеральных уборок регистрируют в журналах соответствующих форм (Журнал учета работы бактерицидных облучателей, Журнал учета проведения текущих и генеральных уборок, Журнал приготовления дезрастворов, Журнал учета температуры и влажности в боксовых помещениях, Журнал учета температуры в термостатах, Журнал учета температуры в холодильниках). Подготовку посуды к работе проводят по СОП АД 00167.

#### **5.5. Подготовка растворов и питательных сред к работе**

Питательные среды и растворы, необходимые для проведения процедуры получения культуры штаммов в споровой форме, приготовленные по СОП ЛБ 00409, СОП ЛБ 00413 и проверенные по СОП ЛБ 00511, получают в секторе приготовления питательных сред по предварительно поданным заявкам.

Получение спорowego материала проводят на картофельном или на пшеничном агаре, приготовленными по СОП 00581-01.

#### **5.6. Получение спорowego материала и оценка его качества**

##### **5.6.1. Отбор и подготовка культур рода *Bacillus*.**

Выделенные в ходе проведения лабораторных диагностических исследований или поступившие для целей реидентификации и последующего депонирования культуры проверяют на микробиологическую чистоту по СОП

ФГБНУ ФИЦВиМ		
СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА (СОП)		СОП 00559-01
Название:	Получение спорового материала представителей рода <i>Bacillus</i>	Страница 5 из 9

00566.

Если культура типична, не содержит посторонней микрофлоры, однородна приступают к получению спорового материала. Если в популяции наблюдают гетерогенность колоний, то проводят отбивку в бульон типичной (преобладающей формы) для данного штамма колонии, который в последующем используют для получения спорового материала.

#### 5.6.2. Нарботка спор и оценка их качества.

Суточные бульонные культуры штаммов в объеме 0,3–0,5 см<sup>3</sup> вносят в не менее чем 2 чашки Петри с картофельным или пшеничным агаром и материал при помощи шпателя равномерно распределяют по поверхности агара. Чашки подсушивают до полного впитывания материала, переворачивают крышкой вверх и инкубируют в течение 3–10 суток при температуре (37±1)°С (в зависимости от споруляционных способностей штамма). Периодически проводят контроль культур на полноту спорообразования путем изготовления мазков, их фиксации смесью Никифорова (Приложение 1) и последующей окраски по способу Ожешко или Циль-Нильсена в соответствии с инструкцией по применению наборов красителей. При просмотре 3-5 полей зрения мазка должно быть не более 20 вегетативных форм на 80-100 спор. Смыв спор с картофельного (пшеничного) агара производят стерильной дистиллированной водой и с помощью L-образного шпателя. Отбор споровой суспензии проводят при помощи стеклянных пипеток или дозаторов со стерильными наконечниками в стерильные центрифужные стаканы. Остаточные вегетативные клетки лизируют прогреванием споровой суспензии на водяной бане при температуре 80°С в течение 20 мин, после чего споры дважды отмывают центрифугированием от остатков питательной среды стерильной дистиллированной водой и контролируют на отсутствие посторонней бактериальной и грибной микрофлоры по СОП 00566. Отмытые споры ресуспендируют в 10,0 см<sup>3</sup> стерильной дистиллированной воды и при помощи пипетки переносят в стерильный пеницилиновый флакон, который перекрывают резиновой пробкой, а сверху укрепляют слоем парафильма. Флакон со споровой суспензией маркируют при помощи перманентного маркера с указанием наименованием возбудителя, номера штамма или его условного обозначения, даты приготовления и объема споровой суспензии. Для полноценного созревания спор флаконы со споровой суспензией выдерживают при температуре плюс (4±2)°С в течение 10 дней. Созревшие полноценные споры оседают плотным слоем на дно флакона, а мертвые и слабожизнеспособные всплывают к поверхности.

#### 5.6.3. Закладка спор в криопротектор

При помощи пипетки аккуратно декантируют надосадочную жидкость, не допуская при этом взмучивания самого осадка. К осадку спор добавляют 15-20 см<sup>3</sup> стерильного водного 30%-ного раствора химически чистого глицерина. Путем пипетирования разбивают осадок в равномерную взвесь. Флакон перекрывают резиновой пробкой, укрепляют парафильмом и оставляют при температуре плюс

ФГБНУ ФИЦВиМ		
СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА (СОП)		СОП 00559-01
Название:	Получение спорowego материала представителей рода <i>Bacillus</i>	Страница 6 из 9

(4±2)°С до момента фасовки материала.

