

ФГБНУ ФИЦВиМ		Лаборатория Диагностики и Мониторинга	
СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА (СОП)		СОП 00553-01	
Название:	Определение вирулентности штаммов бактерий на лабораторных животных		Страница 1 из 10

Версия № 01	Дата введения: 28.08.2017
Причина пересмотра:	

Утверждение процедуры	Должность	Ф. И. О.	Подпись	Дата
Разработал	Младший научный сотрудник	Кулагина С.П.		«11» августа 2017 г.
Разработал	Главный научный сотрудник	Селянинов Ю.О.		«14» августа 2017 г.
Разработал	Руководитель лаборатории	Егорова И.Ю.		«16» августа 2017 г.
Согласовал	Ответственный за музей сибиреязвенных штаммов и представителей рода <i>Bacillus</i>	Косяченко Н.С.		«14» августа 2017 г.
Согласовал	Руководитель Государственной коллекции микроорганизмов	Балышев В.М.		«14» августа 2017 г.
Согласовал	Начальник ОСМК	Бобкова Т.Е.		«25» августа 2017 г.
Утвердил	Директор института	Колбасов Д.В.		«28» 08 2017 г.

1. Цель.

Устанавливает порядок определения вирулентности штаммов бактерий на лабораторных животных.

2. Область применения.

Данная СОП применяется при изучении вирулентных свойств штаммов бактерий, как вновь освеженных, так и подлежащих депонированию в Государственную коллекцию микроорганизмов ФГБНУ ФИЦВиМ.

3. Распределение ответственности.

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

Ответственность за реализацию работ, регламентированных настоящей СОП, несут сотрудники, участвующие в процедуре определения вирулентных свойств штаммов бактерий на лабораторных животных.

Определение вирулентности штаммов бактерий на лабораторных животных

ФГБНУ ФИЦВиМ		Лаборатория Диагностики и Мониторинга
СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА (СОП)		СОП 00553-01
Название:	Определение вирулентности штаммов бактерий на лабораторных животных	Страница 2 из 10

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 (обеззараживание клеток для лабораторных животных, посуды, уборочного инвентаря, подготовка виварных помещений, приготовление дезинфицирующих растворов) проводят лаборанты-исследователи.

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.

4.5. Лабораторные животные должны быть подготовлены в соответствии с ГОСТ 33216-2014.

5. Процедура.

5.1. Общие положения.

5.1.1. Все работы с использованием культур микроорганизмов III-IV группы патогенности проводят в боксированных помещениях, со штаммами, относящимися ко II группе патогенности, - в боксах микробиологической безопасности (БМБ) II класса, а работу с животными - в БМБ для работы с животными типа VIS-À-VIS с соблюдением принципа парности.

5.1.2. Подготовку боксового помещения для 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 рабочие и аварийные растворы дезинфекционных средств. При работе с аспорогенными бактериями и микоплазмами в качестве рабочего и аварийного раствора дезинфекционного средства используют 2-х и 5%-ный растворы хлорамина; при работе со спорообразующей микрофлорой (*Bacillus sp.*, *Clostridium sp.*) – 6-ти и 10%-ный растворы перекиси водорода, приготовленными по СОП АД-00011. Срок годности раствора хлорамина 15 суток. Минимальный срок годности растворов

ФГБНУ ФИЦВиМ		Лаборатория Диагностики и Мониторинга
СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА (СОП)		СОП 00553-01
Название:	Определение вирулентности штаммов бактерий на лабораторных животных	Страница 3 из 10

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 аварийных растворах проводят при помощи химических индикаторов серии ДЕЗИКОНТ-ПЕРЕКИСЬ и ДЕЗИКОНТ-ХЛОРАМИН Б.

5.1.4. Работы по приготовлению заражающих суспензий ПБА III-IV групп патогенности, заражение животных, наблюдение и уход за ними проводят в спецодежде, включающей в себя халат медицинский, чепчик, перчатки, а при работе с ПБА II группы патогенности, - в одноразовом защитном противочумном комбинезоне, 12-ти слойной маске и перчатках.

5.1.5. Для характеристики вирулентности пользуются количественными показателями, определяющими способность исследуемой микробной культуры вызывать гибель искусственно зараженных ею подопытных животных.

5.1.6. При выборе вида лабораторного животного необходимо учитывать степень его восприимчивости к изучаемому возбудителю инфекции. Для экспериментального заражения чаще используют белых мышей, морских свинок, крыс и кроликов.

5.1.7. Лабораторных животных (аутбредные белые мыши, морские свинки) получают из отдела подготовки подопытных животных по предварительно поданной заявке. Заражение и содержание животных проводят в виварных помещениях по согласованию с начальником ООББ НИР. В опытах используют только клинически здоровых животных.

