**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ**

**ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ**

**СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК**

**(ИХБФМ СО РАН)**

**Технологический паспорт коллекции**

**«**Коллекция экстремофильных микроорганизмов и типовых культур»

**Новосибирск - 2017**

**Общая информация:**

* Название коллекции - **«Коллекция экстремофильных микроорганизмов и типовых культур»**
* Держатель коллекции - **Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН)**

**Цели и задачи** – Коллекция экстремофильных микроорганизмов и типовых культур создана, поддерживается и пополняется для выполнения следующих задач:

1. Изучение биоразнообразия различных экосистем.
2. Фаготипирование бактериальных культур.
3. Изучение антибиотикорезистентности, биохимических и генетических характеристик микроорганизмов. Анализ антимикробной активности разрабатываемых препаратов.
4. Проведение идентификации культур микроорганизмов.
5. Регистрация и хранение штаммов-продуцентов.
6. Оказание консультативной и научно-методической помощи научно-исследовательским, образовательным и иным организациям.

**Объем коллекции** – более 3000 штаммов микроорганизмов, более 200 штаммов бактериофагов. Штаммы микроорганизмов охарактеризованы по морфологическим свойствам колоний и клеток, биохимическим свойствам, антибиотикорезистентности, проведена таксономическая идентификация по гену 16S рРНК, сведения хранятся в базах данных. Штаммы бактериофагов охарактеризованы по литическим свойствам, спектру бактерий-хозяев, для части бактериофагов определены геномные последовательности. Информацию об актуальном составе коллекции можно получить по запросу в виде вывода из электронной базы данных.

**АДРЕС:**

630090, Россия, г. Новосибирск,

Пр-т Академика Лаврентьева, 8

http://www.niboch.nsc.ru

**РУКОВОДИТЕЛЬ:**

Тикунова Нина Викторовна, д.б.н.

**КОНТАКТНОЕ ЛИЦО:**

Тикунова Нина Викторовна,

Морозова Вера Витальевна

тел. (383) 363-51-31

e-mail: [tikunova@niboch.nsc.ru](mailto:tikunova@niboch.nsc.ru),

morozova@niboch.nsc.ru

* **Перечень ключевых СОП:**
* СОП «Получение чистой культуры микроорганизма из образца»;
* СОП «Идентификация таксономической принадлежности бактериального изолята по нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК»;
* СОП «Характеризация антибиотикоустойчивости бактериального изолята методом диско-диффузионного анализа»;
* СОП «Идентификация таксономической принадлежности изолята грибов по нуклеотидным последовательностям межгенных спейсеров ITS и NS»;
* СОП «Идентификация бактериального штамма по биохимическим свойствам с использованием анализатора GenIII OmniLog»
* СОП «Проверка жизнеспособности депонированной культуры микроорганизма из Коллекции ЭМТК».

Полная версия СОПов : <http://www.niboch.nsc.ru/doku.php/emtc_collection>

* **Инфраструктура:**
* Молекулярно-биологическая лаборатория
* Боксовые помещения, боксы микробиологической безопасности II класса.
* Комната для хранения.
* **Перечень СОПов:**

**СОП № ЛММБ 2-3-2017-09**

**Получение чистой культуры микроорганизма из образца**

**Составили**: к.б.н., с.н.с. В.В. Морозова, вед. инженер А.В.Бардашева

**Местонахождение:** ИХБФМ СО РАН

Пересмотр через 1 год

1. **Введение, цель**

Настоящая методика устанавливает порядок получения чистой культуры микроорганизма для последующей идентификации и депонирования в Коллекцию ЭМТК.

1. **Назначение**

Получение чистых культур микроорганизмов из различных природных образцов, включая образцы почвы, образцы от животных, растений, людей и пр., является основным этапом пополнения Коллекции ЭМТК.

1. **Термины и определения**

**СОП –** стандартная операционная процедура;

**Асептика** – комплекс мер направленных на предупреждение попадания в рабочую зону сторонних микроорганизмов;

**Селективные среды** – питательные среды для выделения определенных микроорганизмов за счет создания благоприятных для них условий роста и неблагоприятных условий для сопутствующих микроорганизмов других видов;

**РПА** – рыбо-пептонный агар;

**СМА** – сердечно-мозговой агар;

**СМА** – сердечно-мозговой агар.

1. **Пересмотр:** Данная СОП вводится впервые.
2. **Материалы и оборудование**
   1. ***. Материалы и реактивы***

| **Наименование основных реактивов и материалов** | **НТД, производитель, страна** |
| --- | --- |
| РПА | ТУ 9385-012-14237183-07 |
| СМА | BioMerieux, Франция |
| Бактоагар | BD, США |
| Дрожжевой экстракт | BD, США |
| Триптон | BD, США |
| Глицерин | ГОСТ 6259-75 |
| Среда Левина | Oxoid, Великобритания |
| Коринебакагар | ТУ 9398-019-78095326-2006 |
| Среда Китта-Тароцци | Биотехновация, Россия |
| MRS агар | Himedia, Индия |
| Сальмонелла, шигелла агар | Oxoid, Великобритания |
| Агар Мак-Конки без кристаллического фиолетового | BioMerieux, Франция |
| Солевой агар с маннитом | BioMerieux, Франция |
| Агар CLED | BioMerieux, Франция |
| Сабуро агар | BioMerieux, Франция |
| Дезоксихолатный цитратный агар | Oxoid, Великобритания |
| Агар Эндо | ТУ 9398-027-78095326 |
| Пробирки типа Eppendorf, 1.5 мл | Thermo, Россия |
| Наконечники для автоматических дозаторов до 200 мкл | «Eppendorf», США |
| Спирт этиловый, ректифицированный | ЛРС 000279/10 |
| Перекись водорода, медицинская | ГОСТ 177-88 |
| Вода дистиллированная рН от 5,0 до 7,0. | ГОСТ 6709-72 |
| Натрий хлористый, хч | ГОСТ 4233-77 |
| Чашки Петри, пластиковые диаметр 90 мм | Greiner Bio-One, Австрия |
| Чашки Петри, пластиковые диаметр 90 мм, трехсекционные, четырехсекционные | Greiner Bio-One, Австрия |
| Предметные стекла | Isolab, Германия |
| Пакеты для стерилизации | Citotest, Китай |
| Покровные стекла | Стеклоприбор, Россия |
| Набор красителей по Грамму | БиоВитрум, Россия |
| Бактериологическая петля пластиковая одноразовая | Citotest, Китай |
| Газогенерирующие пакеты, 3,5 л | Oxoid, Великобритания |
| Флаконы градуированные c завинчивающейся крышкой, 500 мл | Isolab, Германия |
| Спиртовка лабораторная | ГОСТ 23932-90Е |
| Пробирки с закручивающимися крынками, 2,0 мл DNase-free, RNase-free | SSIBIO, США |
| Колбы мерные вместимостью 250 мл | ГОСТ 1770-74 |
| Комплект цилиндров вместимостью 50 мл, 500 мл и 1 л | ГОСТ 1770-74 |
| Петля микробиологическая с ушком, d 1,5 мм, нержавеющая сталь | Bochem, Германия |

* 1. ***Оборудование***

|  |  |
| --- | --- |
| **Оборудование** | **НТД, производитель, страна** |
| Баня водяная лабораторная | BioSan, Латвия |
| Бокс биологической (микробиологической) безопасности II класс | Lamsystems, Россия |
| Микроскоп Imager A2 | Carl Zeiss, Швейцария |
| Холодильник | Indesit, Италия |
| Автоматическая пипетка вместимостью 20÷200 мкл | «Ленпипет», Россия |
| Весы электронные аналитические | Ohaus, США |
| Термостат суховоздушный лабораторный ТСвЛ-80 | ТУ-9452-006-07505566-2006 |
| Анаэростат, 2,5 л | Oxoid, Великобритания |
| Автоклав ВК-75 | ТЗМОИ, Россия |
| Вортекс | BioSan, Латвия |

* 1. ***Комплект спецодежды***

|  |  |
| --- | --- |
| **Одежда** | **НТД, производитель, страна** |
| Колпак медицинский | ГОСТ 2313478 |
| Перчатки хирургические резиновые | ГОСТ 3-88 |
| Маска медицинская | ГОСТ EN 13795-1-2011 |
| Халат медицинский | ГОСТ 24760-81 |

1. **Помещения**
2. Проведение работ осуществляется в боксовых помещениях, в которых находятся боксы биологической (микробиологической) безопасности II класса.
3. **Процедура**
   1. ***Подготовительный этап***

***7.1.1. Подготовка персонала к проведению работ***

– надеть медицинский халат и перчатки

***7.1.2. Приготовление дезинфицирующего раствора***

– приготовить 3% раствор перекиси водорода, в стеклянный цилиндр налить (100±1) мл 30% перекиси водорода и довести объем до 1000 мл водопроводной водой, данный раствор может быть использован в течение 48 ч;

***7.1.3. Подготовка боксового помещения к работе***

– обработать 3% раствором перекиси водорода поверхности помещения и оборудования до начала работ;

– обработать ламинарный бокс и помещение ультрафиолетовыми лучами до начала работ в течение 15 мин.

***7.1.4.*** ***Приготовление 70% раствора этилового спирта***

– налить в стеклянный цилиндр (70±1) мл 96% этилового спирта и довести объем до 100 мл дистиллированной водой;

***7.1.5. Приготовление LB-среды для хранения культур***

– приготовить 50% (об./об.) раствор глицерина в дистиллированной воде;

– автоклавировать при 121°С в течение 15 мин;

– взвесить (3,0±0,1) г триптона, внести в мерный циллиндр;

– взвесить(1,5±0,1) г дрожжевого экстракта, внести в мерный цилиндр с триптоном. Добавить дистиллированной воды до 300 мл;

– разлить по флаконам градуированным;

– автоклавировать при 121°С в течение 15 мин;

– смешать в асептических условиях равные объемы среды LB и 50% раствора глицерина;

– разлить в стерильные пробирки объемом 2 мл с завинчивающейся крышкой по 200 мкл. Инкубировать при (36±1)°С в течение 18 – 24 ч для выявления случайной контаминации.

***7.1.6. Приготовление физиологического раствора***

– взвесить (0,9±0,1) г хлорида натрия, внести в мерную колбу вместимостью 100 мл и добавить дистиллированной воды до метки;

– перемешать до полного растворения соли;

– разлить по флаконам градуированным;

– автоклавировать при 121°С в течение 15 мин.

***7.1.7. Подготовка чашек Петри с питательной средой***

– приготовить питательную среду согласно инструкции производителя;

– разлить питательную среду после автоклавирования в стерильные чашки Петри толщиной (4,0±0,5) мм и оставить для застывания при комнатной температуре.

***7.2. Основной этап***

***7.2.1. Первичная микроскопия***

***7.2.1.1 Микроскопия нативных препаратов***

– обжечь предметное стекло в пламени спиртовки;

– нанести небольшое количество стерильного физиологического раствора;

– внести прокаленной бактериологической петлей небольшое количество образца. Петлю обеззараживают прожиганием. Сверху препарат накрыть покровным стеклом;

– микроскопировать, производя первичную идентификацию по морфологическим свойствам;

– погрузить препарат в 3% раствор перекиси водорода после окончания микроскопирования. Экспозиция не менее 6 ч.

***7.2.1.2. Микроскопия мазков окрашенных по Грамму***

– обжечь предметное стекло в пламени спиртовки;

– нанести небольшое количество стерильного физиологического раствора;

– внести прокаленной бактериологической петлей небольшое количество образца. Петлю обеззараживают прожиганием;

– оставить предметное стекло на воздухе до полного высушивания;

– провести фиксацию микропрепарата: предметное стекло трижды накладывают на пламя спиртовки в верхней части на 2 секунды с интервалом 4 секунды (суммарно в пламени 6 секунд). Это позволяет убить микроорганизмы, прикрепить их к стеклу и повысить восприимчивость к красителям;

– поместить на мазок полоску фильтровальной бумаги и нанести на фиксированный мазок несколько капель карболового раствора генцианвиолета (реагент 1) и выдержать 2-3 минуты. Слить краску, удалить фильтровальную бумагу и сполоснуть в проточной воде (до 30 сек);

– залить мазок на 1-2 мин раствором Люголя (реагент 2) до почернения препарата;

– слить раствор, мазок промыть дистилированной водой;

– дифференцировать 96° спиртом, наливая и сливая его, пока отходит синяя краска и не обесцветится мазок (приблизительно 20-60 секунд). Во время дифференцировки препарат все время покачивают;

– промыть тщательно стекло в дистиллированной воде 1-2 мин;

– окрасить препарат дополнительно раствором сафранина (реагент 3) (несколько капель) в течение 2-3 минут для выявления грамотрицательной группы бактерий;

– промыть в проточной воде и высушить фильтровальной бумагой. Грамположительные бактерии имеют сине-фиолетовый цвет (темно-синий), а грамотрицательные - розово-красный, красный или коричневый;

– микроскопировать, производя первичную идентификацию по морфологическим свойствам;

– погрузить препарат в 3% раствор перекиси водорода после окончания микроскопирования. Экспозиция не менее 6 ч.

***7.2.2. Первичный посев на селективные среды***

– обработать рабочую поверхность ламинарного бокса и руки 70% раствором спирта;

– при неизвестных условиях роста микроорганизмов посев проводить параллельно на трех- или четырехсекционные чашки Петри с различными питательными средами и инкубировать их после посева при различных температурных условиях и различном газовом составе окружающей атмосферы;

– прокалить бактериологическую петлю в пламени спиртовки, остудить, забрать материал и густо засеять верхнее поле чашки Петри с соответствующей питательной средой, для выделения чистой культуры (Таблица 1);

**Таблица 1.Селективные среды**

|  |  |
| --- | --- |
| **Питательная среда** | **Группа микроорганизмов** |
| Среда Левина | энтеробактерии, стафилококки |
| Коринебакагар | коринебактерии |
| Среда Китта-Тароцци | анаэробные микроорганизмы |
| MRS агар | лактобактерии |
| Дифференцирующий сальмонелла-шигелла агар | сальмонеллы, шигеллы |
| Агар Мак-Конки без кристаллического фиолетового | энтеробактерии |
| Солевой агар с маннитом | стафилококки |
| Агар CLED | микроорганизмы мочевыводящих путей |
| Сабуро агар | грибы |
| Дезоксихолатный цитратный агар | сальмонеллы |
| Агар Эндо | энтеробактерии |
| Почвенный агар | почвенные микроорганизмы |

– прокалить петлю, внести в густо засеянный сектор и провести 2 – 3 вертикальные линии по всей чашке;

– перевернуть чашку, при этом густо засеянный сектор останется на нижнем поле чашки;

– прокалить петлю и разнести посев по чашке 2 – 3 горизонтальными штрихами для получения отдельных колоний;

– для выявления микроорганизмов из образцов взятых от животных и людей поместить засеянные чашки Петри в термостат кверху дном и инкубировать при температуре 36 °С в течение 18 – 72 ч.

– для выявления термотолерантных и термофильных природных микроорганизмов чашки Петри инкубировать при 45 °С, 60 °С и 75 °С в течение 18 – 72 ч.

– для выявления психротолерантных и психрофильных природных микроорганизмов чашки Петри инкубировать при 4 °С и при комнатной температуре в течение 18 – 72 ч. Чашки с анаэробами помещают в термостат в анаэростате и инкубируют до 72 часов.

***7.2.3. Вторичный посев на неселективные среды***

– изучить морфологию изолированных колоний:

величину колоний (крупные, средние, мелкие, карликовые);

форму колоний (правильная, неправильная, круглая);

прозрачность колоний (прозрачная, непрозрачная);

цвет (бесцветные или окрашенные);

характер поверхности (гладкая, бугристая, блестящая, шероховатая);

высоту колоний над поверхностью среды (вдавленная, плоская, возвышающаяся);

край колоний (ровный, неровный);

структуру колонии (гомогенная, негомогенная);

при взятии мазка оценить консистенцию (мягкая, слизистая, сухая);

– микроскопировать мазки, окрашенные по Грамму, из изолированных колоний для суждения об однотипности микроорганизмов из образца;

– пересеять остатки колоний на отдельные чашки с неселективной питательной средой (РПА, СМА) источающим штрихом и инкубировать при (36±1)°С в течение 18 – 24 ч.

– микроскопировать мазки из чистой культуры. При выявлении смешанной культуры данный этап повторяют.

***7.2.4. Хранение чистых культур***

– присвоить новой культуре порядковый номер КЭМТК;

– отобрать достаточное количество материала для хранения с суточных чашек Петри с чистой культурой стерильной пластиковой бактериальной петлей и поместить в пробирки со средой LB, предназначенной для хранения, использовать пробирки в закручивающейся крышкой и резиновой прокладкой для того, чтобы избежать вымораживания;

– перемешать на вортексе и поместить три пробирки на хранение при температуре –20 °С, три на хранение при температуре –70 °С;

***7.3. Завершающий этап***

– замочить учтенные чашки Петри в 6% растворе перекиси водорода, избегая образования воздушных пробок. Экспозиция не менее 6 ч.

– обработать 3% раствором перекиси водорода поверхности помещения и оборудования после окончания работ;

– обработать ламинарный бокс и помещение ультрафиолетовыми лучами после окончания работ в течение 15 мин.

