

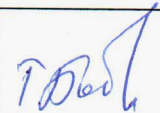



ФГБНУ ФИЦВиМ		Лаборатория Диагностики и Мониторинга	ОРИГИНАЛ
СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА (СОП)		СОП 00569-01	
Название:	Определение культурально-морфологических свойств представителей рода <i>Bacillus</i>		Страница 1 из 9

Версия № 01	Дата введения: 15.12.2017
Причина пересмотра:	

Утверждение процедуры	Должность	Ф. И. О.	Подпись	Дата
Разработал	Руководитель лаборатории	Егорова И.Ю.		«08» 12 2017 г.
Разработал	Главный научный сотрудник	Селянинов Ю.О.		«5» 12 2017 г.
Согласовал	Руководитель Государственной коллекции микроорганизмов	Балышев В.М.		«06» 12 2017 г.
Согласовал	Начальник ОСМК	Бобкова Т.Е.		«7» 12 2017 г.
Утвердил	Директор института	Колбасов Д.В.		«14» 12 2017 г.

1. Цель.

Устанавливает порядок определения культурально-морфологических свойств штаммов рода *Bacillus ssp.*

2. Область применения.

Данная СОП применяется при изучении культурально-морфологических свойств штаммов рода *Bacillus ssp.*, как вновь освеженных, так и подлежащих депонированию в Государственную коллекцию микроорганизмов ФГБНУ ФИЦВиМ.

3. Распределение ответственности.

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

Ответственность за реализацию работ, регламентированных настоящей СОП, несут научные сотрудники, участвующие в процедуре определения культурально-морфологических свойств штаммов рода *Bacillus ssp.*

Изучение культурально-морфологических свойств бактерий проводят научные сотрудники в паре с лаборантом-исследователем, 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,

ФГБНУ ФИЦВиМ		Лаборатория Диагностики и Мониторинга
СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА (СОП)		СОП 00569-01
Название:	Определение культурально-морфологических свойств представителей рода <i>Bacillus</i>	Страница 2 из 9

инструментов, подготовка боксовых помещений, приготовление дезинфицирующих растворов) проводят лаборанты-исследователи.

Приготовление питательных сред для накопления вегетативной культуры, постановки пробы фагом осуществляют микробиологи и лаборанты-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 ВС 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 (возбудитель сибирской язвы, сапрофиты) III-IV 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 противоэпидемической 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.

5.1.4. Работник, проводящий изучение культурально-морфологических свойств вакцинных штаммов возбудителя сибирской язвы и культурами сапрофитов, должен работать в стерильной технологической одежде и в

ФГБНУ ФИЦВиМ		Лаборатория Диагностики и Мониторинга	
СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА (СОП)		СОП 00569-01	
Название:	Определение культурально-морфологических свойств представителей рода <i>Bacillus</i>		Страница 3 из 9

стерильных резиновых перчатках, а при работе с эпизоотическими штаммами *B. anthracis* II группы патогенности – в комбинезоне защитном противочумном одноразовом, 12-ти слойной медицинской маске и латексных медицинских перчатках двукратного хлорирования.

5.2. Оборудование и инвентарь:

- ведро;
- весы электронные лабораторные Pioneer PA 213С (II класс точности);
- 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;
- микроскоп СХ41 прямой с увеличением х 400-900;
- петля бактериологическая - 1 шт;
- пипетки градуированные вместимостью 0,1, 1,0, 5,0 см³ по ГОСТ 29230;
- пробирки стеклянные бактериологические по ГОСТ 25336 - 2 шт;
- стерилизатор паровой автоматический ВКА-75 «ПЗ»;
- фазово-контрастное устройство к микроскопу;
- халат медицинский ГОСТ 24760-81 - 2 шт;
- хладотермостат ХТ 3/40-2 с температурой нагрева (36±1)⁰С;
- цилиндры измерительные ГОСТ 25336-82Е емкостью 250 и 1000 см³ – 2 шт;
- швабра;
- шкаф ламинарного вертикального потока (БМБ);
- штатив для лабораторных изделий – 1 шт;
- ёмкость Коплина – 1 шт;
- ёмкость для общелабораторного применения – 1 шт.

