

ФГБНУ ФИЦВиМ		Лаборатория Диагностики и Мониторинга	
СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА (СОП)		СОП 00585-01	
Название:	Определение антигенных свойств штаммов представителей рода <i>Bacillus</i>		Страница 1 из 8

Версия № 01	Дата введения: 15.12.2017
Причина пересмотра:	

Утверждение процедуры	Должность	Ф. И. О.	Подпись	Дата
Разработал	Главный научный сотрудник	Селянинов Ю.О.		«05» 12 2017 г.
Разработал	Руководитель лаборатории Диагностики и мониторинга	Егорова И.Ю.		«05» 12 2017 г.
Согласовал	Руководитель Государственной коллекции	Бальшев В.М.		«06» 12 2017 г.
Согласовал	Начальник ОСМК	Бобкова Т.Е.		«07» 12 2017 г.
Утвердил	Директор института	Колбасов Д.В.		«14» 12 2017 г.

1. Цель

Устанавливает порядок определения антигенных свойств штаммов представителей рода *Bacillus*.

2. Область применения

Данная стандартная операционная процедура применяется при определении антигенных свойств (выявление антигенов в серологических реакциях, лизабельность фагами) представителей рода *Bacillus* при паспортизации штаммов с целью их последующего депонирования в Государственную коллекцию микроорганизмов.

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 выявлению специфических антигенов в серологических реакциях и постановке пробы фагом.

Определение антигенных свойств 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

ФГБНУ ФИЦВВиМ		Лаборатория Диагностики и Мониторинга	
СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА (СОП)		СОП 00585-01	
Название:	Определение антигенных свойств штаммов представителей рода <i>Bacillus</i>		Страница 2 из 8

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 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 (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 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.

ФГБНУ ФИЦВим		Лаборатория Диагностики и Мониторинга	
СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА (СОП)		СОП 00585-01	
Название:	Определение антигенных свойств штаммов представителей рода <i>Bacillus</i>		Страница 3 из 8

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;
- дозатор с переменным объемом 200-1000 мкл типа Ленпипет или Эппендорф;
- ёмкость для общелабораторного применения – 1 шт;
- микроцентрифуга Minispin;
- микроскоп СХ41 прямой;
- наконечники для дозатора объемом до 1000 мкл – 5 шт;
- набор стандартов мутности МакФарланда (0,5 – 5 ЕД МФ) для калибровки денситометра;
- прибор для упаковки стеклянных и резиновых изделий методом термосварки – 1 шт;
- плита газовая;
- пробирки уленгутовские - 4 шт;
- пробирки стеклянные бактериологические по ГОСТ 25336 - 2 шт;
- стерилизатор паровой автоматический ВКА-75 «ПЗ»;
- стерилизатор огневой;
- хладотермостат ХТ 3/40-2 с температурой нагрева $(37 \pm 1)^{\circ}\text{C}$;
- швабра;
- шкаф ламинарного вертикального потока (БМБ);
- штатив для лабораторных изделий – 1 шт.

5.3. Сырье и материал:

- бактериофаг Fah-ВНИИВВиМ сибиреязвенный диагностический;
- бумага пергаментная, ГОСТ 1341-84 – 50 г;
- вата гигроскопическая по ГОСТ 5556 – 0,05 кг;
- 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) – 2 шт;
- мясопептонный агар (МПА) или агар Хоттингера (с содержанием аминного азота 110-160 мг%) – 50 см³;
- мясопептонный бульон (МПБ) по ГОСТ 20730 - 5 см³;
- микропробирки типа Эппендорф емкостью 1.5-2.0 см³ – 1 шт;

ФГБНУ ФИЦВиМ		Лаборатория Диагностики и Мониторинга	
СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА (СОП)		СОП 00585-01	
Название:	Определение антигенных свойств штаммов представителей рода <i>Bacillus</i>		Страница 4 из 8

- мыло антибактериальное жидкое – 50 см³;
- очки защитные – 2 шт;
- пакет для деструкции – 1 шт;
- перекись водорода 33%-ная - 1 кг;
- перчатки латексные медицинские двукратного хлорирования – 4 пары;
- петля бактериологическая - 1 шт;
- ПРЕЦИПАНТР. Набор компонентов для диагностики сибирской язвы в реакции преципитации;
- 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 – 50 см³;
- фаг-тест-набор «ОболенскR1»;
- физиологический раствор рН 7.2 – 7.4 по ГФ Х с содержанием 0.3% фенола – 1 см³;
- химический индикатор серии ДЕЗИКОНТ-ПЕРЕКИСЬ – 4 шт.;
- цилиндры измерительные ГОСТ 25336-82Е емкостью 250 и 1000 см³ – 2 шт;
- чашки Петри стандартные диаметром 90 мм по ГОСТ 25336 – 1 шт;
- шпатель L- образный – 1 шт.

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 вегетативной форме, приготовленные по СОП ЛБ 00409, СОП 00413 и проверенные по СОП ЛБ 00511, получают в секторе приготовления питательных сред по предварительно поданным заявкам.

5.6. Постановка реакции термопреципитации по Асколи

Реакция термопреципитации по Асколи позволяет обнаружить термостабильный сибирезвенный антиген в экстрактах культуры испытуемого штамма.

ФГБНУ ФИЦВиМ		Лаборатория Диагностики и Мониторинга	
СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА (СОП)		СОП 00585-01	
Название:	Определение антигенных свойств штаммов представителей рода <i>Bacillus</i>		Страница 5 из 8

Готовят ночную агаровую культуру испытуемого штамма. Для этого в пробирки со скошенным мясопептонным или питательным агаром вносят суточные бульонные культуры штаммов в объеме 0,3–0,5 см³. Посевы инкубируют в течение 18-24 ч при температуре (37±1)⁰С.