1. **Охрана труда и техника безопасности**

При проведении процедуры необходимо соблюдать следующие инструкции по технике безопасности и инструкции по биобезопасности:

1. ИОТ – 02 Инструкция по ОТ для неэлектротехнического персонала по электробезопасности на I квалификационную группу;
2. ИОТ – 10 Инструкция по ОТ при работе с облучателем бактерицидным ОБНП 2(2х15-01) «Генерис»;
3. ИОТ – 34 Инструкция по ОТ при работе с ЛВЖ в лабораториях института;
4. ИОТ – 72 Инструкция по ОТ при работе с перекисью водорода и органическими перекисными соединениями;
5. ИОТ – 86 Инструкция о мерах ПБ в лабораториях;
6. ИОТ – 99 Правила работы с микроорганизмами III-IV группы патогенности и возбудителями паразитарных болезней.
7. **Ссылки**
8. Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности и гельминтами. Санитарные правила. СП 1.2.731-99. – М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 1999.- 107с.
9. Донецкая Э. Г.-А. Клиническая микробиология: Руководство для специалистов клинической лабораторной диагностики. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. – 480 с.
10. Методические рекомендации к проведению практических занятий по дисциплине «Микробиология, вирусология, иммунология» для студентов медико-профилактического факультета/ сост. В.И. Коноплева, Т.М. Гусева: ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России, Рязань: РИО РязГМУ, 2015. – 147 с.
11. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования/ Под ред. М.О. Биргера. – 3-е изд., перераб. и доп. – М., Медицина, 1982. – 464 с.

**Список ознакомления**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| № | ФИО | Должность | Дата | Подпись исполнителя | Подпись руководителя |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |

**СОП № ЛММБ 2-4-2017-09**

**Идентификация таксономической принадлежности бактериального изолята по нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК**

Составили: к.б.н., с.н.с. В.В. Морозова, вед. инженер А.В.Бардашева

**Местонахождение:** ИХБФМ СО РАН

Пересмотр через 1 год.

* + - 1. **Введение, цель**

Настоящая методика устанавливает порядок идентификации бактериального изолята по нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК.

1. **Назначение**

Данная методика позволяет идентифицировать микроорганизм до вида/рода по нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК. Исследованию подлежат чистые культуры бактерий перед депонированием в коллекцию ЭМТК и штаммы, депонированные в КЭМТК при необходимости в повторной ре-идентификации.

1. **Термины и определения**

**СОП –** стандартная операционная процедура;

**ПЦР –** полимеразная цепная реакция;

**Секвенирование** – определение последовательности ДНК;

ТАЕ – трис-ацетатный буфер

1. **Материалы и оборудование**

***Материалы и реактивы***

| **Наименование основных реактивов и материалов** | **ГОСТ, ОСТ, страна** |
| --- | --- |
| Пробирки типа Eppendorf, 1,5 мл, DNase-free, RNase-free | Axigen, США |
| Пробирки типа Eppendorf, 0,2 мл DNase-free, RNase-free | Axigen, США |
| Наконечники для автоматических дозаторов до 200 мкл и до 1000 мкл с фильтром, DNase-free, RNase-free | «Eppendorf», США |
| Смесь дезоксирибонуклеозидтрифосфатов для ПЦР (25 мМ) | БиоСан, Новосибирск |
| Taq ДНК-полимераза | Thermo Fisher Scientific, CША |
| ДНК-буфер | Thermo Fisher Scientific, CША |
| Прямой праймер,  8F 5`-AGRGTTTGATCCTGGCTCA-3` | БиоСан, Новосибирск |
| Обратный праймер,  1350R 5`-GACGGGCGGTGTGTACAAG-3` | БиоСан, Новосибирск |
| Вода для инъекций | ЛП-002529 |
| Пленка Parafilm | Pechiney Plastic Packaging Company, США |
| Спирт этиловый | ЛРС 000279/10 |
| Агароза для электофореза | Sigma, США |
| Маркер молекулярных масс ДНК 1 kb | СибЭнзим, Россия |
| GTG-агароза | Lonza, Израиль |
| Трисгидроксиметиламинометан (Tris-base) | Sigma, США |
| ЭДТА | Sigma, США |
| Ацетат натрия, осч | Sigma, США |
| Кристаллический фиолетовый | Sigma, США |
| Глицерин | Sigma, США |
| Комплект реагентов для постановки реакции секвенирования BigDye® Terminator v3.1 Sequencing Kit | Applied Biosystems, США |
| Полипропиленовые пробирки, 50 мл | Falcon, США |
| Реагент-растворитель Hi-Di Formamide | Appied Biosystems, CША |
| Планшет для нанесения продуктов реакции Сэнгера | Appied Biosystems, CША |
| Септа для планшетов | Appied Biosystems, CША |
| Септа для анодного буфера | Appied Biosystems, CША |
| Полимер POP-7 | Appied Biosystems, CША |
| Катодный буфер | Appied Biosystems, CША |
| Анодный буфер | Appied Biosystems, CША |
| Реактив для очистки помпы автоматического секвенатора | Appied Biosystems, CША |
| Капиллярный блок для автоматического секвенатора 3500 Genetic Analyzer | Appied Biosystems, CША |
| Колонки Centrisep Spin Columns | Princeton Separations Inc., США |
| Сорбент Sephadex G-50 Superfine | GE Healthcare, Щвеция |
| Концентрированная (ледяная) уксусная кислота | Реахим, Россия |
| Перекись водорода, медицинская | ГОСТ 177-88 |
| Дистиллированная вода | ГОСТ 6709-72 |
| Центрифужные фильтры Амикон Ультра-4. 100 кДа | Millipore, Ирландия |
| Тампон-зонды, целлюлоза, 15 см | Ningbo Greetmed Medical Insruments, Китай |
| Спиртовка лабораторная | ГОСТ 23932-90Е |
| Мерные цилиндры вместимость 50 мл, 500 мл, 1000 мл | ГОСТ 1770-74 |
| Колба 250 мл из термостойкого стекла | ГОСТ 1770-74, Россия |
| Хирургический скальпель | Тумботино, Россия |
| Пластиковая стерильная бактериологическая петля | Citotest, Китай |
| Чашки Петри, пластиковые диаметр 90 мм | Greiner, Австрия |

***Оборудование***

|  |  |
| --- | --- |
| **Оборудование** | **ГОСТ, ОСТ, страна** |
| Бокс абактериальной воздушной среды (класс биологической безопасности II тип А или В) | LabSystems, Россия |
| Твердотельный термостат для пробирок типа Eppendorf | BioSan, Латвия |
| Микроцентрифуга «Minispin» | Eppendorf, Германия |
| Центрифуга Eppendorf | Eppendorf, Германия |
| Вортекс | BioSan, Латвия |
| Пипетки вместимостью 100÷1000 мкл  вместимостью 100÷1000 мкл  вместимостью 20÷200 мкл  вместимостью 200 мкл  вместимостью 20 мкл | «Ленпипет», Россия  «Ленпипет», Россия  «Ленпипет», Россия  «Ленпипет», Россия  «Ленпипет», Россия |
| Холодильник | Indesit, Италия |
| Aвтоматический секвенатор 3500 Genetic Analyzer | Appied Biosystems, CША |
| Программируемый амплификатор PCR System 9700 | Appied Biosystems, CША |
| Камера для горизонтального электрофореза SE-2 | Хеликон, Россия |
| Источник питания «Эльф» | ДНК-технология, Россия |
| Ультрафиолетовый трансиллюминатор Molecular Imager GelDocTM XR System | BioRad, США |
| Вакуумный концентратор Concentrator plus | Eppendorf, Германия |
| Трансиллюминатор TFP-M/WL | Vilber Lourmat, Франция |
| Весы электронные | Ohaus, Швейцария |
| Термостат суховоздушный | ТУ-9452-006-07505566-2006 |

***Комплект спецодежды***

|  |  |
| --- | --- |
| **Одежда** | **ГОСТ, ТУ, НТД** |
| Колпак медицинский | ГОСТ 2313478 |
| Перчатки резиновые | ГОСТ 3-88 |
| Маска медицинская | ГОСТ EN 13795-1-2011 |
| Халат медицинский | ГОСТ 24760-81 |

1. **Помещения**

Проведение работ осуществляется в боксовых помещениях, в которых находятся боксы биологической (микробиологической) безопасности II класса, а также в помещениях, предназначенных для общих молекулярно-биологических работ.

1. **Процедура**

***Подготовительный этап***

***6.1.2. Подготовка персонала к проведению основных работ***

– надеть хирургический халат, перчатки перед началом работ.

***6.1.2. Приготовление 70% раствора этилового спирта***

– налить в стеклянный цилиндр (70±1) мл 96% этилового спирта и довести объем до 100 мл дистиллированной водой;

***6.1.3. Приготовление 1%-ного агарозного геля***

– взвесить (1,5±0,1) г агарозы и пересыпать в стеклянную колбу из термостойкого стекла;

– добавить 100 мл рабочего электрофорезного буфера, перемешать и расплавить в СВЧ-печи до полного растворения агарозы;

– остудить до температуры 65 – 70 °С.

– поместить плашку для заливки геля на заливочный столик, установленный горизонтально, и переместить стенку столика вплотную до плашки для заливки геля. Зафиксировать стенку поворотом винта. Выровнять столик для заливки геля. Вставить гребенку в плашку и залить расплавленный охлажденный до температуры 65 – 70 ºС гель в плашку толщиной 0,6 см. Если образовались пузыри, их необходимо удалить;

– вынуть гребенку из геля после полного застывания, не повредив карманы, отвернуть винт и отодвинуть стенку столика;

– поместить плашку с готовым гелем в камеру для горизонтального электрофореза;

– залить в камеру рабочий раствор буфера в таком количестве, чтобы он покрывал гель на 5 мм сверху;

– промыть карманы пипетированием, не касаясь дна, аккуратно. Убедиться в отсутствии пузырьков воздуха в них.

***6.1.4. Приготовление концентрированного буфера ТАЕ (20×)***

– взвесить 108,8 г ацетата натрия трехводного, 193,6 г Tris-base, 14,88 г ЭДТА;

- растворить в 1,5 л дистиллированной воды, довести pH до 8.0 ледяной уксусной кислотой и довести объем раствора в мерном цилинде до 2 л.

***6.1.5. Приготовление концентрированного буфера TAE-GTG (20×) для очистки фрагментов ДНК через GTG-агарозу***

– взвесить 48,4 г Tris-base, 0,37 г ЭДТА;

- растворить в 100мл дистиллированной воды, добавить 14,4 мл ледяной уксусной кислоты и довести объем раствора в мерном цилиндре до 200 мл.

***6.1.6. Приготовление рабочего буфера ТАЕ***

– влить в мерный цилиндр 50 мл концентрированного ТАЕ и довести дистиллированной водой до 1000 мл, закрыть пленкой Parafilm и перемешать.

***6.1.7. Приготовление рабочего буфера ТАЕ-GTG***

– влить в мерный цилиндр 20 мл концентрированного ТАЕ-GTG и довести дистиллированной водой до 1000 мл, закрыть пленкой Parafilm и перемешать.

***6.1.8. Приготовление раствора кристаллического фиолетового***

– взвесить (2,0±0,1) мг красителя и растворить в бидистиллированной воде.

***6.1.9. Приготовление буфера для нанесения проб на гель***

– взвесить (1,0±0,1) мг кристаллического фиолетового, добавить 3 мл стерильного глицерина и довести объем рабочим ТАЕ буфером до 10 мл.

***6.1.10. Приготовление 0,6% геля GTG-агарозы***

– взвесить (0,3±0,1) г GTG-агарозы и пересыпать в стеклянную колбу из термостойкого стекла на 250 мл;

– добавить 50 мл рабочего буфера ТАЕ-GTG, перемешать и расплавить в СВЧ-печи до полного растворения агарозы;

– остудить до температуры 65 – 70 °С, добавить 20мкл красителя кристаллического фиолетового из стокового раствора с концентрацией 2мг/мл.

– поместить плашку для заливки геля на заливочный столик, установленный горизонтально, и переместить стенку столика вплотную до плашки для заливки геля. Зафиксировать стенку поворотом винта. Выровнять столик для заливки геля. Вставить гребенку в плашку и залить расплавленный охлажденный до температуры 65 – 70 ºС гель в плашку толщиной 0,6 см. Если образовались пузыри, их необходимо удалить;

– вынуть гребенку из геля после полного застывания, не повредив карманы, отвернуть винт и отодвинуть стенку столика;

– поместить плашку с готовым гелем в камеру для горизонтального электрофореза;

– залить в камеру рабочий раствор буфера в таком количестве, чтобы он покрывал гель на 5 мм сверху;

– промыть карманы пипетированием, не касаясь дна, аккуратно. Убедиться в отсутствии пузырьков воздуха в них.

***6.1.11. Подготовка колонок для гель-фильтрации***

– взвесить в полипропиленовой пробирке типа Falcon объемом 50 мл сорбент Sephadex G-50 Superfine из расчета 50 мг сорбента на одну реакцию. Добавить 1 мл бидистиллированной воды. Оставить набухать в воде в течение 30 мин, периодически перемешивая;

– выставить приемники с вложенными в них чистыми колонками Centrisep Spin Colomns в штатив;

– внести в чистый корпус колонки набухший сорбент в количестве 1 мл и центрифугировать в течение 5 мин при угловом ускорении 900g. При этом необходимо строго соблюдать однообразную ориентацию колонок при центрифугировании;

– удалить воду из приемника;

– добавить 200 мкл бидистиллированной воды для промывки сорбента и центрифугировать в течение 5 мин при угловом ускорении 900g;

– удалить воду из приемника. Хранить приготовленные колонки можно не более 1 часа.

***6.2. Основной этап***

***6.2.1. Отбор образцов***

– разлить по 20 мкл стерильной воды для инъекций в пробирки типа Eppendorf объемом 0,2 мл;

– отобрать среди однотипных колоний две, четко изолированные колонии суточной культуры, выросшей на неселективных плотных питательных средах;

– перенести бактериологической петлей незначительное количество материала с двух выбранных колоний в пробирки с водой, каждую колонию в отдельную пробирку.

***6.2.2. Полимеразная цепная реакция***

– прогреть пробирки с образцами в течение 10 мин при 95ºС в твердотельном термостате;

–центрифугировать в течение 5 мин при 10000 об./мин;

– приготовить ПЦР-смесь, исходя из того, что на один образец потребуется 29,0 мкл смеси следующего состава:

ДНК-буфер 3,0 мкл;

смесь четырех дезоксирибонуклеозидтрифосфатов 0,3 мкл;

Taq-полимераза 0,2 мкл в концентрации 5 ед/мкл;

прямой праймер 1,0 мкл в концентрации 10 пмоль;

обратный праймер 1,0 мкл в концентрации 10 пмоль;

добавить воду для инъекций до 30 мкл;

– центрифугировать ПЦР-смесь через центрифужный фильтр Амикон Ультра-4. 100 кДа в течение 5 мин при 2000 об./мин;

– внести в пробирки по 29,0 мкл ПЦР-смеси и 1,0 мкл образца;

– внести в отдельную пробирку 29,0 мкл ПЦР-смеси и 1,0 мкл ДНК-буфера (отрицательный контроль);

– осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием на микроцентрифуге (10 – 20 сек);

– запустить программу амплификатора (Tабл. 1);

**Таблица 1.** Условия амплификации для гена 16S рРНК

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Стадии амплификации | Температура, ºС | Время, мин | Количество циклов |
| 1 | Предварительный прогрев матрицы | 95 ºС | 5 | 1 |
| 2 | Денатурация матрицы | 95 | 0,5 | 30 |
| Отжиг праймеров | 50 | 0,5 |
| Элонгация | 72 | 1,5 |
| Финальная элонгация | 72 | 10 | 1 |
| 3 | Хранение | 4 | - | - |

– поместить пробирки в ячейки амплификатора, после того, как температура в ячейке амплификатора достигнет 95 ºС. Закрыть крышку прибора и снять программу с паузы. Пробы после амплификации можно хранить 16 ч при комнатной температуре или в течение недели при температуре 2 – 8 ºС.

***6.2.3. Электрофорез в агарозном геле в буфере ТAЕ***

– залить агарозный гель согласно п. 6.1.3;

– внести в каждую лунку 1%-ного агарозного геля по 5 мкл образца ПЦР-продуктов, включая отрицательный контроль. В отдельные карманы внести маркер молекулярных масс в каждом ряду дорожек;

– подключить камеру к источнику постоянного электрического тока. Выставить параметры источника: напряжение 250В, сила тока 100 мА, 10 Вт, время 20 мин. Оптимальная напряженность электрического поля при этом составляет 10 В/см;

– выключить источник тока после завершения электорофореза, отсоединить провода от источника тока, перенести гель на трансиллюминатор;

– задокументировать полученную картину распределения ПЦР-фрагментов в агарозном геле после проведения электрофореза при помощи трансиллюминатора;

– определить образцы с достаточным количеством ПЦР-фрагментов для секвенирования. Образцы можно использовать для дальнейшего секвенирования только в том случае, если в отрицательном контроле отсутствуют ПЦР-фрагменты.