5.3. Сырье и материалы:

- агар кровяной с 5% дефибринированной крови барана;
- азур-эозин по Романовскому-Гимза;
- вата гигроскопическая по ГОСТ 5556 – 0,1 кг;
- вода дистиллированная по ГОСТ 6709 – 0,5 дм³;
- зажим для пакета для деструкции – 1 шт;
- индикатор МедИс-132/20 – 5 шт;
- колпачок-пробка алюминиевый – 2 шт;
- комбинезон защитный противочумный одноразовый – 4 шт;
- маркер перманентный – 1 шт;
- маски медицинские (12-ти слойные) – 4 шт;
- маски медицинские – 4 шт;

ФГБНУ ФИЦВиМ		Лаборатория Диагностики и Мониторинга	
СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА (СОП)		СОП 00569-01	
Название:	Определение культурально-морфологических свойств представителей рода <i>Bacillus</i>		Страница 4 из 9

- мясопептонный агар (МПА) или агар Хоттингера – 50 см³;
- мясопептонный бульон (МПБ) по ГОСТ 20730 или бульон Хоттингера - 5 см³;
- мыло антибактериальное – 0,05 дм³;
- набор красителей по Граму - 1 наб;
- очки защитные – 2 шт;
- пакет для деструкции – 1 шт;
- перекись водорода 33%-ная - 2 кг;
- перчатки латексные медицинские двукратного хлорирования – 4 пары;
- перчатки анатомические ТУ38.106-441-88 – 4 пары;
- полотенце бумажное рулонное – 2 шт;
- порошок стиральный «Зифа» - 0,1 кг;
- рулоны для стерилизации с индикатором - 0,1 рул;
- синька Леффлера;
- смесь Никифорова (спирт:эфир, 1:1);
- стекла предметные для микропрепаратов по ГОСТ 9284;
- стекла покровные для микропрепаратов по ГОСТ 6672;
- спирт этиловый ректифицированный по ГОСТ 5962 – 0,1 дм³;
- спички ГОСТ 1820-2001 -1 кор;
- химический индикатор серии ДЕЗИКОНТ-ПЕРЕКИСЬ – 4 шт.;
- чашки Петри одноразовые стандартные диаметром 90 мм по ГОСТ 25336 – 2 шт;
- чепчик – 2 шт;
- шпатель L-образный.

5.4. Подготовка растворов и питательных сред к работе

Все питательные среды, используемые для определения культурально-морфологических свойств, получают в секторе приготовления питательных сред по предварительно поданным заявкам. Приготовление питательных сред проводят по СОП ЛБ 00409 и СОП ЛБ 00413. Питательные среды должны пройти обязательный контроль биологических свойств перед их использованием по СОП ЛБ – 00511.

5.5. Изучение культурально-морфологических свойств представителей рода *Bacillus ssp.*

Для исследования материал испытуемого штамма в вегетативной или споровой форме при помощи бактериальной петли или стерильной пипетки засевают на твердые (МПА, агар Хоттингера с рН 7,2...7,5, классический кровяной агар) и в жидкие (МПБ, бульон Хоттингера) питательные среды. Поверхность агара перед посевом должна быть совершенно сухой, для этого

ФГБНУ ФИЦВиМ		Лаборатория Диагностики и Мониторинга	
СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА (СОП)		СОП 00569-01	
Название:	Определение культурально-морфологических свойств представителей рода <i>Bacillus</i>		Страница 5 из 9

чашки Петри с агаризованными средами выдерживают в термостате при температуре $(36\pm 1)^{\circ}\text{C}$ в течение 15-20 мин с приоткрытыми крышками.

По 0,1-0,2 см³ микробной суспензии вносят в пробирки с бульоном и наносят на поверхность агаризованных питательных сред. Концентрация бактерий в микробной суспензии должна быть такой, чтобы при посеве на плотные среды формировались изолированные колонии. Посевной материал равномерно распределяют по поверхности агара L-образным шпателем или путем покачивания, чашки Петри подсушивают 30-40 минут при комнатной температуре, переносят в термостат, ставят вверх дном и выдерживают в течение 20-24 часов при температуре $(36\pm 1)^{\circ}\text{C}$. Посевы на жидких питательных средах также инкубируют при $(36\pm 1)^{\circ}\text{C}$.

При работе с культурами сибиреязвенного микроба в посевах на жидких питательных средах должен быть характерный для данного микроорганизма рост культуры с образованием на дне пробирки рыхлого осадка в виде «комка ваты» или зонтика, относительно трудно разбивающегося при встряхивании. В толще слоя бульона могут быть взвешенные в незначительном количестве хлопья растущей культуры, бульон при этом должен быть прозрачным, либо слабо опалесцировать. На поверхности среды возможно формирование пристеночного кольца.