5.1.8. Для определения вирулентности применяют споровую культуру или культуру микроба (для неспорообразующих бактерий) в экспоненциальной фазе роста, так как старые культуры содержат большое количество мертвых клеток.

5.1.9. Исследуемую взвесь бактерий (спор) вводят животным различными способами: внутривенно, внутрибрюшинно, внутримышечно, подкожно, интраназально в зависимости от вида ПБА.

5.1.10. Стандартизованную взвесь микробов в изотоническом растворе хлорида натрия, а также разведения бульонной культуры (в тех случаях, когда по каким-либо причинам получить агаровую культуру невозможно, пользуются бульонной культурой) готовят методом серийных разведений с таким расчетом, чтобы различные дозы микроба, используемые в опыте, содержались в одинаковых объемах жидкости.

5.1.11. При определении минимальной смертельной дозы в протоколе опыта учитывают следующие данные:

- масса тела, возраст зараженного животного;
- количество микробов, введенных в организм животного;
- способ их введения;

ФГБНУ ФИЦВиМ		Лаборатория Диагностики и Мониторинга
СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА (СОП)		СОП 00553-01
Название:	Определение вирулентности штаммов бактерий на лабораторных животных	Страница 4 из 10

- сроки гибели после заражения.

5.1.12. Степень вирулентности чаще всего характеризуют тремя следующими показателями:

– минимальная смертельная доза DLM (Dosis Letalis Minima), т.е. наименьшая доза микробов, которая при определенном способе заражения, в определенных условиях опыта вызывает гибель около 95% подопытных животных;

– наименьшая безусловно смертельная доза DCL (Dosis Certa Letalis), т.е. наименьшая доза микробов, являющаяся смертельной для всех 100% животных, взятых в опыт;

– средняя смертельная доза микробов LD₅₀ (Dosis Letalis 50%) доза микробов, вызывающая гибель 50% зараженных животных.

Показатель LD₅₀ позволяет получить более достоверные результаты, и потому он чаще других используется в практике экспериментальных исследований.

5.2. Оборудование и инвентарь:

- бак из нержавеющей стали для сбора трупного материала – 1 шт;
- бак для замачивания клеток емкостью 70 л – 1 шт;
- 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;
- щетка для мытья – 1 шт;
- денситометр DEN-1;
- клетки для содержания лабораторных грызунов типа Dura– 6 шт;
- петля бактериологическая - 1 шт;
- пипетки градуированные вместимостью 0.1, 1.0, 5.0 см³ по ГОСТ 29230;
- пробки резиновые № 14.5 по ТУ 38-006-108;
- пробирки стеклянные бактериологические по ГОСТ 25336 - 5 шт;
- перчатки анатомические ТУ38.106-441-88 – 4 пары;
- спички ГОСТ 1820-2001;
- стерилизатор паровой автоматический ВКА-75 «ПЗ»;
- флаконы пенициллиновые на 10 см³ – 5 шт;
- халат медицинский ГОСТ 24760-81 - 2 шт;
- хладотермостат ХТ 3/40-2;
- цилиндры измерительные ГОСТ 25336-82Е емкостью 250 и 1000 см³ – 2 шт;

ФГБНУ ФИЦВиМ		Лаборатория Диагностики и Мониторинга
СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА (СОП)		СОП 00553-01
Название:	Определение вирулентности штаммов бактерий на лабораторных животных	Страница 5 из 10

- швабра;
- шкаф ламинарного вертикального потока (БМБ);
- шприцы одноразовые инсулиновые вместимостью 1 см³ – 5 шт;
- штатив для лабораторных изделий – 1 шт;
- установка для СО₂ эвтаназии животных – 1 шт.

5.3. Сырье и материалы:

- аутбредные белые мыши живой массой 14-20 г обоих полов – 30 гол;
- бумага пергаментная, ГОСТ 1341-84 – 50 г;
- вата гигроскопическая по ГОСТ 5556 – 0,1 кг;
- вода дистиллированная по ГОСТ 6709 – 5 дм³;
- зажим для пакета для деструкции – 1 шт;
- зонд-тампоны – 10 шт;
- индикатор МедИс-132/20 – 10 шт;
- колпачок-пробка алюминиевый – 5 шт;
- комбинезон защитный противочумный одноразовый – 14 шт;
- корма для лабораторных грызунов – 8 кг (36 кг для морских свинок);
- маркер перманентный – 1 шт;
- маски медицинские (12-ти слойные) – 8 шт;
- маски медицинские – 8 шт;
- морские свинки живой массой 300-400 г обоих полов – 30 гол;
- мясопептонный агар (МПА) – 500 см³ ;
- мясопептонный бульон (МПБ) по ГОСТ 20730 - 5 см³;
- набор красителей по Граму - 1 наб;
- набор стандартов мутности МакФарланда (0,5 – 5 ЕД MF) для калибровки денситометра;
- оптический стандарт мутности на 10 ЕД, производства ГИСК им. Л.А. Тарасевича (ОСМ);
- очки защитные – 2 шт;
- пакет для деструкции – 1 шт;
- перекись водорода 33%-ная - 3 кг;
- перчатки латексные медицинские двукратного хлорирования – 14 пар;
- подстилка (наполнитель) для содержания лабораторных грызунов – 2 кг;
- полотенце бумажное рулонное – 2 шт;
- порошок стиральный «Зифа» - 0,3 кг;
- раствор физиологический стерильный по ГФ Х;
- рулоны для стерилизации с индикатором - 0,1 рул;
- спирт этиловый ректифицированный по ГОСТ 5962;
- спички ГОСТ 1820-2001 -1 кор;
- стекла предметные со шлифованным краем – 1 шт;
- химический индикатор серии ДЕЗИКОНТ-ПЕРЕКИСЬ – 10 шт.;

ФГБНУ ФИЦВиМ		Лаборатория Диагностики и Мониторинга	
СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА (СОП)		СОП 00553-01	
Название:	Определение вирулентности штаммов бактерий на лабораторных животных		Страница 6 из 10

- химический индикатор серии ДЕЗИКОНТ-ХЛОРАМИН Б – 2 шт.;
- хлорамин Б – 10 кг;
- чашки Петри одноразовые стандартные диаметром 90 мм по ГОСТ 25336 – 20 шт;
- чепчик – 2 шт.

5.4. Определение вирулентности на лабораторных животных.

5.4.1. Приготовление инокулюма из неспорогенных бактерий для заражения.

5.4.1.1. 0,3 см³ бульонной культуры исследуемого штамма/изолята, предварительно проверенной на микробиологическую чистоту путем микроскопии мазков, окрашенных по Граму, засевают в пробирку со скошенной ПС, равномерно распределяя ее по поверхности среды. Посевы инкубируют в соответствии с определенными для данного вида микроорганизма условиями (18-24 ч).

5.4.1.2. По истечении сроков инкубации визуально оценивают микробиологическую чистоту культуры, после чего бактериальную массу смывают с поверхности агара физиологическим раствором в объеме 1-2 см³.

5.4.1.3. Конкретные дозы возбудителя в заражающей суспензии зависят от вида микроорганизма и его предполагаемой степени вирулентности. В случае, если вирулентность возбудителя неизвестна, при помощи денситометра либо оптического стандарта мутности готовят микробную суспензию с концентрацией 2×10^9 м.т./см³, из которой готовят 5-ти кратные серийные разведения на физиологическом растворе. При приготовлении микробных суспензий с использованием денситометра (мутномера) его предварительно калибруют с применением набора стандартов мутности MF в соответствии с инструкцией по эксплуатации прибора.

Для уточнения содержания жизнеспособных клеток в заражающих суспензиях проводят определение концентрации методом серийных разведений по СОП 00552.

5.4.2. Приготовление инокулюма из спорных суспензий бактерий

Из спорной суспензии штамма бактерий с известной концентрацией жизнеспособных спор готовят 5-ти кратные серийные разведения на стерильной дистиллированной воде: из разведения 10^9 м.т./см³ для представителей рода *Bacillus* и бескапсульных штаммов *Bacillus anthracis*, из разведения 10^4 спор/см³ для капсулообразующих штаммов сибиреязвенного микроба при использовании в качестве биологической модели аутбредных белых мышей, и из разведения 10^6 спор/см³ при использовании в качестве биологической модели морских свинок.

5.4.3. Инокуляция заражающих суспензий.

ФГБНУ ФИЦВиМ		Лаборатория Диагностики и Мониторинга
СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА (СОП)		СОП 00553-01
Название:	Определение вирулентности штаммов бактерий на лабораторных животных	Страница 7 из 10

5.4.3.1. Животных группируют по 6 голов в 5 групп по принципу аналогов. Каждой группе животных в объеме $(0,5 \pm 0,05)$ см³ вводят приготовленные разведения инокулюма. Таким образом, заражающая доза для животных, при введении им суспензий, приготовленных из микробной суспензии с концентрацией 2×10^9 м.т./см³, для первой группы составляет: 10^9 м.т./гол., второй - 2×10^8 м.т./гол., третьей - 4×10^7 м.т./гол., четвертой - 8×10^6 м.т./гол. и пятой группы - $1,6 \times 10^5$ м.т./гол.