***6.2.4. Очистка продуктов ПЦР с помощью GTG-агарозы***

– залить агарозный гель согласно п. 6.1.10;

– внести в каждую лунку до 15 мкл образца;

– подключить камеру к источнику постоянного электрического тока. Выставить параметры источника: напряжение 250 В, сила тока 100 мА, 10 Вт, время 7 мин. Оптимальная напряженность электрического поля при этом составляет 10 В/см;

– выключить источник тока после завершения электорофореза, отсоединить провода от источника тока, перенести гель на трансиллюминатор с подсветкой белым светом;

– взять хирургический скальпель и предварительно обработать 70% раствором этилового спирта;

– вырезать аккуратно фрагмент агарозного геля, содержащий продукт ПЦР необходимого размера, стараясь захватить как можно меньше самого геля, и поместить его в обрезанный наконечник для автоматических дозаторов объемом 200 мкл с фильтром;

– перенести наконечник с фрагментом геля в пронумерованную пробирку типа Eppendorf объемом 1,5мл. Перед вырезанием каждого следующего фрагмента хирургический скальпель необходимо обрабатывать 70% раствором этилового спирта во избежание контаминации образцов;

– поместить пробирки с фильтрами, содержащими вырезанные фрагменты агарозного геля в центрифугу, и центрифугировать пробирки в течение 5 мин на максимальной скорости;

– вынуть наконечники из пробирок, пробирки закрыть и перенести в холодильник.

***6.2.5. Реакция Сенгера***

– подготовить микропробирки объемом 0,2 мл, закрыть их и подписать в соответствии с номерами образцов и праймеров;

–используя наконечники с фильтрами, приготовить реакционную смесь следующего состава из расчета 30 мкл на образец:

буфер для секвенирования BigDye® Terminator v3.1 Sequencing Buffer (5×) – 6 мкл,

реагент BigDye® Terminator v3. – 1 мкл,

прямой праймер 8F – 1мкл в концентрации 3,3 пмоль или обратный праймер 1350R в тех же количествах,

ДНК-матрица, очищенная с использованием GTG-агарозы, в количестве около 100 нг и объемом не более 1/3 от объема реакционной смеси,

довести объем реакционной смеси до 30 мкл бидистиллированной водой.

– перемешать смесь на вортексе и осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием на микроцентрифуге (10 – 20 сек);

– поместить пробирки в ячейки амплификатора, закрыть крышку прибора и запустить программу амплификатора (табл. 2)

**Таблица 2.** Условия реакции секвенирования по Сенгеру для ПЦР-фрагментов гена 16S рРНК

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Стадии реакции секвенирования | Температура | Время | Количество циклов |
| 1 | Денатурация матрицы | 98 °С | 10 с | 34 |
| Отжиг праймера | 50 °С | 5 с |
| Элонгация | 60 °С | 4 мин |
| 2 | Дополнительное прогревание | 98 °С | 3 мин | 1 |
| 3 | Хранение | 20 °С | – | – |

***6.2.6. Очистка продуктов реакции Сенгера***

– подготовить пробирки-приемники типа Эппендорф объемом 1,5 мл для очистки продуктов реакции Сенгера. Подписать их в соответствии с номерами анализируемых проб и названиями используемых праймеров. Поместить колонки, содержащие сефадекс G50 (раздел 6.1.11.) в подготовленные пробирки;

– аккуратно, не касаясь столбика сорбента, нанести всю реакционную смесь, содержащую продукты реакции секвенирования в центр столбика сорбента;

– центрифугировать в течение 5 мин при угловом ускорении 900g;

– извлечь колонки, содержащие столбики сорбента из пробирок-приемников. В пробирках приемниках объемом 1,5 мл должно находиться около 30 мкл жидкости, содержащей очищенные продукты реакции Сенгера;

– колонки, содержащие столбики сорбента, очистить от сорбента (для этого достаточно просто вытряхнуть его).

– высушить очищенные продукты реакции в вакуумном концентраторе при 45 °С;

– передать высушенные продукты реакции на автоматический секвенатор 3500 Genetic Analyzer, для проведения капиллярного гель-электрофореза.

***6.3. Капиллярный гель-электрофорез продуктов реакции Сэнгера***

– разморозить реагент-растворитель Hi-Di Formamide из расчета 15 мкл на один образец;

– в пробирку с очищенными и высушенными продуктами реакции Сэнгера автоматическим дозатором добавить формамид в количестве 15 мкл;

– тщательно перемешать содержимое пробирки на вортексе;

– сбросить капли со стенок пробирки кратковременным центрифугированием;

– используя автоматический дозатор перенести весь объем жидкости из пробирки в планшет для загрузки образцов в автоматический секвенатор, запечатать планшет септой для планшетов;

– прогреть планшет в течении 2 минут при 96°С в термостате, затем перенести в емкость с водно-ледяной смесью для быстрого охлаждения;

– поместить планшет в адаптер для автоматического секвенатора и установить его в прибор;

– запустить программу параметров разделения образцов и выгрузки данных на компьютере управления автоматическим секвенатором;

– по окончанию разделения продуктов реакции Сэнгера обсчитать полученные данные с помощью ПО Sequencing Analysis Software 6.0, принимая во внимание наборы реактивов и расходных материалов, которые использовались для синтеза продуктов реакции Сэнгера.

***6.4. Анализ данных***

– провести предварительный анализ полученных нуклеотидных последовательностей с использованием программного продукта Sequencher v.4.1.;

– сравнить полученные нуклеотидные последовательности с ранее опубликованными с использованием алгоритма Basic Local Alignment Search Tool (BLASTN) с использованием сервера Национального центра биотехнологической информации (NCBI, США), включающего базы данных GenBank (США), EMBL (Европа), DDBJ (Япония);

– выбрать наиболее близкий по нуклеотидной последовательности бактериальный штамм из базы данных NCBI GenBank и в соответствии с ним идентифицировать депонированный в КЭМТК коллекционный штамм.

***6.5. Завершающий этап***

– Полученные данные внести в электронную базу данных КЭМТК.

1. **Охрана труда и техника безопасности**

При проведении процедуры необходимо соблюдать следующие инструкции по технике безопасности и инструкции по биобезопасности:

1. ИОТ – 02 Инструкция по ОТ для неэлектротехнического персонала по электробезопасности на I квалификационную группу;
2. ИОТ – 10 Инструкция по ОТ при работе с облучателем бактерицидным ОБНП 2(2х15-01) «Генерис»;
3. ИОТ – 34 Инструкция по ОТ при работе с ЛВЖ в лабораториях института;
4. ИОТ – 86 Инструкция о мерах ПБ в лабораториях;
5. ИОТ – 99 Правила работы с микроорганизмами III-IV группы патогенности и возбудителями паразитарных болезней.

**Ссылки**

1. Выявление и исследование нуклеиновых кислот гастровирусов. Практикум по молекулярной вирусологии: Методическое пособие/ Тикунова Н.В., Хлусевич Я.А. Вихрова М.А., Нетесов С.В.; Новосиб. гос. ун-т. Новосибирск, 2011. 74 с.
2. Wang Y, Qian PY (2009) Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. PLoS 4(10):e7401. doi: 10.1371/journal.pone.0007401.

**Список ознакомления**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| № | ФИО | Должность | Дата | Подпись исполнителя | Подпись руководителя |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |

**СОП № ЛММБ 2-5-2017-09**

**Характеризация антибиотикоустойчивости бактериального изолята методом диско-диффузионного анализа**

**Составили:** к.б.н., с.н.с. В.В. Морозова, вед. инженер А.В.Бардашева

**Местонахождение:** ИХБФМ СО РАН

Пересмотр через 1 год.

1. **Введение, цель**

Настоящая методика устанавливает порядок оценки чувствительности микроорганизма к антибактериальным препаратам (далее по тексту – АБП) диско-диффузионным методом. Данный метод основан на диффузии антибактериального препарата из носителя в плотную питательную среду и подавлении роста исследуемой культуры.

1. **Назначение**

Данная методика позволяет охарактеризовать микроорганизм по степени чувствительности к тому или иному АБП, как резистентный, промежуточный или чувствительный. Исследованию по оценке антибиотикоустойчивости подлежат чистые суточные культуры микроорганизмов.

1. **Термины и определения**

**СОП –** стандартная операционная процедура;

**Асептика** – комплекс мер направленных на предупреждение попадания в рабочую зону сторонних микроорганизмов;

**АБП** – антибактериальный препарат;

**МХА -** агар Мюллера-Хинтон;

**ДДМ** – диско-диффузионный метод;

**Инокулюм** – посевной материал микроорганизма;

1. **Пересмотр:** Данная СОП вводится впервые.
2. **Материалы и оборудование**
   1. ***Материалы и реактивы***

| **Наименование основных реактивов и материалов** | **НТД, производитель, страна** |
| --- | --- |
| Набор дисков с антибактериальными препаратами | НИЦФ, Россия |
| Агар Мюллера – Хинтон | Oxoid, Великобритания |
| Пробирки типа Eppendorf, 1.5 мл | «Eppendorf», США |
| Наконечники универсальные для лабораторных дозаторов до 200 мкл и до 1000 мкл | «Eppendorf», США |
| Спирт этиловый | ЛРС 000279/10 |
| Перекись водорода, медицинская | ГОСТ 177-88 |
| Дистиллированная вода | ГОСТ 6709-72 |
| Натрий хлористый, хч | ГОСТ 4233-77 |
| Тампон-зонд, вискоза, 15 см | Ningbo Greetmed Medical Insruments, Китай |
| Чашки Петри пластиковые, диаметр 90 мм | Greiner Bio-One, Австрия |
| Бактериологическая петля пластиковая одноразовая | Citotest, Китай |
| Флаконы стеклянные градуированные, 500 мл | Isolab, Германия |
| Мерный цилиндр, вместимость 1 л | ГОСТ 1770-74 |
| Колбы мерные вместимостью 100 мл | ГОСТ 1770-74, Россия |
| Штатив для микропробирок типа Eppendorf, объемом 1.5 мл | SSI, США |
| Пинцет хирургический | ГОСТ 21241-89 |
| Стандарты мутности по МакФарланду | Himedia, Индия |
| Пипетки вместимостью 100÷1000 мкл  вместимостью 20÷200 мкл | «Ленпипет», Россия  «Ленпипет», Россия |
| Спиртовка лабораторная | ГОСТ 23932-90Е |

* 1. ***Оборудование***

|  |  |
| --- | --- |
| **Наименование оборудования** | **НТД, производитель, страна** |
| Баня водяная лабораторная | BioSan, Латвия |
| Бокс биологической (микробиологической) безопасности II класс | Lamsystems, Россия |
| Холодильник | Indesit, Италия |
| Вортекс | BioSan, Латвия |
| Весы электронные аналитические диапазон от 0,01 г до 200 г, погрешность ± 0,01 мг | Ohaus, Швейцария |
| Термостат суховоздушный лабораторный ТСвЛ-80 | ТУ-9452-006-07505566-2006 |
| Автоклав ВК-75 | ТЗМОИ, Россия |

* 1. ***Комплект спецодежды***

|  |  |
| --- | --- |
| **Одежда** | **НТД, производитель, страна** |
| Колпак медицинский | ГОСТ 2313478 |
| Перчатки хирургические резиновые | ГОСТ 3-88 |
| Маска медицинская | ГОСТ EN 13795-1-2011 |
| Халат медицинский | ГОСТ 24760-81 |

1. **Помещения**

Проведение работ осуществляется в боксовых помещениях, в которых находятся боксы биологической (микробиологической) безопасности II класса.

1. **Процедура**
   1. ***Подготовительный этап***

***7.1.1. Приготовление дезинфицирующего раствора***

– приготовить 3% раствор перекиси водорода, в стеклянный цилиндр налить (100±1) мл 30% перекиси водорода и довести объем до 1000 мл водопроводной водой, данный раствор может быть использован в течение 48 ч;

– приготовить 6% раствор перекиси водорода, в стеклянный цилиндр налить (200±1) мл 30% перекиси водорода и довести объем до 1000 мл водопроводной водой, данный раствор может быть использован в течение 48 ч;

***7.1.2. Приготовление 70% раствора этилового спирта***

– налить в стеклянный цилиндр (70±1) мл 96% этилового спирта и довести объем до 100 мл дистиллированной водой;

***7.1.3. Подготовка боксового помещения к работе***

– обработать 3% раствором перекиси водорода поверхности помещения и оборудования до начала работ;

– обработать ламинарный бокс и помещение ультрафиолетовыми лучами до начала работ в течение 15 мин.

***7.1.4. Приготовление физиологического раствора***

– взвесить (0,9±0,1) г хлорида натрия, внести в мерную колбу вместимостью 100 мл и добавить дистиллированной воды до метки;

– перемешать до полного растворения соли;

–автоклавировать при 121°С в течение 15 мин.

***7.1.5. Подготовка чашек Петри с питательной средой***

– приготовить питательную среду МХА согласно инструкции производителя. При определении антибиотикочувствительности для *Streptococcus* spp. в охлажденную до 48 – 50°С после автоклавирования МХА асептически добавляют 5% дефибринированной кроличьей крови;

– разлить питательную среду после автоклавирования в стерильные чашки Петри толщиной (4,0±0,5) мм и оставить для застывания при комнатной температуре.

***7.1.6. Подготовка персонала к проведению основных работ***

– надеть боксовый халат, шапочку, перчатки, маску перед входом в боксовое помещение

***7.2. Основной этап***

***7.2.1. Приготовление суспензии исследуемого организма и инокуляция***

– обработать рабочую поверхность ламинарного бокса и руки 70% раствором спирта;

– разлить по 1 мл стерильного физиологического раствора в пробирки типа Eppendorf;

– отобрать несколько однотипных, четко изолированных колоний суточной культуры, выросшей на неселективных плотных питательных средах;

– перенести бактериологической петлей незначительное количество материала с верхушек колоний в пробирку с физиологическим раствором, перемешать на вортексе;

– довести оптическую плотность инокулюма до 0,5 по стандарту МакФарленда, что соответствует концентрации клеток 1,5×108 КОЕ/мл. Инокулюм следует использовать в течение 15 мин;

– погрузить стерильный ватный тампон в пробирку с суспензией, удалить избыток инокулюма, отжав тампон о стенки пробирки;

– провести инокуляцию штриховыми движениями в трех направлениях, поворачивая чашку Петри на 60°;

– погрузить ватный тампон и пробирку с суспензией в 3% раствор перекиси водорода, избегая образования воздушных пробок. Экспозиция не менее 6 ч.

***7.2.2. Аппликация дисков и инкубация***

– выбрать перечень АБП, исходя из систематической принадлежности микроорганизма и в соответствии с приложениями 1 - 6;

– нанести диски с АБП на поверхность агара не позднее чем через 15 мин после инокуляции, прижать аккуратно пинцетом для равномерного контакта диска с поверхностью питательной среды. На одну чашку Петри следует помещать не более 6 дисков;

– поместить чашки Петри в термостат кверху дном непосредственно после аппликации дисков и инкубировать при (36±1)°С в течение 18 – 24 ч.

***7.2.3. Контроль чистоты роста культуры***

– засеять образец инокулюма на чашку с неселективной питательной средой и инкубировать в течение ночи. При выявлении смешанной культуры данные антибиотикочувствительности не учитывают, исследование повторяют.

***7.2.4. Учет и интерпретация результатов***

– поместить чашки после инкубации на темную матовую поверхность кверху дном и измерить диаметр зоны задержки роста с точностью до 1 мм. Выявление крупных колоний внутри зоны лизиса свидетельствует о гетерорезистентности культуры или о наличии контаминации. В данном случае исследование необходимо повторить;

– отнести микроорганизм к одной из трех категорий (резистентный, промежуточный, чувствительный) согласно приложениям 1 - 6;

– зафиксировать результаты в рабочем журнале;

***7.3. Завершающий этап***

– замочить учтенные чашки Петри в 6% растворе перекиси водорода, избегая образования воздушных пробок. Экспозиция не менее 6 ч.

– обработать 3% раствором перекиси водорода поверхности помещения и оборудования после окончания работ;

– обработать ламинарный бокс и помещение ультрафиолетовыми лучами после окончания работ в течение 15 мин.

1. **Охрана труда и техника безопасности**

При проведении процедуры необходимо соблюдать следующие инструкции по технике безопасности и инструкции по биобезопасности:

1. ИОТ – 02 Инструкция по ОТ для неэлектротехнического персонала по электробезопасности на I квалификационную группу;
2. ИОТ – 10 Инструкция по ОТ при работе с облучателем бактерицидным ОБНП 2(2х15-01) «Генерис»;
3. ИОТ – 34 Инструкция по ОТ при работе с ЛВЖ в лабораториях института;
4. ИОТ – 72 Инструкция по ОТ при работе с перекисью водорода и органическими перекисными соединениями;
5. ИОТ – 86 Инструкция о мерах ПБ в лабораториях;
6. ИОТ – 99 Правила работы с микроорганизмами III-IV группы патогенности и возбудителями паразитарных болезней.