#### 5.6.4. Обеззараживание посевов, посуды, одежды

Использованный лабораторный пластик (наконечники к дозаторам, чашки Петри, L-образные шпатели) после их обеззараживания в 6%-ном растворе перекиси водорода в течение не менее 1 ч, защитные противочумные комбинезоны, перчатки, маски медицинские помещают в пакет для деструкции, который перекрывают зажимом. Стекланную посуду (пипетки, флаконы) помещают в биксы для стерилизации. Заполненные пакеты для деструкции и биксы для стерилизации помещают в стерилизатор паровой и автоклавируют в течение 2 часов при (132 ± 2)°С (2 кгс/см<sup>2</sup>). Для контроля работы стерилизатора парового производят закладку термохимических тестов МедИС-132/20 соответствии с «Методическими указаниями по контролю работы паровых и воздушных стерилизаторов» №15/6-5 от 28.02.1991 г.

Использованные полистироловые центрифужные стаканы обеззараживают кипячением в стерилизаторе огневом в дистиллированной воде с добавлением перекиси водорода в течение 60 мин.

#### 5.6.5. Заполнение учетных форм

Все манипуляции, производимые с ПБА II группы патогенности, должны в обязательном порядке регистрироваться в журналах по формам 514/у, 518/у и 520/у.

## 6. Термины и определения

Отсутствуют.

## 7. Сокращения

- 7.1. АДВ – активное действующее вещество;
- 7.2. ПБА – патогенные биологические агенты;
- 7.3. СОП - стандартная операционная процедура;
- 7.4. ФГБНУ ФИЦВиМ – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии».

## 8. Ссылки или источники

- 8.1. ГОСТ 12.1.008 «Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Биологическая безопасность. Общие требования».
- 8.2. СОП АД - 00003 «Подготовка производственных помещений к работе. Уборка помещений класса чистоты С и Д».
- 8.3. СОП АД-00011 «Приготовление дезинфицирующих растворов перекиси водорода с добавлением (или без) моющих средств».
- 8.5. СОП ВС 00069 «Инструкция по ветеринарно-санитарному режиму и технике безопасности при работе в боксах».

ФГБНУ ФИЦВиМ		
СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА (СОП)		СОП 00559-01
Название:	Получение спорowego материала представителей рода <i>Bacillus</i>	Страница 7 из 9

8.6. СОП АД – 00167 «Подготовка посуды к работе».

8.7. СОП ЛБ 00409 «Приготовление твердых питательных сред из сухих коммерческих смесей».

8.8. СОП ЛБ 00413 «Приготовление жидких питательных сред из сухих коммерческих смесей».

8.9. СОП ЛБ 00511 «Качественный контроль биологических свойств питательных сред».

8.10. СОП 00566 «Определение микробиологической чистоты штаммов бактериальной, грибной, микоплазменной и вирусной этиологии».

8.11. СОП 00581 «Приготовление агаризованных споруляционных питательных сред».

8.12. СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности)».

8.13. СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)».

## **9. Приложения.**

9.1. Рецепт приготовления смеси Никифорова и порядок фиксации мазков

9.2. Лист ознакомления с требованиями СОП

## **10. История внесения изменений.**

Отсутствует.

ФГБНУ ФИЦВиМ		
СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА (СОП)		СОП 00559-01
Название:	Получение спорового материала представителей рода <i>Bacillus</i>	Страница 8 из 9

## Приложение 1

### Рецептура приготовления смеси Никифорова и порядок фиксации мазков

В стеклянной емкости из темного стекла смешивают в равных пропорциях 96%-ный этиловый спирт и эфир медицинский. Емкость перекрывают крышкой с притертым краем для предотвращения испарения эфира и хранят при температуре плюс  $(4\pm 2)^{\circ}\text{C}$ .

Изготовленные мазки из бульонных, агаровых культур и отпечатки с органов животных высушивают при комнатной температуре на воздухе. Если оно замедлено, то препарат можно слегка нагреть в токе теплого воздуха высоко над пламенем горелки, держа стекло мазком вверх. Эту операцию следует проводить крайне осторожно, не перегревая препарат, иначе клетки микроорганизмов деформируются. Мазки закладывают в стеклянную ёмкость Коплина и заливают смесью Никифорова. Емкость закрывают крышкой. Мазки фиксируют в течение 30 мин, после чего их извлекают и высушивают на воздухе.