В пробирки типа Eppendorf емкостью 1,5-2,0 см³ наливают 0,5 см³ фенолизированного физиологического раствора, в котором ресуспендируют петлю агаровой культуры испытуемого штамма. Микробную суспензию прогревают на водяной бане при 100⁰С в течение 40-60 мин. Обеззараженную микробную суспензию осветляют центрифугированием при 13000 об/мин в течение 1 мин.

В узкие уленгутовские пробирки наливают 0,2-0,3 см³ прозрачной сибиреязвенной преципитирующей сыворотки, а затем пипеткой поверх осторожно наслаивают на нее такое же количество полученного экстракта - антигена. Если реакция положительная, то на границе соприкосновения жидкостей в течение 0,5-2 мин, но не позднее 3 мин должно появиться характерное кольцо преципитации серо-белого цвета. Одновременно ставят следующие контроли реакции: преципитирующая сибиреязвенная сыворотка со стандартным сибиреязвенным антигеном, преципитирующая сибиреязвенная сыворотка с фенолизированным физиологическим раствором и нормальная сыворотка лошади со стандартным сибиреязвенным антигеном.

5.7. Постановка теста с сибиреязвенными фагами

Определение чувствительности штамма к сибиреязвенному бактериофагу проводят на чашках Петри с 1,5-2,0 %-ным агаром Хоттингера или МПА, который перед постановкой пробы подсушивают в термостате. Для этого чашки Петри с агаризованной средой с приоткрытыми крышками выдерживают при (37±1)⁰С в течение 15 мин.

На основе мясо-пептонного бульона или бульона Хоттингера готовят 4-6 часовую бульонную культуру испытуемого штамма путем инкубирования посевов при (37±1)⁰С в течение 4-6 ч. Для этого в пробирку с жидкой БПС засевают петлю агаровой суточной культуры.

В чашки Петри с 1,5-2,0 %-ным мясо-пептонным агаром или агаром Хоттингера вносят 0,3-0,5 см³ 4-6 часовой культуры испытуемых штаммов равномерно распределяя посевной материал по поверхности агара шпателем или путем покачивания. Посевы подсушивают в термостате при (37±1)⁰С в течение 20-30 минут. С наружной стороны чашек место нанесения каждой капли фага отмечают карандашом по стеклу или несмываемым перманентным маркером по стеклу. Затем на поверхность подсушенного посева наносят 0,025 - 0,05 см³ бактериофага. Чашки выдерживают в термостате при (37±1)⁰С 20-30 минут до полного впитывания бактериофага, после чего их переворачивают крышками вниз и инкубируют 8-24 часа при той же температуре.

ФГБНУ ФИЦВиМ		Лаборатория Диагностики и Мониторинга	
СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА (СОП)		СОП 00585-01	
Название:	Определение антигенных свойств штаммов представителей рода <i>Bacillus</i>		Страница 6 из 8

Постановку теста «проба фагом» можно проводить с использованием 6-18 ч агаровых культур. Для этого на стерильном физиологическом растворе из колоний сибиреязвенного микроба готовят суспензию микробных клеток с концентрацией 0,5 ЕД МФ. При приготовлении микробных суспензий с использованием денситометра (мутномера) его предварительно калибруют с применением набора стандартов мутности МФ в соответствии с инструкцией по эксплуатации прибора. Постановку пробы фагом проводят, как описано выше. В качестве контроля на бактериальный газон наносят 0,025 - 0,05 см³ физиологического раствора. После инкубации в чашке Петри на монослое бактериальных сибиреязвенных клеток образуется прозрачная зона лизиса на месте нанесения бактериофага. Учет результатов проводится в «крестах».

++++ - зона сливного лизиса в месте нанесения фага при сплошном монослое бактериальной культуры.

+++ - единичные колонии не лизировавшихся клеток в зоне лизиса при сплошном монослое бактериальной культуры.

++ - сплошной полупрозрачный нежный вторичной рост культуры в месте нанесения фага при интенсивном бактериальном росте на остальной поверхности агара (слабочувствительные).

Если в месте нанесения бактериофага формируется сплошной бактериальный «газон» и не выявляется зона специфического лизиса, такая культура считается устойчивой к фагу.

5.8. Обеззараживание посевов, посуды, одежды

Использованный лабораторный пластик (наконечники к дозаторам, 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, чашки Петри с посевами) 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/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.

5.9. 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.

ФГБНУ ФИЦВиМ		Лаборатория Диагностики и Мониторинга
СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА (СОП)		СОП 00585-01
Название:	Определение антигенных свойств штаммов представителей рода <i>Bacillus</i>	Страница 7 из 8

7. Сокращения

- 7.1. АДВ – активное действующее вещество;
- 7.2. БПС – бактериологические питательные среды;
- 7.3. ЕД МФ – единиц МакФарланда;
- 7.4. ПБА – патогенные биологические агенты;
- 7.5. СОП - стандартная операционная процедура;
- 7.6. 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».
- 8.4. СОП ВС 00069 «Инструкция по ветеринарно-санитарному режиму и технике безопасности при работе в боксах».
- 8.5. СОП АД – 00167 «Подготовка посуды к работе».
- 8.6. СОП ЛБ 00409 «Приготовление плотных питательных сред из сухих коммерческих смесей».
- 8.7. СОП ЛБ 00413 «Приготовление жидких питательных сред из сухих коммерческих смесей».
- 8.8. СОП ЛБ 00511 «Качественный контроль биологических свойств питательных сред».
- 8.9. СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности)».
- 8.10. СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)».

9. Приложения.

Лист ознакомления с требованиями СОП – Приложение 1

10. История внесения изменений.

Отсутствует.