**9. Критерии интерпретации результатов определения чувствительности микроорганизмов**

***Таблица 1.* Критерии интерпретации результатов определения чувствительности *Enterobacteriaceae***

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Антибактериальные препараты | Содержание в диске (мкг) | Диаметр зон подавления (мм) | | |
| Резистентный | Промежуточный | Устойчивый |
| Бета-лактамы | | | |
| Ампициллин | 10 | ≤ 13 | 14—16 | ≥ 17 |
| Ампициллин/сульбактам | 10/10 | ≤ 11 | 12—14 | ≥ 15 |
| Амоксициллин/клавуланат | 20/10 | ≤ 13 | 14—17 | ≥ 18 |
| Тикарциллин/клавуланат | 75/10 | ≤ 14 | 15—19 | ≥ 20 |
| Цефалотин | 30 | ≤ 14 | 15—17 | ≥ 18 |
| Цефазолин | 30 | ≤ 14 | 15—17 | ≥ 18 |
| Цефаклор | 30 | ≤ 14 | 15—17 | ≥ 18 |
| Цефамандол | 30 | ≤ 14 | 15—17 | ≥ 18 |
| Цефуроксим Na | 30 | ≤ 14 | 15—17 | ≥ 18 |
| Цефуроксим аксетил | 30 | ≤ 14 | 15—22 | ≥ 23 |
| Цефокситин | 30 | ≤ 14 | 15—17 | ≥ 18 |
| Цефотетан | 30 | ≤ 12 | 13—15 | ≥ 16 |
| Цефметазол | 30 | ≤ 12 | 13—15 | ≥ 16 |
| Цефоперазон | 75 | ≤ 15 | 16—20 | ≥ 21 |
| Цефотаксим | 30 | ≤ 14 | 15—22 | ≥ 23 |
| Цефтриаксон | 30 | ≤ 13 | 14—20 | ≥ 21 |
| Цефтазидим | 30 | ≤ 14 | 15—17 | ≥ 18 |
| Цефиксим | 5 | ≤ 15 | 16—18 | ≥ 19 |
| Цефподоксим | 10 | ≤ 17 | 18—20 | ≥ 21 |
| Цефтибутен | 30 | ≤ 17 | 18—20 | ≥ 21 |
| Цефепим | 30 | ≤ 14 | 15—17 | ≥ 18 |
| Азтреонам | 30 | ≤ 15 | 16—21 | ≥ 22 |
| Имипенем | 10 | ≤ 13 | 14—15 | ≥ 16 |
| Меропенем | 10 | ≤ 13 | 14—15 | ≥ 16 |
| Эртапенем | 10 | ≤ 15 | 16—18 | ≥ 19 |
|  | Аминогликозиды | | | |
| Ампициллин | 10 | ≤ 13 | 14—16 | ≥ 17 |
| Ампициллин/сульбактам | 10/10 | ≤ 11 | 12—14 | ≥ 15 |
| Амоксициллин/клавуланат | 20/10 | ≤ 13 | 14—17 | ≥ 18 |
| Тикарциллин/клавуланат | 75/10 | ≤ 14 | 15—19 | ≥ 20 |
| Цефалотин | 30 | ≤ 14 | 15—17 | ≥ 18 |
|  | Хинолоны | | | |
| Налидиксовая кислота | 30 | ≤ 13 | 14—18 | ≥ 19 |
| Норфлоксацин | 10 | ≤ 12 | 13—16 | ≥ 17 |
| Пефлоксацин | 5 | ≤ 15 | 16—21 | ≥ 22 |
| Офлоксацин | 5 | ≤ 12 | 13—15 | ≥ 16 |
| Ципрофлоксацин | 5 | ≤ 15 | 16—20 | ≥ 21 |
| Ломефлоксацин | 10 | ≤ 18 | 19—21 | ≥ 22 |
| Левофлоксацин | 5 | ≤ 13 | 14—16 | ≥ 17 |
| Гатифлоксацин | 5 | ≤ 14 | 15—17 | ≥ 18 |
|  | Тетрациклины | | | |
| Тетрациклин | 30 | ≤ 14 | 15—18 | ≥ 19 |
| Доксициклин | 30 | ≤ 12 | 13—15 | ≥ 16 |
|  | Другие препараты | | | |
| Хлорамфеникол | 30 | ≤ 12 | 13—17 | ≥ 18 |
| Ко-тримоксазол | 1,25/23,75 | ≤ 10 | 11—15 | ≥ 16 |
| Нитрофурантоин | 300 | ≤ 14 | 15—16 | ≥ 17 |
| Фосфомицин\* | 200 | ≤ 12 | 13—15 | ≥ 16 |

**\***При определении чувствительности к фосфомицину в питательную среду необходимо вносить 25 мг/л глюкозо-6-фосфата.

***Таблица 2.* Критерии интерпретации результатов определения чувствительности *P. aeruginosa*, *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. и других НФБ1**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Антибактериальные препараты | Содержание в диске (мкг) | Диаметр зон подавления (мм) | | |
| Резистентный | Промежуточный | Чувствительный |
| Бета-лактамы | | | |
| Ампициллин/сульбактам | 10/10 | ≤ 11 | 12—14 | ≥ 15 |
| Тикарциллин/кла­вуланат2) *P.aeruginosa Acinetobacter* spp. | 75/10 75/10 | ≤ 14 ≤ 14 | – 15—19 | ≥ 15 ≥ 20 |
| Цефоперазон | 75 | ≤ 15 | 16—20 | ≥ 21 |
| Цефотаксим | 30 | ≤ 14 | 15—22 | ≥ 23 |
| Цефтриаксон | 30 | ≤ 13 | 14—20 | ≥ 21 |
| Цефтазидим | 30 | ≤ 14 | 15—17 | ≥ 18 |
| Цефепим | 30 | ≤ 14 | 15—17 | ≥ 18 |
| Азтреонам | 30 | ≤ 15 | 16—21 | ≥ 22 |
| Имипенем | 10 | ≤ 13 | 14—15 | ≥ 16 |
| Меропенем | 10 | ≤ 13 | 14—15 | ≥ 16 |
|  | Аминогликозиды | | | |
| Гентамицин | 10 | ≤ 12 | 13—14 | ≥ 15 |
| Тобрамицин | 10 | ≤ 12 | 13—14 | ≥ 15 |
| Нетилмицин | 30 | ≤ 12 | 13—14 | ≥ 15 |
| Амикацин | 30 | ≤ 14 | 15—16 | ≥ 17 |
|  | Хинолоны | | | |
| Норфлоксацин | 10 | ≤ 12 | 13—16 | ≥ 17 |
| Пефлоксацин | 5 | ≤ 12 | 13—16 | ≥ 17 |
| Офлоксацин | 5 | ≤ 12 | 13—15 | ≥ 16 |
| Ципрофлоксацин | 5 | ≤ 15 | 16—20 | ≥ 21 |
| Левофлоксацин | 5 | ≤ 13 | 14—16 | ≥ 17 |
| Ломефлоксацин | 10 | ≤ 18 | 19—21 | ≥ 22 |
|  | Другие препараты | | | |
| Хлорамфеникол | 30 | ≤ 12 | 13—17 | ≥ 18 |
| Ко-тримоксазол | 1,25/ 23,75 | ≤ 10 | 11—15 | ≥ 16 |
| Тетрациклин | 30 | ≤ 14 | 15—18 | ≥ 19 |
| Доксициклин | 30 | ≤ 12 | 13−15 | ≥ 16 |

1 ДДМ стандартизирован только для *P.aeruginosa* и *Acinetobacter* spp. При определении чувствительности других НФБ необходимо использовать методы серийных разведений.

2 Метод серийных разведений не стандартизован для определения чувствительности *Acinetobacter* spp. к тикарциллину/клавуланату.

***Таблица 3.* Критерии интерпритации результатов определения чувствительности *Staphylococcus* spp.**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Антибактериальные препараты | Содержание в диске (мкг) | Диаметр зон подавления (мм) | | |
| Резистентный | Промежуточный | Чувствительный |
| Бета-лактамы | | | |
| Бензилпенициллин | 10 ЕД | ≤ 28 | – | ≥ 9 |
| Оксациллин 2  *S. aureus*  Коагулазонегативные стафилококки | 1 1 | ≤ 10 ≤ 17 | 11—12 – | ≥ 13 ≥ 18 |
|  | Аминогликозиды | | | |
| Канамицин | 30 | ≤ 13 | 14—17 | ≥ 18 |
| Гентамицин | 10 | ≤ 12 | 13—14 | ≥ 15 |
| Тобрамицин | 10 | ≤ 12 | 13—14 | ≥ 15 |
| Нетилмицин | 30 | ≤ 12 | 13—14 | ≥ 15 |
| Амикацин | 30 | ≤ 14 | 15—16 | ≥ 17 |
|  | Хинолоны | | | |
| Норфлоксацин | 10 | ≤ 12 | 13—16 | ≥ 17 |
| Эноксацин | 10 | ≤ 14 | 15—17 | ≥ 18 |
| Пефлоксацин | 5 | ≤ 15 | 16—21 | ≥ 22 |
| Офлоксацин | 5 | ≤ 12 | 13—15 | ≥ 16 |
| Ципрофлоксацин | 5 | ≤ 15 | 16—20 | ≥ 21 |
| Ломефлоксацин | 10 | ≤ 18 | 19—21 | ≥ 22 |
| Левофлоксацин | 5 | ≤ 13 | 14—16 | ≥ 17 |
| Спарфлоксацин | 5 | ≤ 15 | 16—18 | ≥ 19 |
| Гатифлоксацин | 5 | ≤ 14 | 15—17 | ≥ 18 |
|  | Тетрациклины | | | |
| Тетрациклин | 30 | ≤ 14 | 15—18 | ≥ 19 |
| Доксициклин | 30 | ≤ 12 | 13—15 | ≥ 16 |
| Миноциклин | 30 | ≤ 14 | 15—18 | ≥ 19 |
|  | Макролиды | | | |
| Эритромицин | 15 | ≤ 13 | 14—22 | ≥ 23 |
| Кларитромицин | 15 | ≤ 13 | 14—17 | ≥ 18 |
| Азитромицин | 15 | ≤ 13 | 14—17 | ≥ 18 |
|  | Линкозамиды | | | |
| Линкомицин | 15 | < 17 | 17—20 | ≥ 21 |
| Клиндамицин | 2 | ≤ 14 | 15—20 | ≥ 21 |
|  | Гликопептиды | | | |
| Ванкомицин | 30 | – | – | ≥ 15 |
|  | Другие препараты | | | |
| Хлорамфеникол | 30 | ≤ 12 | 13—17 | ≥ 18 |
| Ко-тримоксазол | 1,25/ 23,75 | ≤ 10 | 11—15 | ≥ 16 |
| Нитрофурантоин | 300 | ≤ 14 | 15—16 | ≥ 17 |
| Рифампицин | 5 | ≤ 16 | 17—19 | ≥ 20 |
| Фузидин | 10 | < 15 | 15—21 | ≥ 22 |
| Линезолид | 30 | – | – | ≥ 21 |

1 В практических лабораториях оценивать чувствительность *Staphylococcus* spp. к бета-лактамам кроме бензилпенициллина и оксациллина нецелесообразно.

2 Штаммы, устойчивые к оксациллину должны однозначно рассматриваться как устойчивые ко всем доступным бета-лактамам.

***Таблица 4.* Критерии интерпретации результатов определения чувствительности *Enterococcus* spp.**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Антибактериальные препараты | Содержание в диске (мкг) | Диаметр зон подавления роста (мм) | | |
| Резистентный | Промежуточный | Чувствительный |
| Бета-лактамы | | | |
| Бензилпенициллин | 10 ЕД | ≤ 14 | – | ≥ 15 |
| Ампициллин | 10 | ≤ 16 | – | ≥ 17 |
|  | Другие препараты | | | |
| Хлорамфеникол | 30 | ≤ 12 | 13—17 | ≥ 18 |
| Эритромицин | 15 мг | ≤ 13 | 14—22 | ≥ 23 |
| Тетрациклин | 30 | ≤ 14 | 15—18 | ≥ 19 |
| Доксициклин | 30 | ≤ 12 | 13—15 | ≥ 16 |
| Ципрофлоксацин | 5 | ≤ 15 | 16—20 | ≥ 21 |
| Норфлоксацин | 10 | ≤ 12 | 13—16 | ≥ 17 |
| Левофлоксацин | 5 | ≤ 13 | 14—16 | ≥ 17 |
| Гатифлоксацин | 5 | ≤ 14 | 15—17 | ≥ 18 |
| Нитрофурантоин | 300 | ≤ 14 | 15—16 | ≥ 17 |
| Ванкомицин | 30 | ≤ 14 | 15—16 | ≥ 17 |
| Линезолид | 30 | ≤ 20 | 21—22 | 23 |
| Фосфомицин | 200 | ≤ 12 | 13—15 | 16 |
| Стрептомицин (высокий уровень) | 300 | 6 | 7—9 | ≥ 10 |
| Гентамицин  (высокий уровень) | 120 | 6 | 7—9 | ≥ 10 |

***Таблица 5.* Критерии интерпретации результатов определения чувствительности *S. pneumoniae***

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Антибактериальные препараты | Содержание в диске (мкг) | Диаметр зон подавления роста (мм) | | |
| Резистентный | Промежуточный | Чувствительный |
| Бета-лактамы | | | |
| Бензилпенициллин | 1 мкг окса­циллина | – | – | ≥ 20 |
|  | Макролиды и линкозамиды | | | |
| Эритромицин | 15 | ≤ 15 | 16—20 | ≥ 21 |
| Кларитромицин | 15 | ≤ 16 | 17—20 | ≥ 21 |
| Азитромицин | 15 | ≤ 13 | 14—17 | ≥ 18 |
| Линкомицин | 15 | < 17 | 17—20 | ≥ 21 |
| Клиндамицин | 2 | ≤ 15 | 16—18 | ≥ 19 |
|  | Другие препараты | | | |
| Тетрациклин | 30 | ≤ 18 | 19—22 | ≥ 23 |
| Офлоксацин | 5 | ≤ 12 | 13—15 | ≥ 16 |
| Левофлоксацин | 5 | ≤ 13 | 14—16 | ≥ 17 |
| Спарфлоксацин | 5 | ≤ 15 | 16—18 | ≥ 19 |
| Моксифлоксацин | 5 | ≤ 14 | 15—17 | ≥ 18 |
| Гатифлоксацин | 5 | ≤ 17 | 18—20 | ≥ 21 |
| Хлорамфеникол | 30 | ≤ 20 | – | ≥ 21 |
| Ко-тримоксазол | 1,25/23,75 | ≤ 15 | 16—18 | ≥ 19 |
| Рифампицин | 5 | ≤ 16 | 17—18 | ≥ 19 |
| Ванкомицин | 30 | – | – | ≥ 17 |
| Линезолид | 30 | – | – | ≥ 21 |

***Таблица 6.* Критерии интерпретации результатов определения чувствительности *Streptococcus* spp. (кроме *S. pneumoniae*)**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Антибактериальные препараты | Содержание в диске | Диаметр зон подавления роста (мм) | | |
| Резистентный | Промежуточный | Чувствительный |
|  |  |  |  |
| Бензилпенициллин2 | 10 ЕД | ≤ 19 | 20—27 | ≥ 28 |
| Ампициллин 2 | 10 | ≤ 18 | 19—25 | ≥ 26 |
| Цефотаксим | 30 | ≤ 25 | 26—27 | ≥ 28 |
| Цефтриаксон | 30 | ≤ 24 | 25—26 | ≥ 27 |
|  | Макролиды и линкозамиды | | | |
| Эритромицин | 15 | ≤ 15 | 16—20 | ≥ 21 |
| Кларитромицин | 15 | ≤ 16 | 17—20 | ≥ 21 |
| Азитромицин | 15 | ≤ 13 | 14—17 | ≥ 18 |
| Клиндамицин | 2 | ≤ 15 | 16—18 | ≥ 19 |
|  | Другие препараты | | | |
| Тетрациклин | 30 | ≤ 18 | 19—22 | ≥ 23 |
| Офлоксацин 3 | 5 | ≤ 12 | 13—15 | ≥ 16 |
| Левофлоксацин | 5 | ≤ 13 | 14—16 | ≥ 17 |
| Гатифлоксацин | 5 | ≤ 17 | 18—20 | ≥ 21 |
| Хлорамфеникол | 30 | ≤ 17 | 18—20 | ≥ 21 |
| Ванкомицин | 30 | – | – | ≥ 17 |
| Линезолид | 30 | – | – | ≥ 21 |

1 – штаммов *S. pyogenes, S. agalactiae*, устойчивых к пенициллину не описано.

2 – критерии диско-диффузионного метода применимы только для β-гемолитических стрептококков.

3 – критерии диско-диффузионного метода и метода серийных разведений применимы только для β-гемолитических стрептококков.

1. **Ссылки**
2. Методические указания МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам»
3. Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности и гельминтами. Санитарные правила. СП 1.2.731-99. – М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 1999.- 107с.
4. .Инструкция по использованию перекиси водорода с моющими средствами для целей дезинфекции (Утв. Минзравом СССР от 29.08.70 № 858 – 70).
5. Инструкция № 01/Б-13 по применению дезинфицирующего средства «Перекись водорода 6 %» (ООО «РосбиоАгроФарм», Россия).
6. Методические указания МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

**Список ознакомления**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| № | ФИО | Должность | Дата | Подпись исполнителя | Подпись руководителя |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |

**СОП № ЛММБ 2-6-2017-09**

**Идентификация таксономической принадлежности изолята грибов по нуклеотидным последовательностям межгенных спейсеров ITS и NS**

**Составили:** к.б.н., с.н.с. В.В. Морозова, вед. инженер А.В.Бардашева

**Местонахождение:** ИХБФМ СО РАН

Пересмотр через 1 год.