В окрашенных по Граму мазках по СОП ЛБ – 00401 из суточных бульонных культур должны быть морфологически-типичные для возбудителя сибирской язвы грамположительные палочки и цепочки из этих палочек темно-синего (фиолетового) цвета, споры должны быть овальной формы, блестящие (неокрашенные), находящиеся в центре вегетативных клеток или вне их. В препаратах “висячая или раздавленная капля”, приготовленных по общепринятым методикам, отдельные палочки и состоящие из них короткие цепочки, должны быть неподвижны.

На поверхности твердых питательных сред после суточной инкубации культура штамма должна вырастать в виде сухих круглых серовато-белых с серебристым оттенком матовых шероховатых изолированных колоний R – формы. Края колоний неровные с отходящими от них волнистыми отростками – «локонами» («голова медузы» или «львиная грива»). В меньшем количестве могут быть колонии R/O-формы с неровными краями, но без отростков. Степень выраженности локончатости является характерной особенностью испытуемого штамма. Если на поверхности агара в присутствии кислорода формируются колонии гладкой S-формы, то их относят к III типу по Торну (культуры, продуцирующие капсульное вещество в аэробных условиях). В окрашенных по Граму мазках из агаровых культур должны обнаруживаться грамположительные

ФГБНУ ФИЦВиМ		Лаборатория Диагностики и Мониторинга	
СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА (СОП)		СОП 00569-01	
Название:	Определение культурально-морфологических свойств представителей рода <i>Bacillus</i>		Страница 6 из 9

бациллы, обычно группирующиеся более короткими цепочками, чем в мазках из бульонных культур.

На классическом кровяном агаре через 24 часа инкубирования должны формироваться серовато-белые, круглые, шероховатые колонии диаметром 2–4 мм без признаков гемолиза. В последующие дни возможно появление гемолиза.

Способность культур к капсулообразованию оценивают при определении вирулентности культур по СОП 00553. Мазки фиксируют при помощи смеси Никифорова, как описано в СОП 00559. Фиксированные мазки окрашивают синькой Леффлера или краской Романовского-Гимза (азур-эозином), разведенной в соотношении 1:10 дистиллированной водой, в течение 15 мин. Микроскопируют под масляной иммерсией.

Изучение культурально-морфологических свойств сапрофитов рода *Bacillus* проводят аналогичным способом. Соответствие свойств изучаемого штамма свойствам типового штамма данного вида определяют при помощи «Определителя бактерий Берги».

5.6. Обеззараживание посевов, посуды, одежды, трупного материала и подстилки

5.6.1. Использованный лабораторный пластик (чашки Петри), защитные противочумные комбинезоны, перчатки, маски медицинские помещают в пакет для деструкции, который перекрывают зажимом. Стеклопосуду (пипетки, флаконы, пробирки) помещают в биксы для стерилизации. Заполненные пакеты для деструкции и биксы для стерилизации помещают в стерилизатор паровой и автоклавируют в течение 2 часов при $(132 \pm 2)^\circ\text{C}$ (2 кГс/см³). 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.

5.6.2. Учет ресурса работы бактерицидных ламп, замеров показателей микроклимата в лабораторных и виварных 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).

5.7. 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.

ФГБНУ ФИЦВиМ		Лаборатория Диагностики и Мониторинга
СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА (СОП)		СОП 00569-01
Название:	Определение культурально-морфологических свойств представителей рода <i>Bacillus</i>	Страница 7 из 9

Отсутствуют.

7. Сокращения.

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

8. Ссылки.

- 8.1. ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами».
- 8.2. ГОСТ 12.1.008 «Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Биологическая безопасность. Общие требования».
- 8.3. СОП АД - 00003 «Подготовка производственных помещений к работе. Уборка помещений класса чистоты С и Д».
- 8.4. 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».
- 8.6. СОП ЛБ – 00401 «Окрашивание мазков по Граму».
- 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 бактериологических питательных сред».
- 8.10. СОП 00552- «Определение концентрации жизнеспособных клеток (спор) бактериальных патогенов».
- 8.11. СП 1.3.2322-08 – «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности)».
- 8.12. СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)».

9. Приложения

Приложение 1 Лист ознакомления с требованиями СОП.

ФГБНУ ФИЦВиМ		Лаборатория Диагностики и Мониторинга	
СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА (СОП)		СОП 00569-01	
Название:	Определение культурально-морфологических свойств представителей рода <i>Bacillus</i>		Страница 8 из 9

10. История внесения изменений.

Отсутствует.