Для культур представителей рода *Bacillus* и бескапсульных сибиреязвенных штаммов, при введении им суспензий, приготовленных из микробной суспензии 10^9 м.т./см³: 5×10^8 м.т./см³, 1×10^8 м.т./см³, 2×10^7 м.т./см³, 4×10^6 м.т./см³, 8×10^5 м.т./см³, а для капсулообразующих штаммов сибиреязвенного микроба при введении суспензий, приготовленных из микробной суспензии 10^4 спор/см³: 5×10^3 спор/см³, 1×10^3 спор/см³, 200 спор/см³, 40 спор/см³ и 8 спор/см³; при введении суспензий, приготовленных из микробной суспензии 10^6 спор/см³: 5×10^5 спор/см³, 1×10^5 спор/см³, 2×10^4 спор/см³, 4×10^3 спор/см³ и 800 спор/см³.

На каждую клетку с зараженными животными маркером наносят маркировку с указанием наименования вида микроорганизма и № штамма или его условное обозначение, заражающую дозу, дату заражения, количество голов в группе.

5.4.3.2. Кормление и уход за зараженными животными осуществляют в соответствии с принятыми нормами.

В течении 10 дней ведут наблюдение за животными и учитывают количество павших и выживших животных в каждой группе. Всех погибших животных вскрывают и делают высевы из органов (сердца, печени, селезенки, легких) методом отпечатков на плотную ПС. Заболевшими считаются только те животные, от которых из внутренних органов была выделена исследуемая культура.

5.4.3. Учет результатов.

Величину LD₅₀ рассчитывают по формуле Кербера в модификации И. П. Ашмарина и А. А. Воробьева с учетом фактического содержания жизнеспособных клеток в каждой заражающей дозе и выражают в КОЕ:

$$\lg LD_{50} = \lg D_N - \delta(\sum L_i - 0,5)$$

где: D_N – фактическая максимальная из испытанных доз;

δ – логарифм кратности испытанных разведений;

L_i – отношение числа животных, павших от введения данной дозы, к общему числу животных, которым эта доза была введена.

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

ФГБНУ ФИЦВиМ		Лаборатория Диагностики и Мониторинга
СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА (СОП)		СОП 00553-01
Название:	Определение вирулентности штаммов бактерий на лабораторных животных	Страница 8 из 10

5.5.1. 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/см^3). 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.

5.5.2. Всех выживших в опыте животных подвергают эвтаназии углекислым газом. Всех павших (после их вскрытия) и умерщвлённых животных помещают в баки для трупного материала, трупы пересыпают хлорамином Б.

Подстилку в освободившихся от животных клетках увлажняют раствором дезинфицирующего средства, выдерживают в течение ночи и перегружают в бак. По окончании опыта, производят обеззараживание трупов и подстилки автоклавированием при 132°C в течение 2-х часов. Обеззараженные трупы и подстилку уничтожают сжиганием в кремационных печах.

5.5.3. Клетки для содержания лабораторных животных замачивают в 6%-ной перекиси водорода на ночь. После обеззараживания их моют с использованием СМС и высушивают на воздухе.

5.5.4. По окончании работ производят дезинфекцию виварного бокса аэрозольным способом с использованием 6%-ной перекиси водорода с 0,5% моющего средства. После дезинфекции производят генеральную уборку по СОП АД-00003 и отбор смывов для контроля качества проведенной дезинфекции.

5.5.5. 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).

5.6. Заполнение учетных форм

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

6. Термины и определения.

6.1. Вирулентность – степень патогенности различных изолятов или штаммов конкретного патогенного вида для животных.

7. Сокращения.

ФГБНУ ФИЦВиМ		Лаборатория Диагностики и Мониторинга
СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА (СОП)		СОП 00553-01
Название:	Определение вирулентности штаммов бактерий на лабораторных животных	Страница 9 из 10

- 7.1. АДВ – активное действующее вещество;
- 7.2. БМБ – бокс микробиологической безопасности;
- 7.3. КОЕ - колониеобразующая единица;
- 7.4. ПБА - патогенные биологические агенты;
- 7.5. ПС - питательные среды;
- 7.6. СМС – синтетическое моющее средство;
- 7.7. СОП - стандартная операционная процедура;
- 7.8. 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 00552- «Определение концентрации жизнеспособных клеток (спор) бактериальных патогенов».
- 8.7. СП 1.3.2322-08 – «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности)».
- 8.8. СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)».

9. Приложения

Приложение 1 Лист ознакомления с требованиями СОП .

10. История внесения изменений.

Отсутствует.