1. **Введение, цель**

Настоящая методика устанавливает порядок идентификации изолята гриба по нуклеотидным последовательностям межгенных спейсеров ITS и NS.

1. **Назначение**

Данная методика позволяет идентифицировать микроорганизм до вида/рода по нуклеотидным последовательностям межгенных спейсеров ITS и NS. Исследованию подлежат чистые культуры грибов перед депонированием в коллекцию ЭМТК и штаммы, депонированные в КЭМТК при необходимости в повторной ре-идентификации.

1. **Термины и определения**

**СОП –** стандартная операционная процедура;

**ПЦР –** полимеразная цепная реакция;

**Секвенирование** – определение последовательности ДНК;

ТАЕ – трис-ацетатный буфер

1. **Материалы и оборудование**
   1. ***Материалы и реактивы***

| **Наименование основных реактивов и материалов** | **ГОСТ, ОСТ, страна** |
| --- | --- |
|  |  |
| Пробирки типа Eppendorf, 1,5 мл, DNase-free, RNase-free | Axigen, США |
| Пробирки типа Eppendorf, 0,2 мл DNase-free, RNase-free | Axigen, США |
| Наконечники для автоматических дозаторов до 200 мкл и до 1000 мкл с фильтром, DNase-free, RNase-free | «Eppendorf», США |
| Смесь дезоксирибонуклеозидтрифосфатов для ПЦР (25 мМ) | БиоСан, Новосибирск |
| Taq ДНК-полимераза | Thermo Fisher Scientific, CША |
| ДНК-буфер | Thermo Fisher Scientific, CША |
| Праймер NS1,  5`-GTAGTCATATGCTTGTCTC -3` | БиоСан, Новосибирск |
| Праймер NS2,  5`-GGCTGCTGGCACCAGACTTGC -3` | БиоСан, Новосибирск |
| Праймер NS8,  5`-TCCGCAGGTTCACCTACGGA -3` | БиоСан, Новосибирск |
| Праймер ITS 1F,  5`-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA -3` | БиоСан, Новосибирск |
| Праймер ITS 4  5`-TCCTCCGCTTATTGATATGC -3` | БиоСан, Новосибирск |
| Праймер ITS 3  5`-GCATCGATGAAGAACGCAGC -3` | БиоСан, Новосибирск |
| Вода для инъекций | ЛП-002529 |
| Реагент-растворитель Hi-Di Formamide | Appied Biosystems, CША |
| Планшет для нанесения продуктов реакции Сэнгера | Appied Biosystems, CША |
| Септа для планшетов | Appied Biosystems, CША |
| Септа для анодного буфера | Appied Biosystems, CША |
| Полимер POP-7 | Appied Biosystems, CША |
| Катодный буфер | Appied Biosystems, CША |
| Анодный буфер | Appied Biosystems, CША |
| Реактив для очистки помпы автоматического секвенатора | Appied Biosystems, CША |
| Капиллярный блок для автоматического секвенатора 3500 Genetic Analyzer | Appied Biosystems, CША |
| Пленка Parafilm | Pechiney Plastic Packaging Company, США |
| Спирт этиловый | ЛРС 000279/10 |
| Агароза для электофореза | Sigma, США |
| Маркер молекулярных масс ДНК 1 kb | СибЭнзим, Россия |
| GTG-агароза | Lonza, Израиль |
| Трисгидроксиметиламинометан (Tris-base) | Sigma, США |
| ЭДТА | Sigma, США |
| Ацетат натрия, осч | Sigma, США |
| Кристаллический фиолетовый | Sigma, США |
| Глицерин | Sigma, США |
| Комплект реагентов для постановки реакции секвенирования BigDye® Terminator v3.1 Sequencing Kit | Applied Biosystems, США |
| Полипропиленовые пробирки, 50 мл | Falcon, США |
| Колонки Centrisep Spin Columns | Princeton Separations Inc., США |
| Сорбент Sephadex G-50 Superfine | GE Healthcare, Щвеция |
| Концентрированная (ледяная) уксусная кислота | Реахим, Россия |
| Перекись водорода, медицинская | ГОСТ 177-88 |
| Дистиллированная вода | ГОСТ 6709-72 |
| Центрифужные фильтры Амикон Ультра-4. 100 кДа | Millipore, Ирландия |
| Тампон-зонды, целлюлоза, 15 см | Ningbo Greetmed Medical Insruments, Китай |
| Чашки Петри, пластиковые диаметр 90 мм | Greiner, Австрия |
| Пластиковая стерильная бактериологическая петля | Citotest, Китай |
| Хирургический скальпель | Тумботино, Россия |
| Мерные цилиндры вместимость 50 мл, 500 мл, 1000 мл | ГОСТ 1770-74 |
| Колба 250 мл из термостойкого стекла | ГОСТ 1770-74, Россия |
| Спиртовка лабораторная | ГОСТ 23932-90Е |
| Пипетки вместимостью 100÷1000 мкл  вместимостью 100÷1000 мкл  вместимостью 20÷200 мкл  вместимостью 200 мкл  вместимостью 20 мкл | «Ленпипет», Россия  «Ленпипет», Россия  «Ленпипет», Россия  «Ленпипет», Россия  «Ленпипет», Россия |

* 1. ***Оборудование***

|  |  |
| --- | --- |
| **Оборудование** | **ГОСТ, ОСТ, страна** |
| Бокс абактериальной воздушной среды (класс биологической безопасности II тип А или В) | LabSystems, Россия |
| Твердотельный термостат для пробирок типа Eppendorf | BioSan, Латвия |
| Aвтоматический секвенатор 3500 Genetic Analyzer | Appied Biosystems, CША |
| Микроцентрифуга «Minispin» | Eppendorf, Германия |
| Центрифуга Eppendorf | Eppendorf, Германия |
| Вортекс | BioSan, Латвия |
| Холодильник | Indesit, Италия |
| Программируемый амплификатор PCR System 9700 | Appied Biosystems, CША |
| Камера для горизонтального электрофореза SE-2 | Хеликон, Россия |
| Источник питания «Эльф» | ДНК-технология, Россия |
| Ультрафиолетовый трансиллюминатор Molecular Imager GelDocTM XR System | BioRad, США |
| Вакуумный концентратор Concentrator plus | Eppendorf, Германия |
| Трансиллюминатор TFP-M/WL | Vilber Lourmat, Франция |
| Весы электронные | Ohaus, Швейцария |
| Термостат суховоздушный | ТУ-9452-006-07505566-2006 |

* 1. ***Комплект спецодежды***

|  |  |
| --- | --- |
| **Одежда** | **ГОСТ, ТУ, НТД** |
| Колпак медицинский | ГОСТ 2313478 |
| Перчатки резиновые | ГОСТ 3-88 |
| Маска медицинская | ГОСТ EN 13795-1-2011 |
| Халат медицинский | ГОСТ 24760-81 |

1. **Помещения**

Проведение работ осуществляется в боксовых помещениях, в которых находятся боксы биологической (микробиологической) безопасности II класса, а также в помещениях, предназначенных для общих молекулярно-биологических работ.

**Процедура**

* 1. ***Подготовительный этап***

***6.1.2. Подготовка персонала к проведению основных работ***

– надеть хирургический халат, перчатки перед началом работ.

***6.1.2. Приготовление 70% раствора этилового спирта***

– налить в стеклянный цилиндр (70±1) мл 96% этилового спирта и довести объем до 100 мл дистиллированной водой;

***6.1.3. Приготовление 1%-ного агарозного геля***

– взвесить (1,5±0,1) г агарозы и пересыпать в стеклянную колбу из термостойкого стекла;

– добавить 100 мл рабочего электрофорезного буфера, перемешать и расплавить в СВЧ-печи до полного растворения агарозы;

– остудить до температуры 65 – 70 °С.

– поместить плашку для заливки геля на заливочный столик, установленный горизонтально, и переместить стенку столика вплотную до плашки для заливки геля. Зафиксировать стенку поворотом винта. Выровнять столик для заливки геля. Вставить гребенку в плашку и залить расплавленный охлажденный до температуры 65 – 70 ºС гель в плашку толщиной 0,6 см. Если образовались пузыри, их необходимо удалить;

– вынуть гребенку из геля после полного застывания, не повредив карманы, отвернуть винт и отодвинуть стенку столика;

– поместить плашку с готовым гелем в камеру для горизонтального электрофореза;

– залить в камеру рабочий раствор буфера в таком количестве, чтобы он покрывал гель на 5 мм сверху;

– промыть карманы пипетированием, не касаясь дна, аккуратно. Убедиться в отсутствии пузырьков воздуха в них.

***6.1.4. Приготовление концентрированного буфера ТАЕ (20×)***

– взвесить 108,8 г ацетата натрия трехводного, 193,6 г Tris-base, 14,88 г ЭДТА;

- растворить в 1,5 л дистиллированной воды, довести pH до 8.0 ледяной уксусной кислотой и довести объем раствора в мерном цилинде до 2 л.

***6.1.5. Приготовление концентрированного буфера TAE-GTG (20×) для очистки фрагментов ДНК через GTG-агарозу***

– взвесить 48,4 г Tris-base, 0,37 г ЭДТА;

- растворить в 100мл дистиллированной воды, добавить 14,4 мл ледяной уксусной кислоты и довести объем раствора в мерном цилиндре до 200 мл.

***6.1.6. Приготовление рабочего буфера ТАЕ***

– влить в мерный цилиндр 50 мл концентрированного ТАЕ и довести дистиллированной водой до 1000 мл, закрыть пленкой Parafilm и перемешать.

***6.1.7. Приготовление рабочего буфера ТАЕ-GTG***

– влить в мерный цилиндр 20 мл концентрированного ТАЕ-GTG и довести дистиллированной водой до 1000 мл, закрыть пленкой Parafilm и перемешать.

***6.1.8. Приготовление раствора кристаллического фиолетового***

– взвесить (2,0±0,1) мг красителя и растворить в бидистиллированной воде.

***6.1.9. Приготовление буфера для нанесения проб на гель***

– взвесить (1,0±0,1) мг кристаллического фиолетового, добавить 3 мл стерильного глицерина и довести объем рабочим ТАЕ буфером до 10 мл.

***6.1.10. Приготовление 0,6% геля GTG-агарозы***

– взвесить (0,3±0,1) г GTG-агарозы и пересыпать в стеклянную колбу из термостойкого стекла на 250 мл;

– добавить 50 мл рабочего буфера ТАЕ-GTG, перемешать и расплавить в СВЧ-печи до полного растворения агарозы;

– остудить до температуры 65 – 70 °С, добавить 20мкл красителя кристаллического фиолетового из стокового раствора с концентрацией 2мг/мл.

– поместить плашку для заливки геля на заливочный столик, установленный горизонтально, и переместить стенку столика вплотную до плашки для заливки геля. Зафиксировать стенку поворотом винта. Выровнять столик для заливки геля. Вставить гребенку в плашку и залить расплавленный охлажденный до температуры 65 – 70 ºС гель в плашку толщиной 0,6 см. Если образовались пузыри, их необходимо удалить;

– вынуть гребенку из геля после полного застывания, не повредив карманы, отвернуть винт и отодвинуть стенку столика;

– поместить плашку с готовым гелем в камеру для горизонтального электрофореза;

– залить в камеру рабочий раствор буфера в таком количестве, чтобы он покрывал гель на 5 мм сверху;

– промыть карманы пипетированием, не касаясь дна, аккуратно. Убедиться в отсутствии пузырьков воздуха в них.

***6.1.11. Подготовка колонок для гель-фильтрации***

– взвесить в полипропиленовой пробирке типа Falcon объемом 50 мл сорбент Sephadex G-50 Superfine из расчета 50 мг сорбента на одну реакцию. Добавить 1 мл бидистиллированной воды. Оставить набухать в воде в течение 30 мин, периодически перемешивая;

– выставить приемники с вложенными в них чистыми колонками Centrisep Spin Colomns в штатив;

– внести в чистый корпус колонки набухший сорбент в количестве 1 мл и центрифугировать в течение 5 мин при угловом ускорении 900g. При этом необходимо строго соблюдать однообразную ориентацию колонок при центрифугировании;

– удалить воду из приемника;

– добавить 200 мкл бидистиллированной воды для промывки сорбента и центрифугировать в течение 5 мин при угловом ускорении 900g;

– удалить воду из приемника. Хранить приготовленные колонки можно не более 1 часа.

***6.2. Основной этап***

***6.2.1. Отбор образцов***

– разлить по 20 мкл стерильной воды для инъекций в пробирки типа Eppendorf объемом 0,2 мл;

– отобрать среди однотипных колоний две, четко изолированные колонии культуры, выросшей на плотной питательной среде Сабуро;

– перенести бактериологической петлей незначительное количество материала с двух выбранных колоний в пробирки с 10 мкл бидистиллированной воды, каждую колонию в отдельную пробирку;

– выделить ДНК из полученных супензий набором НК-технология по инструкции производителя.

***6.2.2. Полимеразная цепная реакция***

– для получения ПЦР-фрагментов ITS и NS провести гнездовой ПЦР, при этом

для 1 раунда амплификации NS-фрагмента использовать праймеры NS1 и NS8, для второго раунда праймеры NS1 и NS2;

для 1 раунда амплификации ITS-фрагмента использовать праймеры ITS1F и ITS4, для второго раунда праймеры ITS4 и ITS3;

–приготовить ПЦР-смесь, исходя из того, что на один образец потребуется 29,0 мкл смеси следующего состава:

ДНК-буфер 3,0 мкл;

смесь четырех дезоксирибонуклеозидтрифосфатов 0,3 мкл;

Taq-полимераза 0,2 мкл в концентрации 5 ед/мкл;

прямой праймер 1,0 мкл в концентрации 10 пмоль;

обратный праймер 1,0 мкл в концентрации 10 пмоль;

добавить воду для инъекций до 30 мкл;

– внести в пробирки по 29,0 мкл ПЦР-смеси и 1,0 мкл ДНК-матрицы из раздела 6.2.1. в случае 1 раунда ПЦР, или 1 мкл амплификата в случае 2 раунда ПЦР;

– внести в отдельную пробирку 29,0 мкл ПЦР-смеси и 1,0 мкл ДНК-буфера (отрицательный контроль);

– осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием на микроцентрифуге (10 – 20 сек);

– поместить пробирки в ячейки амплификатора, после того, как температура в ячейке амплификатора достигнет 95 ºС. Закрыть крышку прибора и запустить программу на амплификаторе (Табл. 1, 2, 3). Пробы после амплификации можно хранить 16 ч при комнатной температуре или в течение недели при температуре 2 – 8 ºС.

**Таблица 1.** Условия 1 раунда амплификации для межгенных спейсеров ITS и NS

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Стадии амплификации | Температура, ºС | Время | Количество циклов |
| 1 | Предварительный прогрев матрицы | 95 ºС | 5 мин | 1 |
| 2 | Денатурация матрицы | 95 | 10 сек | 35 |
| Отжиг праймеров | 50 | 15 сек |
| Элонгация | 72 | 2 мин |
| Финальная элонгация | 72 | 10 мин | 1 |
| 3 | Хранение | 4 | - | - |

**Таблица 2.** Условия 2 раунда амплификации для межгенного спейсера ITS

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Стадии амплификации | Температура, ºС | Время | Количество циклов |
| 1 | Предварительный прогрев матрицы | 95 ºС | 5 мин | 1 |
| 2 | Денатурация матрицы | 95 | 10 сек | 35 |
| Отжиг праймеров | 56 | 15 сек |
| Элонгация | 72 | 30 сек |
| Финальная элонгация | 72 | 10 мин | 1 |
| 3 | Хранение | 4 | - | - |

**Таблица 3.** Условия 2 раунда амплификации для межгенного спейсера NS

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Стадии амплификации | Температура, ºС | Время | Количество циклов |
| 1 | Предварительный прогрев матрицы | 95 ºС | 5 мин | 1 |
| 2 | Денатурация матрицы | 95 | 10 сек | 35 |
| Отжиг праймеров | 54 | 15 сек |
| Элонгация | 72 | 1 мин |
| Финальная элонгация | 72 | 10 мин | 1 |
| 3 | Хранение | 4 | - | - |

***6.2.3. Электрофорез в агарозном геле в буфере ТAЕ***

– залить агарозный гель согласно п. 6.1.3;

– внести в каждую лунку 1%-ного агарозного геля по 5 мкл образца ПЦР-продуктов после 2-го раунда ПЦР, включая отрицательный контроль. В отдельные карманы внести маркер молекулярных масс в каждом ряду дорожек;

– подключить камеру к источнику постоянного электрического тока. Выставить параметры источника: напряжение 250 В, сила тока 100 мА, 10 Вт, время 20 мин. Оптимальная напряженность электрического поля при этом составляет 10 В/см;

– выключить источник тока после завершения электорофореза, отсоединить провода от источника тока, перенести гель на трансиллюминатор;

– задокументировать полученную картину распределения ПЦР-фрагментов в агарозном геле после проведения электрофореза при помощи трансиллюминатора;

– определить образцы с достаточным количеством ПЦР-фрагментов для секвенирования. Образцы можно использовать для дальнейшего секвенирования только в том случае, если в отрицательном контроле отсутствуют ПЦР-фрагменты.

***6.2.4. Очистка продуктов ПЦР с помощью GTG-агарозы***

– залить агарозный гель согласно п. 6.1.10;

– внести в каждую лунку до 15 мкл образца;

– подключить камеру к источнику постоянного электрического тока. Выставить параметры источника: напряжение 250 В, сила тока 100 мА, 10 Вт, время 7 мин. Оптимальная напряженность электрического поля при этом составляет 10 В/см;

– выключить источник тока после завершения электорофореза, отсоединить провода от источника тока, перенести гель на трансиллюминатор с подсветкой белым светом;

– взять хирургический скальпель и предварительно обработать 70% раствором этилового спирта;

– вырезать аккуратно фрагмент агарозного геля, содержащий продукт ПЦР необходимого размера, стараясь захватить как можно меньше самого геля, и поместить его в обрезанный наконечник для автоматических дозаторов объемом 200 мкл с фильтром;

– перенести наконечник с фрагментом геля в пронумерованную пробирку типа Eppendorf объемом 1,5мл. Перед вырезанием каждого следующего фрагмента хирургический скальпель необходимо обрабатывать 70% раствором этилового спирта во избежание контаминации образцов;

– поместить пробирки с фильтрами, содержащими вырезанные фрагменты агарозного геля в центрифугу, и центрифугировать пробирки в течение 5 мин на максимальной скорости;

– вынуть наконечники из пробирок, пробирки закрыть и перенести в холодильник.

***6.2.5. Реакция Сенгера***

– подготовить микропробирки объемом 0,2 мл, закрыть их и подписать в соответствии с номерами образцов и праймеров;

–используя наконечники с фильтрами, приготовить реакционную смесь следующего состава из расчета 30 мкл на образец:

буфер для секвенирования BigDye® Terminator v3.1 Sequencing Buffer (5×) – 6 мкл,

реагент BigDye® Terminator v3. – 1 мкл,

ДНК-матрица состоящая из NS-ПЦР-продукта либо ITS-ПЦР-продукта после 2-го раунда амплификации, очищенная с использованием GTG-агарозы, в количестве около 100 нг и объемом не более 1/3 от объема реакционной смеси,

для секвенирования межгенного спейсера NS добавить 1мкл прямого праймера NS1 в концентрации 3,3 пмоль;

для секвенирования межгенного спейсера ITS добавить 1мкл прямого праймера ITS4 в концентрации 3,3 пмоль;

довести объем реакционной смеси до 30 мкл бидистиллированной водой.

– перемешать смесь на вортексе и осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием на микроцентрифуге (10 – 20 сек);

– поместить пробирки в ячейки амплификатора, закрыть крышку прибора и запустить программу амплификатора (табл. 4)

**Таблица 4.** Условия реакции секвенирования по Сенгеру для ПЦР-фрагментов межгенных спейсеров ITS и NS

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Стадии реакции секвенирования | Температура | Время | Количество циклов |
| 1 | Денатурация матрицы | 98 °С | 10 с | 34 |
| Отжиг праймера | 50 °С | 5 с |
| Элонгация | 60 °С | 4 мин |
| 2 | Дополнительное прогревание | 98 °С | 3 мин | 1 |
| 3 | Хранение | 20 °С | – | – |

***6.2.6. Очистка продуктов реакции Сенгера***

– подготовить пробирки-приемники типа Эппендорф объемом 1,5 мл для очистки продуктов реакции Сенгера. Подписать их в соответствии с номерами анализируемых проб и названиями используемых праймеров. Поместить колонки, содержащие сефадекс G50 (раздел 6.1.11.) в подготовленные пробирки;

– аккуратно, не касаясь столбика сорбента, нанести всю реакционную смесь, содержащую продукты реакции секвенирования в центр столбика сорбента;

– центрифугировать в течение 5 мин при угловом ускорении 900g;

– извлечь колонки, содержащие столбики сорбента из пробирок-приемников. В пробирках приемниках объемом 1,5 мл должно находиться около 30 мкл жидкости, содержащей очищенные продукты реакции Сенгера;

– колонки, содержащие столбики сорбента, очистить от сорбента (для этого достаточно просто вытряхнуть его).

– высушить очищенные продукты реакции в вакуумном концентраторе при 45 °С;

– передать высушенные продукты реакции на автоматический прибор-секвенатор 3500 Genetic Analyzer ABI, CША, для проведения капиллярного гель-электрофореза.

***6.2.7. Капиллярный гель-электрофорез продуктов реакции Сэнгера***

– разморозить реагент-растворитель Hi-Di Formamide из расчета 15 мкл на один образец;

– в пробирку с очищенными и высушенными продуктами реакции Сэнгера автоматическим дозатором добавить формамид в количестве 15 мкл;

– тщательно перемешать содержимое пробирки на вортексе;

– сбросить капли со стенок пробирки кратковременным центрифугированием;

– используя автоматический дозатор перенести весь объем жидкости из пробирки в планшет для загрузки образцов в автоматический секвенатор, запечатать планшет септой для планшетов;

– прогреть планшет в течении 2 минут при 96°С в термостате, затем перенести в емкость с водно-ледяной смесью для быстрого охлаждения;

– поместить планшет в адаптер для автоматического секвенатора и установить его в прибор;

– запустить программу параметров разделения образцов и выгрузки данных на компьютере управления автоматическим секвенатором;

– по окончанию разделения продуктов реакции Сэнгера обсчитать полученные данные с помощью ПО Sequencing Analysis Software 6.0, принимая во внимание наборы реактивов и расходных материалов, которые использовались для синтеза продуктов реакции Сэнгера.

***6.2.8. Анализ данных***

– провести предварительный анализ полученных нуклеотидных последовательностей с использованием программного продукта Sequencher v.4.1.;

– сравнить полученные нуклеотидные последовательности с ранее опубликованными с использованием алгоритма Basic Local Alignment Search Tool (BLASTN) с использованием сервера Национального центра биотехнологической информации (NCBI, США), включающего базы данных GenBank (США), EMBL (Европа), DDBJ (Япония);

– выбрать наиболее близкий по нуклеотидной последовательности штамм грибов из базы данных NCBI GenBank и в соответствии с ним идентифицировать депонированный в КЭМТК коллекционный штамм.

***6.3. Завершающий этап***

– Полученные данные внести в электронную базу данных КЭМТК.

1. **Охрана труда и техника безопасности**

При проведении процедуры необходимо соблюдать следующие инструкции по технике безопасности и инструкции по биобезопасности:

При проведении процедуры необходимо соблюдать следующие инструкции по технике безопасности и инструкции по биобезопасности:

1. ИОТ – 02 Инструкция по ОТ для неэлектротехнического персонала по электробезопасности на I квалификационную группу;
2. ИОТ – 10 Инструкция по ОТ при работе с облучателем бактерицидным ОБНП 2(2х15-01) «Генерис»;
3. ИОТ – 34 Инструкция по ОТ при работе с ЛВЖ в лабораториях института;
4. ИОТ – 86 Инструкция о мерах ПБ в лабораториях;
5. ИОТ – 99 Правила работы с микроорганизмами III-IV группы патогенности и возбудителями паразитарных болезней.
6. **Ссылки**

1. H.A. Raja, A.N. Miller, C.J. Pearce, N.H. Oberlies. Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. J. Nat. Prod. 2017, 80, 756, DOI: 10.1021/acs.jnatprod.6b01085−770.

2. Выявление и исследование нуклеиновых кислот гастровирусов. Практикум по молекулярной вирусологии: Методическое пособие/ Тикунова Н.В., Хлусевич Я.А. Вихрова М.А., Нетесов С.В.; Новосиб. гос. ун-т. Новосибирск, 2011. 74 с.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| № | ФИО | Должность | Дата | Подпись исполнителя | Подпись руководителя |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |

**Список ознакомления**

**СОП № ЛММБ 2-7-2017-09**

**Идентификация бактериального штамма по биохимическим свойствам с использованием анализатора GenIII OmniLog**

**Составили:** к.б.н., с.н.с. В.В. Морозова, вед. инженер А.В.Бардашева

**Местонахождение:** ИХБФМ СО РАН

Пересмотр через 1 год.

1. **Введение, цель**

Настоящая методика устанавливает порядок идентификации микроорганизма, депонированного в КЭМТК ИХБФМ, по его биохимическим свойствам.

1. **Назначение**

Идентификация микроорганизма является необходимым этапом при депонировании микроорганизма в Коллекции ЭМТК

1. **Термины и определения**

**СОП –** стандартная операционная процедура;

**Асептика** – комплекс мер направленных на предупреждение попадания в рабочую зону сторонних микроорганизмов;

**Селективные среды** – питательные среды для выделения определенных микроорганизмов за счет создания благоприятных для них условий роста и неблагоприятных условий для сопутствующих микроорганизмов других видов;

**РПА** – рыбо-пептонный агар;

**СМА** – сердечно-мозговой агар;

**СМБ** – сердечно-мозговой бульон.

1. **Пересмотр**

Данная СОП вводится впервые.

1. **Материалы и оборудование**
   1. ***Материалы и реактивы***

| **Наименование основных реактивов и материалов** | **НТД, производитель, страна** |
| --- | --- |
| РПА | ТУ 9385-012-14237183-07 |
| СМА | BioMerieux, Франция |
| Микропланшет GEN III MicroPlate | BioLog, США |
| Инокулятор Inoculatorz | BioLog, США |
| Наконечники 1250 мкл для инокулирования микропланшетов | BioLog, США |
| Инокулирующая жидкость IF-A | BioLog, США |
| Инокулирующая жидкость IF-B | BioLog, США |
| Инокулирующая жидкость IF-C | BioLog, США |
| Электронная пипетка Ovation | BioLog, США |
| Комплект автоматических пипеток с переменным объемом (4 шт) | «Ленпипет», Россия |
| Резервуар стерильный для использования с многоканальными пипетками | BioLog, США |
| Спиртовка лабораторная | ГОСТ 23932-90Е |
| Колбы мерные вместимостью 250 мл | ГОСТ 1770-74 |
| Флаконы градуированные c завинчивающейся крышкой, 500 мл | Isolab, Германия |
| Цилиндры мерные вместимостью 50 мл, 500 мл и 1 л | ГОСТ 1770-74 |
| Пробирки типа Eppendorf, 1.5 мл | Thermo, Россия |
| Наконечники для автоматических дозаторов объемом 200 мкл | «Eppendorf», США |
| Спирт этиловый, ректифицированный | ЛРС 000279/10 |
| Перекись водорода, медицинская | ГОСТ 177-88 |
| Вода дистиллированная рН от 5,0 до 7,0. | ГОСТ 6709-72 |
| Натрий хлористый, хч | ГОСТ 4233-77 |
| Чашки Петри, пластиковые диаметр 90 мм | Greiner Bio-One, Австрия |
| Бактериологическая петля пластиковая одноразовая | Citotest, Китай |

* 1. ***Оборудование***

|  |  |
| --- | --- |
| **Оборудование** | **НТД, производитель, страна** |
| Биохимический прибор-анализатор GenIII OmniLog Plus | BioLog, США |
| Бокс биологической (микробиологической) безопасности II класс | Lamsystems, Россия |
| Турбидиметр | BioLog, США |
| Холодильник | Indesit, Италия |
| Весы электронные аналитические | Ohaus, США |
| Термостат суховоздушный лабораторный ТСвЛ-80 | ТУ-9452-006-07505566-2006 |
| Автоклав ВК-75 | ТЗМОИ, Россия |
| Вортекс | BioSan, Латвия |

* 1. ***Комплект спецодежды***

|  |  |
| --- | --- |
| **Одежда** | **НТД, производитель, страна** |
| Колпак медицинский | ГОСТ 2313478 |
| Перчатки хирургические резиновые | ГОСТ 3-88 |
| Маска медицинская | ГОСТ EN 13795-1-2011 |
| Халат медицинский | ГОСТ 24760-81 |

1. **Помещения**

Проведение работ осуществляется в боксовых помещениях, в которых находятся боксы биологической (микробиологической) безопасности II класса**.**

1. **Процедура**
   1. ***Подготовительный этап***

***7.1.1. Подготовка персонала к проведению работ***

– надеть медицинский халат и перчатки

***7.1.2. Приготовление дезинфицирующего раствора***

– приготовить 3% раствор перекиси водорода, в стеклянный цилиндр налить (100±1) мл 30% перекиси водорода и довести объем до 1000 мл водопроводной водой, данный раствор может быть использован в течение 48 ч;

***7.1.3. Подготовка боксового помещения к работе***

– обработать 3% раствором перекиси водорода поверхности помещения и оборудования до начала работ;

– обработать ламинарный бокс и помещение ультрафиолетовыми лучами до начала работ в течение 15 мин.

***7.1.4.*** ***Приготовление 70% раствора этилового спирта***

– налить в стеклянный цилиндр (70±1) мл 96% этилового спирта и довести объем до 100 мл дистиллированной водой;

***7.1.5. Подготовка чашек Петри с питательной средой***

– приготовить питательную среду согласно инструкции производителя;

– разлить питательную среду после автоклавирования в стерильные чашки Петри толщиной (4,0±0,5) мм и оставить для застывания при комнатной температуре.

***7.1.6. Пересев культуры на неселективные питательные среды***

– бактериологической петлей отобрать небольшое количество биомассы с поверхности колоний и высеять методом истощающего штриха на чашку Петри с питательной средой РПА или СМА. Инкубировать чашку согласно условиям, записанным в журнале депонирования микроорганизмов в течение 24 – 72 часов. Использовать выросшие колонии для дальнейшей идентификации культуры.

**7.1.7**. За час до начала засева микропланшетов включить биохимический прибор-анализатор GenIII OmniLog Plus для прогрева термостата-инкубатора.

***7.2. Основной этап***

***7.2.1. Подготовка персонала к проведению работ***

– надеть боксовый халат, перчатки, шапочку и медицинскую маску. Дальнейшую работу вести в условиях ламинарного бокса биобезопасности.

***7.2.2. Засев микропланшетов GEN III MicroPlate и инкубирование планшетов в биохимическом анализаторе GenIII OmniLog Plus***

– выбрать тип инокулирующей жидкости (IF-A, IF-B или IF-C) согласно инструкции к прибору GenIII OmniLog Plus (Приложение) и предварительным данным о возможной таксономической принадлежности штамма, полученным на основе культуральных и морфологических свойств колоний и клеток исследуемого штамма;

– коснуться инокулятором выросшей колонии на чашке Петри, после чего поместить инокулятор в пробирку с инокулирующей жидкостью, опустить его до дна пробирки и растереть бактериальную массу по дну пробирки;

– перемешать жидкость в пробирке с использованием вортекса и замерить оптическую плотность инокулированной культуры с использованием турбидиметра. Оптическая плотность должна быть не более 0.05 OD. Если оптическая плотность выше – разбавить полученную культуру дополнительной стерильной инокулирующей жидкостью;

– перелить инокулят в стерильный резервуар и из него электронной многоканальной пипеткой Ovation раскапать по 100 мкл во все лунки микропланшета GEN III MicroPlate;

– подписать микропланшет, закрыть крышкой и перенести в термостат-инкубатор биохимического анализатора GenIII OmniLog Plus;

– включить программное обеспечение Microbial Identification Systems Software, внести запись о микропланшете в базу данных Microbial Identification Systems Software и выбрать протокол инкубирования, соответствующий инокулирующей жидкости (А, B, или C);

– инкубировать планшет в термостате-инкубаторе при 33 °С в режиме с периодическим автоматическим считыванием данных. Максимальный срок инкубации составляет 36 часов, в течение этого времени прибор должен будет идентифицировать штамм;

– распечатать лист идентификации, сложить в папку «Идентификация штаммов GenIII OmniLog Plus» и внести полученные данные в электронную базу данных микроорганизмов КЭМТК;

– в случае, если таксономическую принадлежность штамма определить не удалось, засеять новый микропланшет GenIII OmniLog Plus той же культурой, взяв инокулирующую жидкость другого типа и поменяв протокол инкубирования;

– в случае выявления принадлежности штамма при повторном инкубировании, распечатать лист идентификации, сложить в папку «Идентификация штаммов GenIII OmniLog Plus» и внести полученные данные в электронную базу данных микроорганизмов КЭМТК;

– если таксономическая принадлежность при повторном инкубировании не выявлена, идентифицировать микроорганизм согласно СОП № ЛММБ-2-4-2017-09 или СОП № ЛММБ-2-6-2017-09.

***7.3. Завершающий этап***

– замочить инкубированные микропланшеты в 6% растворе перекиси водорода, избегая образования воздушных пробок. Экспозиция не менее 6 ч.

– обработать 3% раствором перекиси водорода поверхности помещения и оборудования после окончания работ;

– обработать ламинарный бокс и помещение ультрафиолетовыми лучами после окончания работ в течение 15 мин.

1. **Охрана труда и техника безопасности**

При проведении процедуры необходимо соблюдать следующие инструкции по технике безопасности и инструкции по биобезопасности:

1. ИОТ – 02 Инструкция по ОТ для неэлектротехнического персонала по электробезопасности на I квалификационную группу;
2. ИОТ – 10 Инструкция по ОТ при работе с облучателем бактерицидным ОБНП 2(2х15-01) «Генерис»;
3. ИОТ – 34 Инструкция по ОТ при работе с ЛВЖ в лабораториях института;
4. ИОТ – 72 Инструкция по ОТ при работе с перекисью водорода и органическими перекисными соединениями;
5. ИОТ – 86 Инструкция о мерах ПБ в лабораториях;
6. ИОТ – 99 Правила работы с микроорганизмами III-IV группы патогенности и возбудителями паразитарных болезней.

**Приложение к СОП № ЛММБ 2-7-2017-09**

**INSTRUCTIONS FOR USE OF THE BIOLOG GEN III MICROPLATE**™

**Intended Use**

The GEN III MicroPlate™ test panel provides a standardized micromethod using 94 biochemical tests to

profile and identify a broad range of Gram-negative and Gram-positive bacteria1,2. Biolog’s Microbial

Identification Systems software (e.g.OmniLog® Data Collection) is used to identify the bacterium from its phenotypic pattern in the GEN III MicroPlate.

**Description**

The Biolog GEN III MicroPlate analyzes a microorganism in 94 phenotypic tests: 71 carbon source

utilization assays and 23 chemical sensitivity assays. The test panel provides **Phenotypic Fingerprint** of the microorganism that can be used to identify it at the species level.

All necessary nutrients and biochemicals are prefilled and dried into the 96 wells of the MicroPlate. Tetrazolium redox dyes are used to colorimetrically indicate utilization of the carbon sources or resistance to inhibitory chemicals.

The isolate to be identified is grown on agar medium and then suspended in a special “gelling” inoculating fluid (IF) at the recommended cell density. Then the cell suspension is inoculated into the GEN III MicroPlate, 100 μl per well, and the MicroPlate is incubated to allow the phenotypic fingerprint to form. All of the wells start out colorless when inoculated. During incubation there is increased respiration in the wells where cells can utilize a carbon source and/or grow. Increased respiration causes reduction of the tetrazolium redox dye, forming a purple color. Negative wells remain colorless, as does the negative control well (A-1) with no carbon source. There is also a positive control well (A-10) used as a reference for the chemical sensitivity assays in columns 10-12. After incubation, the phenotypic fingerprint of purple wells is compared to Biolog’s extensive species library. If a match is found, a species level identification of the isolate is made.

**Determine Appropriate Protocol to Use (Inoculating Fluid and Cell Density)**

All protocols are performed in the same manner, the only difference being the choice of inoculating

fluid (IF) and cell density for inoculation.

**Protocol A** is used for the vast majority of species.

**Protocol B** is used for a small number of strongly reducing species and capsulated species (primarily some strains of *Aeromonas, Vibrio,* and spore-forming Gram-positive rods). These species will give a false-positive result in the A-1 well with Protocol A. If this occurs, simply repeat the test using Protocol B.

**Protocol C1** is used for slow growing bacteria that typically form pinpoint-sized colonies (less than

1 mm in diameter) on BUG+B Agar in 24 hours of growth. These are primarily microaerophilic and capnophilic Gram-positive cocci and tiny rods. See Table 1. below for a list.

**Protocol C2** is used for fastidious, capnophilic, and very oxygen-sensitive bacteria that grow very slowly or not at all on BUG+B Agar. For example, it is used for fastidious Gram-negative species that would most likely be encountered from respiratory tract specimens after cultivation on Chocolate Agar with 6.5% CO2. Some very oxygen-sensitive Gram-positive bacteria also require the higher inoculation density of Protocol C2. See Table 1. below for a list. If unsure of the appropriate test protocol, use protocol A. If the result fails to yield an identification because of a false-positive A-1 well, then use Protocol B. If the result fails because of insufficient positive carbon source reactions, then try, in succession, Protocols C1 and C2.

**Table 1. Test Protocols**

**Protocol IF Cell Density Species**

A **Nearly all** – this is the default protocol

B **Strongly reducing and capsule producing GN** (e.g., some *Aeromonas,*

*Vibrio*) **and GP** (e.g., some *Bacillus, Aneurinibacillus, Brevibacillus,Lysinibacillus, Paenibacillus,* and *Virgibacillus* )

C1 **Microaerophilic, capnophilic GP** (e.g., *Dolosicoccus, Dolosigranulum,*

*Eremococcus, Gemella, Globicatella, Helcococcus, Ignavigranum,Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Streptococcus,Weissella,* and some *Aerococcus, Arcanobacterium, Corynebacterium* and *Enterococcus sp.*)

C2 **Fastidious, capnophilic, oxygen sensitive GN** (e.g., *Actinobacillus, Aggregatibacter, Alysiella, Avibacterium, Bergeriella, Bordetella, Capnocytophaga, Cardiobacterium, CDC Group DF-3, CDC Group EF-4,Conchiformibius, Dysgonomonas, Eikenella, Francisella, Gallibacterium,*

*Gardnerella, Haemophilus, Histophilus, Kingella, Methylobacterium,Moraxella, Neisseria, Oligella, Ornithobacterium, Pasteurella,Simonsiella, Suttonella,* and *Taylorella*) **and GP** (*Actinomyces,*

*Aerococcus, Alloiococcus, Arcanobacterium, Carnobacterium, Corynebacterium, Erysipelothrix, Granulicatella, Lactobacillus, Pediococcus,* and *Tetragenococcus*)

**TEST PROCEDURE**

**Preparation**

Before starting, prewarm MicroPlates and IF to room temperature and review the entire protocol, including precautions.

**Step 1. Culture Organism on Biolog Recommended Agar Media**

**Isolate a pure culture** on Biolog recommended agar media (**BUG+B** or **Chocolate Agar)** and incubate at 33° C. Some species may require special culture conditions, for example either lower or higher temperature (26° - 37° C.) and elevated CO2 (6.5% - 10%).

**Use of alternative media should be validated**. For laboratories that need to use agar media without blood, we recommend using **BUG Agar**. However, some species will grow extremely slowly or not at all if blood is omitted, for example the genera listed for Protocols C1 and C2 in Table 1. **R2A Agar** and Tryptic Soy Agar without or with blood (**TSA, TSA+B**) can be substituted, but they will not culture as wide a range of bacteria as BUG+B. Furthermore, their recipes and performance characteristics from different vendors may vary.

**The cells must be freshly grown** since many strains lose viability and metabolic vigor in stationary phase. The recommended incubation period for most organisms is 4-24 hours. Sporeforming gram-positive bacteria (Bacillus and related genera) should be grown for less than 16 hours to help minimize sporulation.

**If insufficient growth is obtained** to inoculate the panel, restreak heavily (as a lawn) onto one or more agar plates. Incubate for 4-48 hours. This should give enough growth to inoculate the panel.

**Step 2. Prepare Inoculum**

**Check the calibration of the turbidimeter** periodically. Use an appropriate turbidity standard (85% T or 65% T) and follow instructions in the turbidimeter manual to verify that the turbidimeter is calibrated and operating properly.

**Blank the turbidimeter** with a clean tube (wiped clean of dirt and fingerprints) containing uninoculated IF. Because the tubes used are not optically uniform, they should be blanked individually. Set the 100% transmittance adjustment knob so that the meter reads 100%.

**Prepare the inoculum at the desired turbidity.** The target **cell density should be in the range**

**of 90-98%T for Protocols A, B, and C1**. **Protocol C2 requires a higher cell density of 62-68%T** for species that are sensitive to oxygen. **Use a cotton-tipped Inoculatorz swab** to pick up a 3 mm diameter area of cell growth from the surface of the agar plate.

grasp the swab at its tip and, holding the swab vertically, touch it to the cell growth. For fast growing bacteria, touch a single colony, for medium growing bacteria, touch a cluster of colonies, and for slow growing bacteria touch the first area of confluent growth. Release the bacteria into the IF by rubbing the swab tip against the bottom of the tube containing IF Crush any cell clumps against the tube wall or remove them from the IF by catching them on the swab. Stir the IF with the swab to obtain a uniform cell suspension and read it in the turbidimeter.If the cell density is too low, add more cells. If the cell density is too high, add more IF. **For extremely clumpy bacteria** that cannot be dispersed directly, use the following procedure. First prepare a dense suspension in 2 ml of IF as follows. **Use a sterile wooden Streakerz stick** to remove a clump of cell mass from the agar surface without gouging the agar. If the bacteria are extremely dry and embedded in the agar, use the edge of a **sterile glass microscope slide** to

gently scrape a mass of cells onto the glass slide, again, without gouging the agar. The cells can then be scraped off the glass slide with a sterile Streakerz stick. Then use the Streakerz stick to deposit the cell mass onto the inner wall of a **dry tube**. Use the Streakerz stick to crush, break up, and spread the clumps of cells against and along the inner wall of the tube. Then add 2 ml of IF, and gradually slide the dispersed cells into the IF. The resulting cell suspension will be a mixture of suspended cells and residual clumps. Stand the tube in a rack for about 5 minutes and allow the clumps to settle to the bottom. Use a small pipet and transfer the suspended cells at the top into a fresh tube of IF to achieve the target cell density.

**Step 3. Inoculate MicroPlate**

**Pour** the cell suspension into the multichannel pipet reservoir.

**Fasten** 8 sterile tips securely onto the 8-Channel Repeating Pipettor and fill the tips by drawing up the cell suspension from the reservoir.

**Fill all wells with precisely 100 μl.** Be careful not to carry over chemicals or splash from one well into another. The inoculating fluid will form a soft gel shortly after inoculation.

**Cover the MicroPlate** with its lid and eject the pipettor tips.

**Step 4. Incubate MicroPlate**

**Place the MicroPlate** into the OmniLog incubator/reader, or into an incubator, for 3 to 36 hours. Шncubate at 33° C., or use incubation conditions that were found to be optimal for the bacterium in Step 1.

**RESULTS**

**Reading and Interpretation of Results**

**Read MicroPlates** using Biolog’s Microbial Identification Systems software (e.g.OmniLog® Data

Collection). Refer to the User Guide for instructions.

**Biolog.’s Microbial Identification Systems Software performs all reading and interpretation of**

**results.**

The color densities in wells of the **carbon source utilization assays** in columns 1-9 are **referenced against the negative control well, A-1**. All wells visually resembling the A-1 well should be scored as “negative” (-) and all wells with a noticeable purple color (greater than well A-1) should be scored as “positive” (+). Wells with extremely faint color, or with small purple flecks or clumps are best scored as “borderline” (\). Most species give dark, clearly discernible “positive” reactions. However, it is normal for the “positive” reactions of certain genera to be light or faint purple.

The color densities in wells of the **chemical sensitivity assays** in columns 10-12 are **referenced against the positive control well, A-10**. All wells showing significant sensitivity to the inhibitory chemical, with less than half the color of the A-10 well are considered “negative” (-) for growth. All other wells showing normal or near normal purple color (similar to well A-10) are considered “positive” (+). If there is uncertainty about the interpretation, it is best to score the well as “borderline” (\).

**“False positive.” color** is defined as purple color forming in the negative control well (A-1) and in

other “negative” wells. This is seen with only a few species such as from the genera ***Aeromonas, Vibrio,*** and ***Bacillus***. If such a result occurs, the cells are simply retested with Protocol B and IFB.

**See Biolog.’s Microbial Identification Systems software User Guide for further assistance**

**in interpreting identification results.**

**Precautions**

To obtain accurate and reproducible results, **the recommendations below must be followed**. **Read** the “Instructions for Use” prior to using the GEN III MicroPlate and follow the procedures. **Pure cultures must be used** to obtain identifications. The system is not designed to identify individual bacterial strains from within mixed cultures. The most common problem in identification is that microbiologists are not aware that they have a mixed culture. Streaking for isolated colonies may not be sufficient because isolated colonies can arise from a clump of cells as well as a single cell. Bacteria have sticky surfaces and they tightly adhere to other bacteria. **This is particularly a problem with mucoid bacteria, fresh environmental isolates, and staphylococci.** First, examine cultures with care using a dissecting microscope or some colony magnifying lens, to make sure that only one colony morphology is present in the culture. **If no species identification is obtained, you may still have a mixed culture.** Restreak the cells onto a multi-chromogenic agar medium and let the original agar plate and the chromogenic agar plate sit at room temperature for 3 or 4 days. Examine both plates carefully, looking for the outgrowth of “bumps” or non-uniform growth in the areas of confluent growth. On the chromogenic agar plate, look for more than one color. If necessary, reisolate the colony types that are present and perform the identification assay a second time.

**Culture media and repeated subculturing** may affect the results. Strains may produce different phenotypic patterns depending upon how they are cultured prior to inoculation.

**Sterile** components and aseptic techniques must be used in set-up procedures. Contamination will

affect results.

**Disposable glassware** should be used to handle all cell suspensions and solutions. Glassware that has been washed may contain trace amounts of soap or detergent that will affect results.

**Prewarm** the IF and the MicroPlates to room temperature before use. Some species (e.g.,

*Neisseria sp.*) are very sensitive to cold shocks.

**Check the calibration of** your turbidimeter carefully and **always prepare your inoculum within the specified density range.**

**Biolog.’s chemistry** contains components that are sensitive to temperature and light. Store the inoculating fluids in the dark with refrigeration. Brown or yellow wells in the GEN III MicroPlate indicate deterioration of the chemistry.

**Always keep in mind** that you are testing the metabolic properties of **live cells**. Some species can

lose their metabolic vigor when subjected to stresses (e.g., temperature, pH, and osmolarity) for

even a few minutes. To get the best performance possible from these MicroPlates, be aware that

the cells are alive and take care in how you handle them.

**Trouble Shooting**

**If all wells in columns 1-9 are positive, make sure that:**

You are using a microorganism that is appropriate for the GEN III MicroPlate. If the bacterium is a

strongly reducing or capsulated species causing false positive color in the A-1 well, repeat the test

using Protocol B and IF-B.

You are not carrying over any nutrients from the agar growth medium into the inoculating fluid.

Your inoculum is free of all clumps.

Your inoculum density is not excessive – check the calibration of your turbidimeter. The A-1 well is not under-filled. It is used as a reference well by Biolog’s Microbial Identification Systems software.

**If all wells in columns 1-9 are negative, make sure that:**

You are using a microorganism that is appropriate for the GEN III MicroPlate. Oligotrophic species

or extremely slow growing or oxygen sensitive bacteria, for example, may give all negative wells.

Your cells are freshly grown and you have used the recommended agar culture medium.

Your incubation temperature and atmosphere are correct for the organism that is being tested.

The inoculating fluid was stored correctly and was prewarmed prior to use.

You are handling the cells with all disposable hardware (soap residues are toxic).

Your inoculum density is sufficient – check the calibration of your turbidimeter.

The A-1 well is not over-filled. It is used as a reference well by Biolog’s Microbial Identification

Systems software.

**Performance Characteristics**

The GEN III MicroPlate performance characteristics have been determined by establishing a database using a large collection of microorganisms from diverse sources. The database is designed to give identifications of all species in the database, in accordance with current standards of classical identification methods and current taxonomic nomenclature. **To obtain accurate and reproducible results, all procedures and recommendations in these Instructions for Use must be followed precisely.**

**Limitations**

The GEN III MicroPlate is designed to identify pure cultures of Gram-negative and Gram-positive bacteria.

The panel will only identify members of the species in the current database. Other species will usually be

reported out with the message “no identification.” Atypical strains may also yield a low similarity index and therefore will be reported out as “no identification.” **This product is not for human in vitro diagnostic use.** Some bacterial species are reportable to government and public health agencies in certain

circumstances. For any isolate that is identified as ***Salmonella* or *Shigella or E. coli O157:H7,*** we

recommend confirmation by serology. ***Neisseria gonorrhoeae*** identifications should also be confirmed.

Appropriate caution and confirmation should be used for isolates suspected of being **Dangerous Pathogens**.

**Quality Control**

Biolog MicroPlates are tested and meet internal quality control standards before being released for sale.

However, some laboratories may desire or may be required to perform independent quality control checks

on each manufacturing lot.

To test the performance of the GEN III MicroPlate use the 2 Gram-negative and 2 Gram-positive strains

specified below using Protocol A. These are available from Biolog as a set (Biolog Catalog No.8050).

1. *Escherichia coli* ATCC 11775

2. *Paenibacillus polymyxa* ATCC 842

3. *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228

4. *Stenotrophomonas maltophilia* ATCC 13637

Inoculate each bacterium following the TEST PROCEDURE as specified. When lyophilized or frozen

cultures are used, they should be **subcultured at least twice** before being tested.

Read the panels after appropriate incubation. The resulting identification should correctly correspond to

the identity of the quality control strain. If the identification does not match, review the test procedures and check the purity of your culture. Repeat the test.

**Technical Assistance**

**For help** or to **report problems** with this product contact Biolog Technical Service either by phone (510-

785-2564) by fax (510-782-4639) or by email (tech@biolog.com) during business hours (7:30 A.M. to 5 P.M.

Pacific Standard Time), or contact the Biolog Distribution Partner in your area.

General information, Certificates of Analysis and MSDS can now be found at www.biolog.com.

***Ссылки***

1. Bochner, BR 1989. Sleuthing out Bacterial Identities. Nature 339:157-158.

2. Bochner, BR 1989. “Breathprints” at the Microbial Level. ASM News 55:536-539.

3. Biolog, Inc., US Patent # 5,627,045.

**Список ознакомления**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| № | ФИО | Должность | Дата | Подпись исполнителя | Подпись руководителя |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |

**СОП № ЛММБ 2-8-2017-09**

**Проверка жизнеспособности депонированной культуры микроорганизма из Коллекции ЭМТК**

**Составили:** к.б.н., с.н.с. В.В. Морозова, вед. инженер А.В.Бардашева

**Местонахождение:** ИХБФМ СО РАН

Пересмотр через 1 год.

1. **Введение, цель**

Настоящая методика устанавливает порядок проверки жизнеспособности и чистоты культуры микроорганизма, депонированного в КЭМТК ИХБФМ.

1. **Назначение**

Проверка жизнеспособности и чистоты культуры депонированного в КЭМТК микроорганизма является основным этапом поддержания Коллекции ЭМТК в рабочем состоянии.

1. **Термины и определения**

**СОП –** стандартная операционная процедура;

**Асептика** – комплекс мер направленных на предупреждение попадания в рабочую зону сторонних микроорганизмов;

**Селективные среды** – питательные среды для выделения определенных микроорганизмов за счет создания благоприятных для них условий роста и неблагоприятных условий для сопутствующих микроорганизмов других видов;

**РПА** – рыбо-пептонный агар;

**СМА** – сердечно-мозговой агар;

**СМБ** – сердечно-мозговой бульон.

1. **Пересмотр**

Данная СОП вводится впервые.

1. **Материалы и оборудование**
   1. ***Материалы и реактивы***

| **Наименование основных реактивов и материалов** | **НТД, производитель, страна** |
| --- | --- |
| РПА | ТУ 9385-012-14237183-07 |
| СМБ | BioMerieux, Франция |
| Бактоагар | BD, США |
| Дрожжевой экстракт | BD, США |
| Триптон | BD, США |
| Глицерин | ГОСТ 6259-75 |
| Среда Левина | Oxoid, Великобритания |
| Среда Nutrient Broth | Difco, США |
| Коринебакагар | ТУ 9398-019-78095326-2006 |
| Среда Китта-Тароцци | Биотехновация, Россия |
| MRS агар | Himedia, Индия |
| Сальмонелла, шигелла агар | Oxoid, Великобритания |
| Агар Мак-Конки без кристаллического фиолетового | BioMerieux, Франция |
| Солевой агар с маннитом | BioMerieux, Франция |
| Агар CLED | BioMerieux, Франция |
| Сабуро агар | BioMerieux, Франция |
| Дезоксихолатный цитратный агар | Oxoid, Великобритания |
| Агар Эндо | ТУ 9398-027-78095326 |
| Пробирки типа Eppendorf, 1.5 мл | Thermo, Россия |
| Наконечники для автоматических дозаторов до 200 мкл | «Eppendorf», США |
| Спирт этиловый, ректифицированный | ЛРС 000279/10 |
| Перекись водорода, медицинская | ГОСТ 177-88 |
| Вода дистиллированная рН от 5,0 до 7,0. | ГОСТ 6709-72 |
| Натрий хлористый, хч | ГОСТ 4233-77 |
| Чашки Петри, пластиковые диаметр 90 мм | Greiner Bio-One, Австрия |
| Предметные стекла | Isolab, Германия |
| Покровные стекла | Стеклоприбор, Россия |
| Набор красителей по Грамму | БиоВитрум, Россия |
| Бактериологическая петля пластиковая одноразовая | Citotest, Китай |
| Автоматическая пипетка вместимостью 20÷200 мкл | «Ленпипет», Россия |
| Колбы мерные вместимостью 100 мл | ГОСТ 1770-74 |
| Флаконы градуированные c завинчивающейся крышкой, 500 мл | Isolab, Германия |
| Спиртовка лабораторная | ГОСТ 23932-90Е |
| Цилиндр вместимость 1 л | ГОСТ 1770-74 |
| Пакеты для стерилизации | Citotest, Китай |
| Газогенерирующие пакеты, 3,5 л | Oxoid, Великобритания |
| Пробирки с закручивающимися крынками, 2,0 мл DNase-free, RNase-free | SSIBIO, США |

* 1. ***Оборудование***

|  |  |
| --- | --- |
| **Оборудование** | **НТД, производитель, страна** |
| Баня водяная лабораторная | BioSan, Латвия |
| Бокс биологической (микробиологической) безопасности II класс | Lamsystems, Россия |
| Микроскоп Imager A2 | Carl Zeiss, Швейцария |
| Холодильник | Indesit, Италия |
| Весы электронные аналитические | Ohaus, США |
| Термостат суховоздушный лабораторный ТСвЛ-80 | ТУ-9452-006-07505566-2006 |
| Анаэростат, 2,5 л | Oxoid, Великобритания |
| Автоклав ВК-75 | ТЗМОИ, Россия |
| Вортекс | BioSan, Латвия |

* 1. ***Комплект спецодежды***

|  |  |
| --- | --- |
| **Одежда** | **НТД, производитель, страна** |
| Колпак медицинский | ГОСТ 2313478 |
| Перчатки хирургические резиновые | ГОСТ 3-88 |
| Маска медицинская | ГОСТ EN 13795-1-2011 |
| Халат медицинский | ГОСТ 24760-81 |

1. **Помещения**
2. Проведение работ осуществляется в боксовых помещениях, в которых находятся боксы биологической (микробиологической) безопасности II класса
3. **Процедура**
   1. ***Подготовительный этап***

***7.1.1. Подготовка персонала к проведению работ***

– надеть медицинский халат и перчатки

***7.1.2. Приготовление дезинфицирующего раствора***

– приготовить 3% раствор перекиси водорода, в стеклянный цилиндр налить (100±1) мл 30% перекиси водорода и довести объем до 1000 мл водопроводной водой, данный раствор может быть использован в течение 48 ч;

***7.1.3. Подготовка боксового помещения к работе***

– обработать 3% раствором перекиси водорода поверхности помещения и оборудования до начала работ;

– обработать ламинарный бокс и помещение ультрафиолетовыми лучами до начала работ в течение 15 мин.

***7.1.4.*** ***Приготовление 70% раствора этилового спирта***

– налить в стеклянный цилиндр (70±1) мл 96% этилового спирта и довести объем до 100 мл дистиллированной водой;

***7.1.5. Приготовление LB-среды для хранения культур***

– приготовить 50% (об./об.) раствор глицерина в дистиллированной воде;

– автоклавировать при 121°С в течение 15 мин;

– взвесить (3,0±0,1) г триптона, внести в мерный циллиндр;

– взвесить(1,5±0,1) г дрожжевого экстракта, внести в мерный цилиндр с триптоном. Добавить дистиллированной воды до 300 мл;

– разлить по флаконам градуированным;

– автоклавировать при 121°С в течение 15 мин;

– смешать в асептических условиях равные объемы среды LB и 50% раствора глицерина;

– разлить в стерильные пробирки объемом 2 мл с завинчивающейся крышкой по 200 мкл. Инкубировать при (36±1)°С в течение 18 – 24 ч для выявления случайной контаминации.

***7.1.6. Приготовление физиологического раствора***

– взвесить (0,9±0,1) г хлорида натрия, внести в мерную колбу вместимостью 100 мл и добавить дистиллированной воды до метки;

– перемешать до полного растворения соли;

– разлить по флаконам градуированным;

– автоклавировать при 121°С в течение 15 мин.

***7.1.7. Подготовка чашек Петри с питательной средой***

– приготовить питательную среду согласно инструкции производителя;

– разлить питательную среду после автоклавирования в стерильные чашки Петри толщиной (4,0±0,5) мм и оставить для застывания при комнатной температуре.

***7.2. Основной этап***

***7.2.1. Посев на неселективные питательные среды***

– достать пробирку с соответствующей культурой из коллекционного музея, хранящегося при температуре –20 °С. Бактериологической петлей отобрать небольшое количество суспензии из пробирки и высеять методом истощающего штриха на чашку Петри с питательной средой РПА, СМА для бактериальных штаммов, либо Сабуро-агаром для грибов. Инкубировать чашку согласно условиям, записанным в журнале депонирования микроорганизмов в течение 24 – 72 часов.

– по истечении периода инкубации проверить морфологию колоний на соответствие описанной в журнале депонирования образцов. Для этого изучить морфологию изолированных колоний:

величину колоний (крупные, средние, мелкие, карликовые);

форму колоний (правильная, неправильная, круглая);

прозрачность колоний (прозрачная, непрозрачная);

цвет (бесцветные или окрашенные);

характер поверхности (гладкая, бугристая, блестящая, шероховатая);

высоту колоний над поверхностью среды (вдавленная, плоская, возвышающаяся);

край колоний (ровный, неровный);

структуру колонии (гомогенная, негомогенная);

при взятии мазка оценить консистенцию колонии (мягкая, слизистая, сухая);

– микроскопировать нативные мазки и мазки, окрашенные по Грамму согласно разделам 7.2.2. и 7.2.3., из изолированных колоний для суждения об однотипности и соответствии описанному в журнале депонирования микроорганизму;

В случае отсутствия роста культуры из пробирок, хранящихся при –20 °С, обратиться к музею, хранящемуся при –70 °С, и высеять культуру из соответствующих пробирок из этого хранилища. В данном случае, высев проводить как на чашки Петри с агаризованной средой (РПА или СМА для бактерий, Сабуро-агар для грибов), так и в жидкую питательную среду Nutrient Broth для накопления чистой культуры. Инкубировать чашки Петри и пробирки с жидкой средой в условиях, оптимальных для депонированной культуры и описанных в журнале депонирования штаммов. При выявлении роста провести пересев и дальнейшую перезакладку на хранение согласно разделам 7.2.4. и 7.2.5.

В случае полного отсутствия роста культуры считать культуру утерянной.

***7.2.2. Микроскопия нативных препаратов***

– обжечь предметное стекло в пламени спиртовки;

– нанести небольшое количество стерильного физиологического раствора;

– внести прокаленной бактериологической петлей небольшое количество образца. Петлю обеззараживают прожиганием. Сверху препарат накрыть покровным стеклом;

– микроскопировать, производя первичную идентификацию по морфологическим свойствам;

– погрузить препарат в 3% раствор перекиси водорода после окончания микроскопирования. Экспозиция не менее 6 ч.

***7.2.3. Микроскопия мазков окрашенных по Грамму***

– обжечь предметное стекло в пламени спиртовки;

– нанести небольшое количество стерильного физиологического раствора;

– внести прокаленной бактериологической петлей небольшое количество образца. Петлю обеззараживают прожиганием;

– оставить предметное стекло на воздухе до полного высушивания;

– провести фиксацию микропрепарата: предметное стекло трижды накладывают на пламя спиртовки в верхней части на 2 секунды с интервалом 4 секунды (суммарно в пламени 6 секунд). Это позволяет убить микроорганизмы, прикрепить их к стеклу и повысить восприимчивость к красителям;

– поместить на мазок полоску фильтровальной бумаги и нанести на фиксированный мазок несколько капель карболового раствора генцианвиолета (реагент 1) и выдержать 2-3 минуты. Слить краску, удалить фильтровальную бумагу и сполоснуть в проточной воде (до 30 сек);

– залить мазок на 1-2 мин раствором Люголя (реагент 2) до почернения препарата;

– слить раствор, мазок промыть дистилированной водой;

– дифференцировать 96° спиртом, наливая и сливая его, пока отходит синяя краска и не обесцветится мазок (приблизительно 20-60 секунд). Во время дифференцировки препарат все время покачивают;

– промыть тщательно стекло в дистиллированной воде 1-2 мин;

– окрасить препарат дополнительно раствором сафранина (реагент 3) (несколько капель) в течение 2-3 минут для выявления грамотрицательной группы бактерий;

– промыть в проточной воде и высушить фильтровальной бумагой. Грамположительные бактерии имеют сине-фиолетовый цвет (темно-синий), а грамотрицательные - розово-красный, красный или коричневый;

– микроскопировать, производя первичную идентификацию по морфологическим свойствам;

– погрузить препарат в 3% раствор перекиси водорода после окончания микроскопирования. Экспозиция не менее 6 ч.

***7.2.4. Пересев на селективные среды***

– обработать рабочую поверхность ламинарного бокса и руки 70% раствором спирта;

– прокалить бактериологическую петлю в пламени спиртовки, остудить, забрать материал с засеянной чашки Петри и засеять методом истощающего штриха чашки Петри с соответствующей селективной питательной агаризованной средой для подтверждения чистоты культуры (таблица 1);

Таблица 1

**Селективные среды**

|  |  |
| --- | --- |
| **Питательная среда** | **Группа микроорганизмов** |
| Среда Левина | энтеробактерии, стафилококки |
| Коринебакагар | коринебактерии |
| Среда Китта-Тароцци | анаэробные микроорганизмы |
| MRS агар | лактобактерии |
| Дифференцирующий сальмонелла-шигелла агар | сальмонеллы, шигеллы |
| Агар Мак-Конки без кристаллического фиолетового | энтеробактерии |
| Солевой агар с маннитом | стафилококки |
| Агар CLED | микроорганизмы мочевыводящих путей |
| Сабуро агар | грибы |
| Дезоксихолатный цитратный агар | сальмонеллы |
| Агар Эндо | энтеробактерии |
| Почвенный агар | почвенные микроорганизмы |

– поместить чашки Петри в термостат кверху дном и инкубировать при соответствующих оптимальному росту культуры условиях в течение 18 – 72 ч. Чашки с анаэробами поместить в термостат в анаэростате.

– микроскопировать мазки из чистой культуры.

Далее следовать следующему алгоритму:

– при выявлении несоответствия высеянной культуры описанию исходного штамма взять другую пробирку с данной культурой из музейного хранилища при температуре –20 °С и повторить посев с последующим анализом морфологии колоний и клеток. При соответствии высеянной культуры описанному в журнале депонирования штамму перезаложить культуру на хранение при температуре –20 °С как описано в разделе 7.2.5.

– при несоответствии морфологических данных колоний и клеток с повторного высева из музея при температуре –20 °С депонированному штамму высеять штамм из музейного хранилища при –70 °С. При соответствии высеянной культуры описанному в журнале депонирования штамму перезаложить культуру в оба музея (на хранение при температуре –70 °С и при температуре –20 °С) как описано в разделе 7.2.5.

– при гетерогенности культуры провести три пассажа на селективных средах для изоляции чистой культуры. Полученную чистую культуру вновь идентифицировать согласно СОП ИТП 001 для бактерий или СОП ИТП 002 для грибов и при соответствии нуклеотидных последовательностей ранее секвенированным, перезаложить штамм на хранение под тем же номером.

***7.2.5. Закладка на хранение чистых культур***

– отобрать достаточное количество материала для хранения с суточных чашек Петри с чистой культурой стерильной пластиковой бактериальной петлей и поместить в пробирки со средой LB, предназначенной для хранения;

– перемешать на вортексе и поместить три пробирки на хранение при температуре –20 °С, три на хранение при температуре –70 °С;

***7.3. Завершающий этап***

– замочить учтенные чашки Петри в 6% растворе перекиси водорода, избегая образования воздушных пробок. Экспозиция не менее 6 ч.

– обработать 3% раствором перекиси водорода поверхности помещения и оборудования после окончания работ;

– обработать ламинарный бокс и помещение ультрафиолетовыми лучами после окончания работ в течение 15 мин.

1. **Охрана труда и техника безопасности**

При проведении процедуры необходимо соблюдать следующие инструкции по технике безопасности и инструкции по биобезопасности:

1. ИОТ – 02 Инструкция по ОТ для неэлектротехнического персонала по электробезопасности на I квалификационную группу;
2. ИОТ – 10 Инструкция по ОТ при работе с облучателем бактерицидным ОБНП 2(2х15-01) «Генерис»;
3. ИОТ – 34 Инструкция по ОТ при работе с ЛВЖ в лабораториях института;
4. ИОТ – 72 Инструкция по ОТ при работе с перекисью водорода и органическими перекисными соединениями;
5. ИОТ – 86 Инструкция о мерах ПБ в лабораториях;
6. ИОТ – 99 Правила работы с микроорганизмами III-IV группы патогенности и возбудителями паразитарных болезней.
7. **Ссылки**
8. Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности и гельминтами. Санитарные правила. СП 1.2.731-99. – М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 1999.- 107с.
9. Донецкая Э. Г.-А. Клиническая микробиология: Руководство для специалистов клинической лабораторной диагностики. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. – 480 с.
10. Методические рекомендации к проведению практических занятий по дисциплине «Микробиология, вирусология, иммунология» для студентов медико-профилактического факультета/ сост. В.И. Коноплева, Т.М. Гусева: ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России, Рязань: РИО РязГМУ, 2015. – 147 с.
11. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования/ Под ред. М.О. Биргера. – 3-е изд., перераб. и доп. – М., Медицина, 1982. – 464 с.

**Список ознакомления**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| № | ФИО | Должность | Дата | Подпись исполнителя | Подпись руководителя |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |