

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ  
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК» (ИХБФМ СО РАН)

УДК 579.6

№ государственной регистрации АААА-А17-117080410014-1

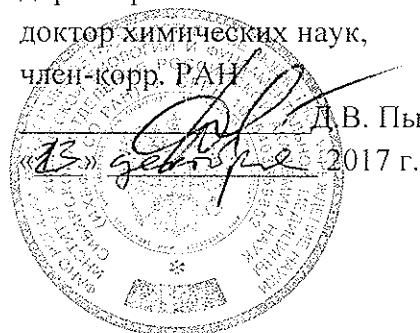
Инв. №

«УТВЕРЖДАЮ»

директор ИХБФМ СО РАН

доктор химических наук,

член-корр. РАН



Д.В. Пышный

2017 г.

ОТЧЕТ

О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

Программа фундаментальных научных исследований

государственных академий наук на 2013–2020 годы

VI. Биологические науки. 55. Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов

ИНВЕНТАРИЗАЦИЯ И РАЗВИТИЕ КОЛЛЕКЦИИ ЭКСТРЕМОФИЛЬНЫХ

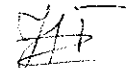
МИКРООРГАНИЗМОВ И ТИПОВЫХ КУЛЬТУР, КЭМТК

(заключительный)

Номер проекта в ИСГЗ ФАНО 0309-2017-0008

Протокол Ученого совета  
№ 13 от «22» декабря 2017 г.

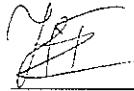
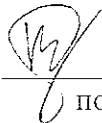
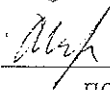


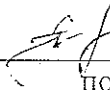

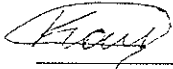

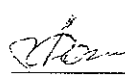
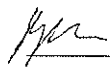
Научный руководитель,  
заведующий лабораторией,  
доктор биологических наук

 22.12.2017  
подпись, дата

Н.В. Тикунова

Новосибирск – 2017

## СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель темы, зав. лабораторией д-р биол. наук	 <u>22.12.2017</u> подпись, дата	Н.В. Тикунова
Исполнители темы		
С.н.с., канд. биол. наук	 <u>22.12.2017</u> подпись, дата	В.В. Морозова
Н.с., канд. биол. наук	 <u>22.12.2017</u> подпись, дата	Е.В. Жираковская
Н.с., канд. биол. наук	 <u>22.12.2017</u> подпись, дата	А.Ю. Тикунов
М.н.с., канд. биол. наук	 <u>22.12.2017</u> подпись, дата	Ю.Н. Козлова
Вед. инженер	 <u>22.12.2017</u> подпись, дата	А.В. Бардашева
Вед. инженер	 <u>22.12.2017</u> подпись, дата	Т.А. Ушакова
Вед. инженер	 <u>22.12.2017</u> подпись, дата	А.В. Каньшина
Ст. лаборант	 <u>22.12.2017</u> подпись, дата	Г.Б. Каверина
Ст. лаборант	 <u>22.12.17</u> подпись, дата	Л.М. Соколова
Нормоконтролер	 <u>22.12.2017</u> подпись, дата	В.А. Пар

## РЕФЕРАТ

Отчет 101 с., 5 рис., 15 табл., 2 источника, 7 прил.

БИОРЕСУРСНАЯ КОЛЛЕКЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ, ЭКСТРЕМОФИЛЬНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ, 16S рНК, МЕЖГЕННЫЕ СПЕЙСЕРЫ NS И ITS, АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ, БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

Объект исследования – биоресурсная коллекция «Коллекция экстремофильных микроорганизмов и типовых культур».

Цель работы – поддержание биоресурсной коллекции «Коллекция экстремофильных микроорганизмов и типовых культур».

Результаты. В рамках выполнения государственного задания были получены следующие результаты:

- 1) Создан технологический паспорт «Коллекции экстремофильных микроорганизмов и типовых культур» ИХБФМ СО РАН, включающий в себя: а) описание полного набора ключевых стандартных операционных процедур (СОП), обеспечивающих поддержание и развитие коллекционного фонда; б) Научно-техническое обоснование смет СОП коллекции ЭМТК ИХБФМ СО РАН. 2) Технологический паспорт КЭМТК ИХБФМ СО РАН размещен на интернет-сайте коллекции ЭМТК ИХБФМ СО РАН. 3) Проведена экспериментальная верификация пяти СОП. 4) Результаты верификации СОП записаны в электронной базе КЭМТК ИХБФМ СО РАН. 5) Электронный каталог коллекции ЭМТК ИХБФМ СО РАН пополнен информацией о 30 штаммах, охарактеризованных согласно перечню СОП КЭМТК ИХБФМ СО РАН. 6) Проведена комплексная инвентаризация имеющихся в коллекции штаммов прокариот, данные об инвентаризации внесены в электронный каталог КЭМТК ИХБФМ СО РАН. 7) Подготовлены две рукописи статей в рецензируемых журналах перечня Scopus на основе материалов коллекции. Одна из них опубликована (Scopus), а вторая отправлена в печать и принята к опубликованию (PLOSone, WoS). 8) Подготовлен календарный план работ по выполнению дополнительного государственного задания. 9) Отчет о проделанной работе в рамках дополнительного государственного задания размещен на интернет-сайте коллекции ЭМТК ИХБФМ СО РАН с указанием ссылки на номер заключенного с ФАНО России соглашения на выполнение дополнительного государственного задания.

Прогнозные предположения о развитии объекта исследования: в дальнейшем планируются работы по поддержанию и пополнению коллекции, расширению фондов и оказание услуг по запросам.

## СОДЕРЖАНИЕ

Обозначения и сокращения	5
Введение	6
Основная часть	9
1 Общая информация о коллекции	–
2 Краткая информация о проделанной работе в рамках дополнительного государственного задания	–
3 Регистрация в государственных информационных системах и финансирование	10
4 Результаты, полученные в рамках дополнительного государственного задания	–
Заключение	21
Список использованных источников	22
Приложение 1. Библиографический список публикаций, опубликованных по результатам выполнения научно-исследовательской работы	23
Приложение 2. Стандартная операционная процедура «СОП № ЛММБ 2-3-2017-09. Получение чистой культуры микроорганизма из образца»	29
Приложение 3. Стандартная операционная процедура «СОП № ЛММБ 2-4-2017-09. Идентификация таксономической принадлежности бактериального изолята по нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК»	39
Приложение 4. Стандартная операционная процедура «СОП № ЛММБ 2-5-2017-09. Характеризация антибиотикоустойчивости бактериального изолята методом диско- диффузионного анализа»	53
Приложение 5. Стандартная операционная процедура «СОП № ЛММБ 2-6-2017-09. Идентификация таксономической принадлежности изолята грибов по нуклеотидным последовательностям межгенных спейсеров ITS и NS»	65
Приложение 6. Стандартная операционная процедура «СОП № ЛММБ 2-7-2017-09. Идентификация бактериального штамма по биохимическим свойствам с использованием анализатора GenIII OmniLog»	77
Приложение 7. Стандартная операционная процедура «СОП № ЛММБ 2-8-2017-09. Проверка жизнеспособности депонированной культуры микроорганизма из Коллекции ЭМТК»	92

## ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

КЭМТК – Коллекция экстремофильных микроорганизмов и типовых культур

СОП – стандартная операционная процедура

16S рРНК – ген, кодирующий рибосомальную РНК малой субъединицы рибосом прокариот; используется для филотипирования прокариот

ITS и NS – нуклеотидные последовательности, расположенные в каскаде генов 18S и 5.8S рибосомных РНК эукариот

## ВВЕДЕНИЕ

Изучение закономерностей организации и функционирования микробных сообществ, существующих в природных экосистемах и ассоциированных с организмом человека, крайне важно как для получения фундаментальных знаний, так и для разработки экспериментальных подходов для развития биотехнологии и фармакологии.

Известно, что развитие биотехнологии в значительной степени основывается на базе микробных продуцентов разной природы, в том числе микроорганизмов, обитающих в экстремальных условиях. В настоящее время наряду с изучением отдельных штаммов и изолятов стало возможным проведение исследований генетического и метаболического потенциала микробных сообществ. Такие исследования позволяют выявлять как отдельные микроорганизмы, так и определенные генетические последовательности, которые могут представлять потенциальный интерес для биотехнологии и фармакологии.

Следует также учитывать, что организм человека постоянно контактирует с огромным количеством микроорганизмов. Более того, некоторые микроорганизмы используют человека как специфическую экологическую нишу. Спектр взаимодействий микроорганизмов и их влияний друг на друга, а также на организм хозяина (человека) многообразен и во многом непонятен. В последние годы появились исследования, демонстрирующие участие ряда формально не патогенных микроорганизмов в развитии таких заболеваний, как язва, болезни сердца, диабет 2 типа, атеросклероз, нарушения функций мозга, ожирение (S. Thomas et al., 2017; A.B.Shreiner et al., 2015).

Одним из главных факторов, обеспечивающих устойчивое изучение микробных сообществ, вирусов и создание новых технологий на основе этих живых объектов, является коллекционная работа. До недавнего времени за Уралом существовала лишь одна коллекция, признанная мировым сообществом – коллекция вирусов. Включая особо опасные, в ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор». Однако, для развития фундаментальных, опытно-конструкторских и прикладных исследований нужны сервисные коллекции, в частности, коллекции микроорганизмов 3-4 групп патогенности. В связи с этим в ИХБФМ на базе лаборатории молекулярной микробиологии организована Коллекция экстремофильных микроорганизмов и типовых культур (КЭМТК), в которой собраны бактериальные штаммы из различных экологических ниш, включая места с экстремальными условиями существования микробных сообществ; клинические штаммы бактерий и низших грибов, а также бактериофаги. Кроме того, при необходимости приобретаются референсные штаммы из признанной всем мировым сообществом коллекции ATCC. В КЭМТК созданы условия

для гарантированного хранения коллекционных образцов, их биохимического и генетического анализа. В содружестве с институтами СО РАН проводится экспедиционная работа и исследования по созданию новых продуцентов.

Особое значение КЭМТК приобрела в последние годы, когда пришло осознание масштабности проблемы антибиотикоустойчивости как у нозокомиальных инфекционных агентов, так и у агентов, ранее не рассматривавшихся в связи с проблемами здоровья человека. В настоящее время коллекция используется для разработки новых способов диагностики антибиотикоустойчивости у бактерий и поиска антибактериальных средств нового поколения. Однако, для нормального развития для любой коллекции требуется пополнение новыми образцами, их надежное хранение, а также, что немаловажно, совершенствование способов ведения коллекционной работы.

Цель проекта – пополнение и инвентаризация образцов, а также разработка и оптимизация стандартных операционных процедур, требуемых при проведения коллекционной работы.

Задачи проекта:

1) Создать технологический паспорт КЭМТК ИХБФМ СО РАН, который включает в себя: а) описание полного набора ключевых СОПов, обеспечивающих поддержание и развитие коллекционного фонда; б) Научно-техническое обоснование смет стандартных операционных процедур коллекции КЭМТК ИХБФМ СО РАН.

2) Разместить технологический паспорт КЭМТК ИХБФМ СО РАН на интернет-сайте коллекции КЭМТК ИХБФМ СО РАН.

3) Экспериментально верифицировать пять СОПов: а) получение чистой культуры микроорганизма из образца, б) идентификация таксономической принадлежности бактериального изолята по нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК, в) характеристика антибиотикоустойчивости бактериального изолята методом диско-диффузионного анализа, г) идентификация таксономической принадлежности изолята грибов по нуклеотидным последовательностям межгенных спейсеров ITS и NS, д) идентификация бактериального штамма по биохимическим свойствам с использованием анализатора GenIII OmniLog. Верификацию каждого СОПа провести на 30 коллекционных штаммах.

4) Записать результаты верификации СОПов в электронной базе КЭМТК ИХБФМ СО РАН.

5) Пополнить электронный каталог коллекции КЭМТК ИХБФМ СО РАН информацией о 30 депонированных культурах экстремофильных микроорганизмов.

6) Подготовить две рукописи статей в рецензируемых журналах (Scopus, WoS), на основе материалов коллекции, одна из которых должна быть принята в печать.

7) Подготовить календарный план работ по выполнению дополнительного государственного задания.

8) На основе полученных результатов подготовить отчет о проделанной работе в рамках дополнительного государственного задания и разместить отчет на интернет-сайте коллекции КЭМТК ИХБФМ СО РАН с указанием ссылки на номер заключенного с ФАНО России соглашения на выполнение дополнительного государственного задания.

В целом, поставленные цели и задачи создают основу для функционирования коллекции ЭМТК ИХБФМ СО РАН.

Настоящий отчет является заключительным по теме «Инвентаризация и развитие коллекции экстремофильных микроорганизмов и типовых культур, КЭМТК» за 2017 год.



## ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

### 1 Общая информация о коллекции

1.1 Название коллекции - Коллекция экстремофильных микроорганизмов и типовых культур, КЭМТК

1.2 Наименование организации ФАНО России – держателя коллекции: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук

1.3 Регистрационный номер биоресурсной коллекции в информационной системе «Парус» ФАНО России: 309

1.4 Направление ФНИ: 55. Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов

1.5 Руководитель коллекции, поддерживающий коллекцию – Тикунова Нина Викторовна, зав. лабораторией, д.б.н., [tikunova@niboch.nsc.ru](mailto:tikunova@niboch.nsc.ru), (383)3635157, 8-913-927-3508

1.6 Назначение коллекции: выделение, изучение, сохранение и предоставление чистых культур микроорганизмов для научных и медицинских исследований и опытно-промышленных разработок

1.7 Регистрация коллекции в перечне ЦКП/УНУ «Современная исследовательская инфраструктура Российской Федерации» - Есть

1.8 Наименование, реестровый номер и адрес ЦКП/УНУ на сайте <http://www.ckp-rf.ru>: Коллекция экстремофильных микроорганизмов и типовых культур, реестровый номер – 478790, <http://www.ckp-rf.ru/ckp/478790/>

1.9 Дата образования коллекции: 01.07.2008 г.

1.10 Отражение коллекционной деятельности в Уставе организации: Нет

1.11 Положение о коллекции, утвержденное на Ученом совете организации: Положение о коллекции утверждено на Ученом совете организации (протокол №14 заседания Ученого совета ФГБУН ИХБФМ СО РАН от 16.12.2016)

1.12 Адрес WEB-сайта организации, на котором представлена информация о коллекции: Информация о коллекции представлена на электронном портале организации: [http://www.niboch.nsc.ru/doku.php/emtc\\_collection](http://www.niboch.nsc.ru/doku.php/emtc_collection)

### 2 Краткая информация о проделанной работе в рамках дополнительного госзадания

Содержание основных результатов работы по дополнительному госзаданию в соответствии с ПФНИ ГАН

2.1 Текст отчета представлен на интернет-сайте коллекции КЭМТК ИХБФМ СО РАН: [http://www.niboch.nsc.ru/doku.php/emtc\\_collection](http://www.niboch.nsc.ru/doku.php/emtc_collection) с указанием ссылки на номер заключенного с ФАНО России соглашения на выполнение дополнительного госзадания

2.2 Содержание основных результатов работы по дополнительному госзаданию в соответствии с ПФНИ ГАН: Создание технологического паспорта Коллекции экстремофильных микроорганизмов и типовых культур, КЭМТК ИХБФМ СО РАН. Проведение инвентаризации части из имеющихся в коллекции штаммов прокариот, проверка их жизнеспособности с записью информации в электронную базу данных КЭМТК ИХБФМ. Получение новых штаммов, выделенных из разных местообитаний. Разработка формата описания коллекции в электронной базе КЭМТК ИХБФМ. Подготовка рукописей двух статей, подготовленных на основе материалов коллекции

### 3 Регистрация в государственных информационных системах и финансирование

3.1 Регистрационный номер дополнительного госзадания по БРК в информационной системе «Парус» ФАНО России: 0309-2017-0008

3.2 Регистрационный номер дополнительного госзадания по БРК в информационной системе ЦИТИС: АААА-А17-117080410014-1

3.3 Отчет по дополнительному госзаданию № 0309-2017-0008 подготовлен и загружен в систему Парус \_\_\_\_\_

3.4 Отчет по дополнительному госзаданию АААА-А17-117080410014-1 подготовлен и загружен в систему ЦИТИС \_\_\_\_\_

3.5 Объем финансирования, выделенного на выполнение ДГЗ из средств ФАНО России в 2017 году: 2,499 950 млн рублей, Соглашение № 007-03-374/1 от 08.11.2017

### 4 Результаты, полученные в рамках дополнительного государственного задания

4.1 Подготовка технологического паспорта «Коллекции экстремофильных микроорганизмов и типовых культур» ИХБФМ СО РАН

Технологический паспорт КЭМТК ИХБФМ СО РАН включает в себя: а) описание полного набора ключевых СОПов, обеспечивающих поддержание и развитие коллекционного фонда; б) Научно-техническое обоснование смет стандартных операционных процедур коллекции КЭМТК ИХБФМ СО РАН. Технологический паспорт размещен на интернет-сайте коллекции КЭМТК ИХБФМ СО РАН ([http://www.niboch.nsc.ru/doku.php/emtc\\_collection](http://www.niboch.nsc.ru/doku.php/emtc_collection)). СОПы находятся в Приложениях 2–7  
Ниже приведены их названия:

- Приложение 2. Стандартная операционная процедура «СОП № ЛММБ 2-3-2017-09. Получение чистой культуры микроорганизма из образца».
- Приложение 3. Стандартная операционная процедура «СОП № ЛММБ 2-4-2017-09. Идентификация таксономической принадлежности бактериального изолята по нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК».
- Приложение 4. Стандартная операционная процедура «СОП № ЛММБ 2-5-2017-09. Характеризация антибиотикоустойчивости бактериального изолята методом диско-диффузионного анализа».
- Приложение 5. Стандартная операционная процедура «СОП № ЛММБ 2-6-2017-09. Идентификация таксономической принадлежности изолята грибов по нуклеотидным последовательностям межгенных спейсеров ITS и NS».
- Приложение 6. Стандартная операционная процедура «СОП № ЛММБ 2-7-2017-09. Идентификация бактериального штамма по биохимическим свойствам с использованием анализатора GenIII OmniLog».
- Приложение 7. Стандартная операционная процедура «СОП № ЛММБ 2-8-2017-09. Проверка жизнеспособности депонированной культуры микроорганизма из Коллекции ЭМТК».

Для обоснования смет стандартных операционных процедур и расчета общей стоимости работ, обеспечивающих развитие и поддержание Коллекции ЭМТК ИХБФМ СО РАН, были собраны данные об оплате труда, приобретении материалов, расходах на содержание оборудования, коммунальных и иных затратах, необходимых для выполнения работ по перечисленным ниже направлениям деятельности коллекции:

- 1) Выполнение стандартных операционных процедур (СОП).
- 2) Выполнение научно-исследовательских работ.
- 3) Общее содержание коллекции.

Собранные данные были использованы для расчета стоимости выполнения 5 СОП, величины накладных расходов на содержание коллекции и необходимого годового объема финансирования. Пример расчета стоимости СОП приведен в таблице 1.

Расчеты проводились в соответствии моделью и методикой оценки, разработанными ИЦиГ СО РАН в рамках выполнения дополнительного государственного задания по теме: «Разработка модели финансового управления сохранением и рациональным использованием биоресурсов в рамках функционирования биоресурсных научных коллекций» (ССЫЛКА НА ОТЧЕТ).

Таблица 1 - Расчет стоимости СОП № ЛММБ 2-6-2017-09 «Идентификация таксономической принадлежности изолята грибов по нуклеотидным последовательностям межгенных спейсеров ITS и NS» в отношении одной единицы хранения

№	Тип затрат	Сумма
1	Оплата труда	3204,62
2	Приобретение материалов	4201,33
3	Иные затраты	-
4	Затраты на содержание оборудования	1059,11
	Итого:	8465,07

Итоговый объем требуемого годового финансирования коллекции рассчитан на основе предполагаемого плана работ и составил 2 499 950 руб., из которых 1 871 150 руб. запланированы для выполнения работ по содержанию и развитию коллекции, 628 800 руб. запланированы для обеспечения накладных расходов на работу коллекции.

#### 4.2 Экспериментальная верификация СОПов

Экспериментальная верификация СОПов проводилась в два этапа:

На первом этапе была проведена экспериментальная верификация СОП № ЛММБ 2-3-2017-09. «Получение чистой культуры микроорганизма из образца», СОП № ЛММБ 2-4-2017-09 «Идентификация таксономической принадлежности бактериального изолята по нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК». СОП № ЛММБ 2-5-2017-09 «Характеризация антибиотикоустойчивости бактериального изолята методом диско-диффузионного анализа». Каждая из СОП была верифицирована на 30 штаммах микроорганизмов, ранее депонированных в КЭМТК ИХБФМ (таблица 2).

Таблица 2 – Штаммы, использованные для первого этапа верификации СОП

№	СОП № ЛММБ 2-3-2017-09		СОП № ЛММБ 2-4-2017-09		СОП № ЛММБ 2-5-2017-09	
	№ образца	Видовое название штамма	№ образца	Видовое название штамма*	№ образца	Видовое название штамма*
1	3047	<i>Escherichia/Shigella</i>	1693	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , ATCC 27853	1693	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , ATCC 27853
2	3048	<i>Escherichia/Shigella</i>	1694	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	1694	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
3	3049	<i>Staphylococcus aureus</i>	1720	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933	1721	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300
4	3051	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1721	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	1722	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213
5	3052	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1722	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	922	<i>Proteus mirabilis</i>
6	3053	<i>Escherichia/Shigella</i>	1844	<i>Salmonella enterica</i> ATCC 14028	628	<i>Staphylococcus aureus</i>

Продолжение таблицы 2

7	3057	<i>Bifidobacterium longum</i>	1891	<i>Citrobacter braakii</i> <b>ATCC 10625</b>	675	<i>Staphylococcus aureus</i>
8	3058	<i>Exiguobacterium acetylicum</i>	2089	<i>Aeromonas hydrophila</i>	700	<i>Staphylococcus haemolyticus/hominis</i>
9	3059	<i>Bifidobacterium bifido</i>	2091	<i>Bacillus stratosphericus/aerius</i>	821	<i>Proteus mirabilis</i>
10	3061	<i>Staphylococcus aureus</i>	2092	<i>Exiguobacterium acetylicum</i>	1157	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
11	3062	<i>Enterococcus faecalis</i>	2093	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1726	<i>Proteus mirabilis</i>
12	3063	<i>Enterococcus faecalis</i>	2094	<i>Aeromonas hydrophila</i>	1830	<i>Acinetobacter calcoaceticus/oleivorans</i>
13	3064	<i>Staphylococcus aureus</i>	2095	<i>Bacillus cereus</i>	1831	<i>Acinetobacter baumannii</i>
14	3065	<i>Escherichia/Shigella</i>	2096	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1859	<i>Acinetobacter calcoaceticus/baumannii</i>
15	3066	<i>Enterococcus faecalis</i>	2097	<i>Vibrio alginolyticus</i>	2028	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
16	3067	<i>Enterococcus gallinarum</i>	2098	<i>Vibrio alginolyticus/parahaemolyticus</i>	2030	<i>Acinetobacter baumannii</i>
17	3068	<i>Enterococcus raffinosus</i>	2099	<i>Vibrio alginolyticus/parahaemolyticus</i>	2678	<i>Escherichia/Shigella</i>
18	3069	<i>Enterococcus faecalis</i>	2100	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	2710	<i>Escherichia/Shigella</i>
19	3070	<i>Enterococcus faecium</i>	2103	<i>Enterococcus faecalis</i>	2725	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
20	3071	<i>Escherichia/Shigella</i>	2104	<i>Citrobacter freundii/braakii</i>	2729	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
21	3072	<i>Staphylococcus aureus</i>	2387	<i>Enterobacter hormaechei/xiangfangensis</i>	2746	<i>Pseudomonas putida</i>
22	3073	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2388	<i>Acinetobacter tjernbergiae</i>	2759	<i>Proteus mirabilis</i>
23	3074	<i>Providencia rettgeri</i>	2389	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2887	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
24	3075	<i>Serratia marcescens</i>	2390	<i>Fichtibacillus barbaricus/phosphorivorans</i>	2888	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
25	3076	<i>Escherichia/Shigella</i>	2395	<i>Aeromonas caviae/hydrophila</i>	2890	<i>Enterobacter aerogenes</i>
26	3077	<i>Enterococcus faecium/E. hirae</i>	2798	<i>Serratia marcescens</i>	2911	<i>Enterobacter hormaechei/S. enterica</i>
27	3078	<i>Enterococcus faecium</i>	2799	<i>Enterococcus faecalis</i>	2926	<i>Proteus mirabilis</i>
28	3079	<i>Enterococcus faecium</i>	2800	<i>Enterobacter hormaechei</i>	2928	<i>Enterobacter xiangfangensis/E. hormaechei</i>
29	3080	<i>Enterococcus durans</i>	2801	<i>Enterobacter hormaechei</i>	2944	<i>Staphylococcus schleiferi</i>
30	3081	<i>Enterococcus hirae</i>	2802	<i>Enterobacter hormaechei</i>	2680	<i>Proteus mirabilis</i>

Примечание — \*жирным шрифтом выделены штаммы АТСС, использованные для верификации СОП № ЛММБ 2-4-2017-09 «Идентификация таксономической принадлежности бактериального изолята по нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК» и СОП № ЛММБ 2-5-2017-09 «Характеризация антибиотикоустойчивости бактериального изолята методом диско-диффузионного анализа»

Результаты первого этапа верификации СОП были занесены в электронную базу данных КЭМТК ИХБФМ СО РАН.

На втором этапе проводилась верификация СОП № ЛММБ 2-6-2017-09 «Идентификация таксономической принадлежности изолята грибов по нуклеотидным последовательностям межгенных спейсеров ITS и NS», и СОП № ЛММБ 2-7-2017-09 «Идентификация бактериального штамма по биохимическим свойствам с использованием анализатора GenIII OmniLog». Каждая из СОП была верифицирована на 30 штаммах микроорганизмов, ранее депонированных в КЭМТК ИХБФМ (таблица 3).

Таблица 3 - Штаммы, использованные для второго этапа верификации СОП

№	СОП № ЛММБ 2-6-2017-09		СОП № ЛММБ 2-7-2017-09	
	№ КЭМТК	Видовое название штамма*	№ КЭМТК	Видовое название штамма*
1	2991	<i>Candida albicans ATCC 10231</i>	1693	<i>Pseudomonas aeruginosa, ATCC27853</i>
2	2992	<i>Aspergillus flavus var. Flavus ATCC 16883</i>	1694	<i>Staphylococcus aureus ATCC 25923</i>
3	1931	<i>Geomyces sp./destructans</i>	1720	<i>Proteus mirabilis ATCC 25933</i>
4	1937	<i>Ascomycota /Cladosporium bruhnei</i>	1721	<i>Staphylococcus aureus ATCC 43300</i>
5	1929	<i>Aspergillus fumigatus</i>	1722	<i>Staphylococcus aureu ATCC 29213</i>
6	1550	<i>Candida albicans</i>	1844	<i>Salmonella enterica ATCC 14028</i>
7	2418	<i>Candida albicans</i>	1891	<i>Citrobacter braakiiATCC 10625</i>
8	2556	<i>Candida albicans</i>	1244	<i>Proteus penneri</i>
9	2557	<i>Candida albicans</i>	1247	<i>Staphylococcus aureus</i>
10	2311	<i>Candida albicans</i>	1588	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>
11	2563	<i>Candida glabrata</i>	1623	<i>Staphylococcus aureus</i>
12	2529	<i>Candida parapsilosis</i>	1628	<i>Stenotrophomonas acidominiphila</i>
13	2555	<i>Candida parapsilosis</i>	1640	<i>Staphylococcus aureus</i>
14	2385	<i>Candida tropicalis</i>	2164	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>
15	2393	<i>Candida tropicalis</i>	2180	<i>Rothia dentocariosa/mucilaginoso</i>
16	1932	<i>Cladosporium langeranii/bruhnei</i>	2182	<i>Rothia dentocariosa/mucilaginoso</i>
17	1627	<i>Clavispora lusitaniae</i>	2196	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>
18	1938	<i>Cryptococcus albidus/sp.</i>	2197	<i>Escherichia coli</i>
19	1515	<i>Cystofilobasidium infirmominiatum</i>	2200	<i>Lactobacillus fructivorans</i>
20	2471	<i>Debaryomyces hansenii</i>	2203	<i>Bacillus safensis/pumilus</i>
21	1935	<i>Geomyces sp.</i>	2204	<i>Staphylococcus aureus</i>

Продолжение таблицы 3

22	1512	<i>Guehomyces pullulans/Trichosporon pullilans</i>	2207	<i>Lactobacillus fructivorans</i>
23	1549	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	2208	<i>Staphylococcus aureus</i>
24	1933	<i>Penicillium polonicum</i>	2209	<i>Streptococcus bovis</i>
25	1936	<i>Penicillium solitum/sp.</i>	2210	<i>Escherichia coli</i>
26	1934	<i>Penicillium sp.</i>	2211	<i>Escherichia coli</i>
27	1928	<i>Penicillium aurantiogriseum/camemberti</i>	2213	<i>Lactococcus lactis</i>
28	1246	<i>Pichia guilliermondii</i>	2214	<i>Enterococcus hirae/mundtii</i>
29	1927	<i>Trichoderma sp./Hypocrea sp.</i>	2215	<i>Bacillus nealsonii</i>
30	1930	<i>Umbelopsis sp./isabellina</i>	2216	<i>Paenibacillus graminis</i>

Примечание - \*курсивом отмечены штаммы АТСС, использованные для верификации СОП № ЛММБ 2-6-2017-09 «Идентификация таксономической принадлежности изолята грибов по нуклеотидным последовательностям межгенных спейсеров ITS и NS» и СОП № ЛММБ 2-7-2017-09 «Идентификация бактериального штамма по биохимическим свойствам с использованием анализатора GenIII OmniLog»

Результаты второго этапа верификации СОП были занесены в электронную базу данных КЭМТК ИХБФМ СО РАН.

4.3 Согласно плану проекта были выделены и охарактеризованы согласно СОП № ЛММБ 2-3-2017-09 и СОП № ЛММБ 2-4-2017-09 33 штамма экстремофильных бактерий из образцов соленых озер Новосибирской области (таблица 4). Результаты внесены в электронную базу данных КЭМТК ИХБФМ СО РАН.

Таблица 4 - Штаммы микроорганизмов, депонированные в КЭМТК согласно СОП № ЛММБ 2-3-2017-09 и СОП № ЛММБ 2-4-2017-09

№ п/п	№ образца	Видовое название штамма*
1	3113	<i>Oceanimonas smirnovii/doudoroffii</i>
2	3114	<i>Halomonas alkaliphila/venusta</i>
3	3115	<i>Citrobacter freundii/braakii</i>
4	3116	<i>Aeromonas jandaei/veronii</i>
5	3118	<i>Pseudomonas alcaliphila/pseudoalcaligenes</i>
6	3121	<i>Aeromonas veronii/jandaei</i>
7	3122	<i>Pseudomonas alcaliphila/pseudoalcaligenes</i>
8	3123	<i>Planococcus maritimusdongaensis</i>
9	3124	<i>Halobacillus trueperi/profundi</i>
10	3125	<i>Halobacillus litoralis</i>
11	3126	<i>Halomonas alkaliphila/meridiana</i>

Продолжение таблицы 4

12	3127	<i>Halomonas yemusta/alcaliphila</i>
13	3128	<i>Halomonas boliviensis/neptunia</i>
14	3129	<i>Streptomyces flavogrisens</i>
15	3130	<i>Mycoplana bullata/Brevindimonas subvibrioides</i>
16	3131	<i>Idiomarina loihiensis/ramblicola</i>
17	3132	<i>Jonesia quinghaiensis</i>
18	3133	<i>Oceanobacillus picturae</i>
19	3134	<i>Halomonas janggokensis/gomseomensis</i>
20	3135	<i>Halomonas sulfidaeris/variabilis</i>
21	3136	<i>Arthrobacter agilis</i>
22	3137	<i>Agrococcus jenensis</i>
23	3138	<i>Idiomarina loihiensis/ramblicola</i>
24	3139	<i>Halomonas janggokensis/gomseomensis</i>
25	3107	<i>Salinivibrio proteolyticus/costicola</i>
26	3108	<i>Halomonas alimentaria/shenglinsis</i>
27	3109	<i>Lysinibacillus fusiformis/sphaericus</i>
28	3110	<i>Aeromonas veronii/jandaei</i>
29	3111	<i>Aeromonas bestiarum/salmonicida</i>
30	3112	<i>Vibrio rotiferianus/natriegens</i>
31	3117	<i>Virgibacillus halodenitrificans/salaricus</i>
32	3119	<i>Bacillus stratosphericus/aerophilus</i>
33	3120	<i>Pseudomonas monteilii/plecoglossicida</i>
Примечание – *идентификация штамма до рода/вида проводилась с использованием СОП № ЛММБ 2-4-2017-09		

4.4 В соответствии с дополнительным государственным заданием была проведена комплексная инвентаризация уже имеющихся в коллекции штаммов прокариот, которая включала проверку жизнеспособности и соответствия исходным депонированным культурам по морфологическим, физиологическим и молекулярно-генетическим характеристикам (таблица 5).



Таблица 5 - Результаты комплексной инвентаризации штаммов микроорганизмов, ранее депонированных в КЭМТК

№ п/п	№ образца	Видовое название штамма	Проверка жизнеспособности (+ штамм жизнеспособен; -штамм нежизнеспособен)	Соответствие морфологическим и физиологическим характеристикам исходно депонированного штамма	Соответствие молекулярно-генетическим характеристикам исходно депонированного штамма
1	34	<i>Candida albicans</i>	+	+	+
2	86	<i>Enterobacter ludwigii</i>	+	+	+
3	87	<i>Enterobacter ludwigii/Pantoea agglomerans</i>	+	+	+
4	134	<i>Achromobacter xylooxidans/spanius</i>	+	+	+
5	246	<i>Lactobacillus plantarum/pentosis</i>	+	+	+
6	248	<i>Lactobacillus plantarum/pentosis</i>	+	+	+
7	249	<i>Lactobacillus gallinarum/helveticus</i>	+	+	+
8	253	<i>Acinetobacter junii</i>	+	+	+
9	356	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+
10	656	<i>Geobacillus (Aeribacillus) pallidus</i>	+	+	+
11	669	<i>Pseudomonas otitidis/aeruginosa</i>	+	+	+
12	670	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	+
13	682	<i>Yersinia intermedia/aldovae</i>	+	+	+
14	753	<i>Bacillus thuringiensis</i>	+	+	+
15	754	<i>Halomonas alkaliphila</i>	+	+	+
16	756	<i>Paenibacillus lautus</i>	+	+	+
17	757	<i>Psychrobacter fulvigenes</i>	+	+	+
18	759	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	+	+	+
19	760	<i>Planococcus maritimus</i>	+	+	+
20	762	<i>Bacillus safensis</i>	+	+	+
21	766	<i>Exiguobacterium mexicanum/aurantiacum</i>	+	+	+
22	768	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	+	+	+
23	770	<i>Salinivibrio costicola/proteolyticus</i>	+	+	+
24	771	<i>Halobacillus profundii/litoralis</i>	+	+	+
25	772	<i>Bacillus thuringiensis</i>	+	+	+
26	773	<i>Salinivibrio costicola/proteolyticus</i>	+	+	+
27	774	<i>Exiguobacterium mexicanum/aurantiacum</i>	+	+	+
28	775	<i>Bacillus safensis</i>	+	+	+
29	777	<i>Bacillus thuringiensis</i>	+	+	+

Продолжение таблицы 5

30	779	<i>Bacillus hwajinpoensis/algicola</i>	+	+	+
31	780	<i>Parococcus carotinifaciens/marcusii</i>	+	+	+
32	784	<i>Virgibacillus salarius/marismortui</i>	+	+	+
33	786	<i>Halobacillus profundilitoralis</i>	+	+	+
34	787	<i>Halobacillus profundilitoralis</i>	+	+	+
35	788	<i>Bacillus thuringiensis</i>	+	+	+
36	789	<i>Bacillus megaterium/flexus</i>	+	+	+
37	790	<i>Paenibacillus lautus</i>	+	+	+
38	791	<i>Bacillus aerophilus</i>	+	+	+
39	793	<i>Virgibacillus salarius/marismortui</i>	+	+	+
40	796	<i>Halomonas ventosae/fantilapidosi</i>	+	+	+
41	860	<i>Pseudomonas deceptionensis</i>	+	+	+
42	922	<i>Proteus mirabilis</i>	+	+	+
43	1106	<i>Pseudomonas xanthomarina/stutzeri</i>			
44	1110	<i>Kocuria camiphila/rhizophila</i>	+	+	+
45	1114	<i>Planococcus maitriensis/maritimus</i>	+	+	+
46	1115	<i>Pseudomonas putida/asplenii</i>	+	+	+
47	1124	<i>Pseudomonas koreensis/reinekei</i>	+	+	+
48	1125	<i>Pseudomonas otitidis/aeruginosa</i>	+	+	+
49	1126	<i>Sphingomonas faeni/aurantiaca</i>	+	+	+
50	1246	<i>Pichia guilliermondii</i>	+	+	+

Результаты комплексной инвентаризации занесены в электронную базу данных КЭМТК ИХБФМ СО РАН.

#### 4.5 Подготовка статей в рецензируемых журналах

В соответствии с дополнительным государственным заданием на основе материалов коллекции подготовлены две рукописи статей в рецензируемых журналах (Scopus, WoS) на основе материалов коллекции:

1) Ю.Н. Козлова, Н.В. Фоменко, В.В. Морозова, И.В. Саранина, А.Ю. Тикунов, Д.А. Ганичев, А.Г. Самохин, В.В. Павлов, О.М. Рожнова, И.А. Бондарь, Е.В. Зенкова, В.В. Нимаев В.В. Климонтов, Н.В. Тикунова. Идентификация стафилококков, включая

метициллинрезистентные штаммы, биохимическими и генетическими методами. Вавиловский журнал генетики и селекции, 2017;21(8):952-958, DOI 10.18699/VJ17.318. (Опубликована).

2) A.L. Matveev, V.B. Krylov, L.A. Emelyanova, A.S. Solovev, Ya. Khlusevich, I. Baykov, T. Fontaine, J-P. Latgé, N.V. Tikunova, N.E. Nifantiev. Novel mouse monoclonal antibodies specifically recognize *Aspergillus fumigatus* galactomannan. PLOSone (WoS) – принята в печать.

Важно отметить, что вторая публикация отражает результаты совместных исследований в рамках международного сотрудничества с Институтом Пастера (Unité des *Aspergillus*, Institut Pasteur, Paris, France), а также междисциплинарного сотрудничества с Институтом органической химии им. Зелинского, Москва.

#### 4.6 Подготовка календарного плана работ

Подготовлен календарный план работ по выполнению дополнительного государственного задания:

- Создание Технологического паспорта КЭМТК ИХБФМ СО РАН, 30.08.2017;
- Формирование смет и их научно-технического обоснования для стандартных операционных процедур коллекции КЭМТК ИХБФМ СО РАН, 14.09.2017;
- Экспериментальная верификация трех СОПов (первый этап), 28.09.2017;
- Промежуточный отчет о проделанной работе, 29.09.2017;
- Подготовка первой запланированной публикации на основе материалов коллекции и направление в рецензируемые журналы (Scopus, WoS), 10.10.2017;
- Экспериментальная верификация трех СОПов (второй этап), 15.12.2017;
- Пополнение электронного каталога коллекции КЭМТК ИХБФМ СО РАН информацией о 30 штаммах, охарактеризованных согласно перечню СОП КЭМТК ИХБФМ СО РАН., 15.12.2017;
- Комплексная инвентаризация имеющихся в коллекции штаммов прокариот (по морфологическим, физиологическим, молекулярно-генетическим характеристикам), проверка их жизнеспособности (не менее 50 штаммов) с записью информации в электронную базу данных КЭМТК ИХБФМ СО РАН, 15.12.2017;
- Подготовка второй запланированной публикации на основе материалов коллекции и направление в рецензируемые журналы (Scopus, WoS), 20.12.2017;
- Подготовка отчета о проделанной работе в рамках дополнительного государственного задания, 25.12.2017.

4.7 Размещение отчета о проделанной работе в рамках дополнительного государственного задания на интернет-сайте коллекции КЭМТК ИХБФМ СО РАН

Отчет о проделанной работе в рамках дополнительного государственного задания коллекции КЭМТК ИХБФМ СО РАН с указанием ссылки на номер заключенного с ФАНО России соглашения на выполнение дополнительного государственного задания размещен на электронном портале организации: [http://www.niboch.nsc.ru/doku.php/emtc\\_collection](http://www.niboch.nsc.ru/doku.php/emtc_collection). (<http://ckp.icgen.ru/cells/documents/>).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

«Коллекция экстремофильных микроорганизмов и типовых культур, КЭМТК ИХБФМ СО РАН в настоящее время содержит более 3 тысяч различных штаммов микроорганизмов (более 100 тыс. музейных образцов), в том числе микроорганизмы из природных биотопов, включая экстремофильные микроорганизмы, клинические изоляты, изоляты от животных, промышленные штаммы-продуценты. Кроме того, в коллекции содержатся приобретенные в Международной коллекции ATCC референс и типовые штаммы. В рамках работ по данному проекту создан технологический паспорт коллекции, включающий в себя описание полного набора ключевых СОПов и научно-техническое обоснование смет СОПов КЭМТК ИХБФМ СО РАН. Проведена экспериментальная верификация ключевых СОПов. Изолированы новые штаммы и пополнен электронный каталог коллекции, находящийся на Портале биоресурсных коллекций ([http://www.biores.cytogen.ru/brc\\_cells/collections/ICGSBRAS\\_CELLS](http://www.biores.cytogen.ru/brc_cells/collections/ICGSBRAS_CELLS)), проведена инвентаризация части имеющихся образцов. Требуемые документы размещены на интернет-сайте коллекции (<http://ckp.icgen.ru/cells/>). По результатам работы подготовлены публикации в журналы, входящие в базы данных Scopus и WoS.

Таким образом, проведенная в рамках государственного задания работа позволяет решать на базе КЭМТК как прикладные, так и исследовательские задачи и обеспечивать требуемыми образцами не только исследователей из РФ, но и совместные исследования с сотрудниками Института Пастера (Париж, Франция).

Все поставленные задачи выполнены в полном объеме.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1 Thomas S. American Association for Cancer research-report. 2017, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-16-2929.

2 Shreiner A.B., Kao J.Y., Young V.B. The gut microbiome in health and in disease // Curr Opin Gastroenterol. 2015. 31. 69-75, DOI 10.1097/MOG.000000000000139

## ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Библиографический список публикаций, полученных  
в результате выполнения научно-исследовательской работы

1 Козлова Ю.Н., Фоменко Н.В., Морозова В.В., Саранина И.В., Тикунов А.Ю., Ганичев Д.А., Самохин А.Г., Павлов В.В., Рожнова О.М., Бондарь И.А., Зенкова Е.В., Нимаев В.В., Климонтов В.В., Тикунова Н.В. Идентификация стафилококков, включая метициллинрезистентные штаммы, биохимическими и генетическими методами. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017; 21(8):952-958, DOI 10.18699/VJ17.318.

2. Matveev A.L., Krylov V.B., Emelyanova L.A., Solovov A.S., Khlusevich Ya., Baykov I., Fontaine T., Latgé J-P., Tikunova N.V., Nifantiev N.E.. Novel mouse monoclonal antibodies specifically recognize *Aspergillus fumigatus* galactomannan. PLOSone (WoS) – принята в печать.

## Генетическая и биохимическая характеристика стафилококков, встречающихся в Новосибирске

Ю.Н. Козлова<sup>1</sup>, Н.В. Фоменко<sup>2</sup>, В.В. Морозова<sup>3</sup>, Н.В. Сарашина<sup>4</sup>, А.Ю. Тихонов<sup>5</sup>, А.А. Гантман<sup>6</sup>, А.Е. Соловьев<sup>7</sup>,  
В.В. Нелюбов<sup>8</sup>, С.М. Бордюков<sup>9</sup>, И.А. Бондарь<sup>9</sup>, Е.В. Зенкова<sup>9</sup>, В.В. Нинаев<sup>9</sup>, В.В. Камышев<sup>9</sup>, Н.В. Тихонов<sup>10</sup>

<sup>1</sup> Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> АО Вектор-Бест, Новосибирск, Россия

<sup>3</sup> Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

<sup>4</sup> Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. И.И. Шилова, Министерство здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, Россия

<sup>5</sup> Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

<sup>6</sup> Научно-исследовательский институт химической и экспериментальной микробиологии - филиал Федерального государственного научного центра «Вавиловский институт генетики и селекции Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

© 2017

Стафилококки способны поражать практически любые органы и ткани организма человека, вызывая поверхностные и глубокие гнойные инфекции, поражения дыхательных и мочевыводящих путей, а также провоцировать пищевые отравления и интоксикации. В последние годы участились случаи заболеваний, возбудителями которых оказываются коагулазонегативные стафилококки. Такие виды, как *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* и *Staphylococcus hominis* значительно чаще выявляются при внутрибольничных инфекциях. Особую опасность этих патогенов заключает в себе повышенная вирулентность и патогенность штаммов, а также в их частой устойчивости к различным антибиотикам. Особенно трудно поддаются лечению заболевания, вызванные метициллин-резистентными стафилококками. Правильная идентификация стафилококков и их чувствительности к антибиотикам важно для постановки клинического диагноза и назначения адекватной лекарственной терапии. В связи с этим востребованы методы быстрого и точного определения видов стафилококков для оценки их патогенных свойств и наличия метициллин-резистентности. Целью данного исследования – характеристика стафилококков в том числе и по устойчивости к антибиотикам, изолированных в г. Новосибирске из образцов, полученных от людей, животных и окружающей среды. Для анализа проанализированы 100 штаммов стафилококков. Видовая идентификация стафилококков проведена по результатам секвенирования гена 16S рРНК. Выявлено 11 видов стафилококков. Среди штаммов, полученных от больных на стационарах, доминировал *Staphylococcus aureus* (79,1 %). *Staphylococcus epidermidis* составили около 12,5 %. Среди внебольничных штаммов *S. aureus* и *S. epidermidis* выделены примерно в равных соотношениях. Обнаружение коагулазонегативных видов проводили стандартным биохимическим методом и выявлением гена *coiA* методом ПЦР в реальном времени. Для штаммов *S. aureus* выявлено 100% совпадение результатов между наличием гена *coiA* и присутствием коагулазной активности, что свидетельствует о том, что выявление гена *coiA* может служить точным методом идентификации *S. aureus*. Получены высокие уровни совпадения (99,9%) между наличием в клетках стафилококков гена *mecA* и фенотипической устойчивостью к оксациллину. Исследование стафилококков на присутствие гена *mecA* может рассматриваться как альтернатива фенотипическому методу обнаружения метициллин-резистентных штаммов стафилококков.

**Ключевые слова:** *Staphylococcus*; коагулазонегативные стафилококки; метициллин-резистентные стафилококки (MRSE); оксА; *coiA*; диагностика стафилококковой инфекции.

## Genetic and biochemical characterization of staphylococci occurring in Novosibirsk, Russia

Y.N. Kozlova<sup>1</sup>, N.V. Fomenko<sup>2</sup>, V.V. Morozova<sup>3</sup>,  
N.V. Sarashina<sup>4</sup>, A.Yu. Tikhonov<sup>5</sup>, A.A. Gantman<sup>6</sup>,  
A.E. Solov'yev<sup>7</sup>, V.V. Nelyubov<sup>8</sup>, S.M. Bordukov<sup>9</sup>,  
I.A. Bondar<sup>9</sup>, E.V. Zenkova<sup>9</sup>, V.V. Nimaev<sup>9</sup>,  
V.V. Kamyshev<sup>9</sup>, N.V. Tikhonov<sup>10</sup>

<sup>1</sup> Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> Joint Stock Company Vector-Best, Novosibirsk, Russia

<sup>3</sup> Russian Clinical Hospital on the station Novosibirsk-Glavny Novosibirsk, Russia

<sup>4</sup> Novosibirsk Research Institute of Traumatology

and Orthopaedics in A. A. Tsvetan of Ministry of Health of the Russian Federation, Novosibirsk, Russia

<sup>5</sup> Novosibirsk State Medical University of Ministry of Health of the Russian Federation, Novosibirsk, Russia

<sup>6</sup> Scientific Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Branch of Federal Scientific Center Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

Staphylococci are capable of penetrating many human tissues and organs, causing superficial and deep purulent infections, respiratory and urinary tract infections, food poisoning and intoxication. Last years coagulase-negative staphylococci were the cause of infection in many cases. Infectious agents, namely *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus hominis*, were detected more often as nosocomial infections. A particular danger of these infections is a high virulence and pathogenicity of bacterial strains and their resistance to various antibiotics. Methicillin-resistant staphylococci are especially difficult to treat. The correct identification of staphylococci and their sensitivity to antibiotics are important for clinical diagnosis and appointment of adequate drug therapy. Rapid and accurate identification of *Staphylococcus* species and detection of their sensitivity to antibiotics is quite important. The aim of this study was to study staphylococci isolated in Novosibirsk from human, animal and environmental samples. A collection of 100 staphylococcus strains was analyzed. *Staphylococcus aureus* species were identified by sequencing the 16S rRNA gene. Eleven staphylococcus species were identified. Among the strains obtained from hospitalized patients, *Staphylococcus aureus* do-

© 2017, Vavilov Institute of Genetics and Selection  
All rights reserved. This article is published under the Creative Commons Attribution License (CC BY)


 <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Рисунок 1.1 – Первая страница статьи Ю.Н. Козловой и др. Идентификация стафилококков, включая метициллин-резистентные штаммы, биохимическими и генетическими методами.

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017; 21(8):952-958, DOI 10.18699/VJ17.318.



Распространение штаммов MRSA в Российской Федерации существенно различается в зависимости от года, профиля учреждения и региона, при этом данные собраны преимущественно в европейской части страны (Сидоренко и др., 1998; Муравкин и др., 2012; Лю и др., 2012). Опубликованы результаты двух многоцентровых исследований по антирезистентности коагулязным штаммам *S. aureus* в Российской Федерации, включивших в том числе и штаммы, выделенные в стационарах Новосибирска и других городов Сибири (Деханич и др., 2002, 2008). Результаты исследования 2002 г. показали, что штаммы MRSA составили 33,5 % от общего количества *S. aureus*, выделенных в стационарах России. При этом доля MRSA варьировала в различных отделениях стационаров от 0 до 89,5 % и в основном зависела от профиля отделения (Деханич и др., 2002). В работе Деханич и др., 2008 исследована антибиотикорезистентность штаммов *S. aureus* в отделениях реанимации и интенсивной терапии в среднем по России (включая и MRSA) составила 49,9 %, в Новосибирске – 72,1 %. В рамках исследования доля MRSA составила 29 % от общего количества штаммов *S. aureus*, выделенных от госпитализированных пациентов, что позволило сделать вывод о распространении штаммов MRSA в стационарах России (Деханич и др., 2002).

### Заключение

Определена географическая принадлежность 100 штаммов стафилококков, выделенных в Новосибирске от больных и здоровых людей, от животных и в окружающей среде, и показано, что среди штаммов, выделенных от больных из стационаров, доминирует *S. aureus* (79,1 %) и *S. epidermidis* (составили около 12,5 %), стафилококки других видов обнаружены в единичных случаях. Среди выделенных штаммов преобладают виды, и *S. aureus* и *S. epidermidis* встречаются примерно в равных соотношениях. Анализ наличия гена *scnA* в отношении биохимического теста на коагулязную активность, по возможности генотипировать *S. aureus*. Выявлен высокий уровень совпадения между наличием в клетках стафилококка гена *scnA* и фенотипической устойчивостью к оксалимину. Исследование стафилококков на присутствие гена *scnA* можно использовать как альтернативу фенотипическому методу идентификации метициллинрезистентных штаммов стафилококков.

### Благодарности

Исследование поддержано Программой фундаментальных исследований Президиума РАН (проект № 2014-155), штаммы для посева выаны в жито в Коллекции патремофильных микроорганизмов и типовых культур ИХИФМ СО РАН, по государственной проектам 9.309.2017-0018 программы биоресурсных коллекций ФАНО России.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

### Список литературы

- Белый, Т.И., Тихонов Р.М., Шубиных И.И., Божкова С.А., Артюх В.А., Деханич А.О. Анализ устойчивости сапrophytic фауны при паразитарной инвазии. Травматология и ортопедия России. 2014;21(2):22-29.
- Деханич А.В., Шубиных А.А., Байбака Л.Т., Кривошапа О.И., Суворовова М.В., Киселев Р.С. Исследования устойчивости штаммов *S. aureus*, выделенных от пациентов в ОРИТ российских стационаров, к различным антибиотикам. Клиническая микробиология и иммунология. 2008;10(4):333-343.
- Деханич А.В., Шубиных И.А., Баранова А.Д., Афанасов Е.Г., Деметра Н.И., Кривошапа О.И. Биохимическая идентификация коагулязных штаммов *Staphylococcus aureus* в России: результаты многоцентрового исследования. Клиническая микробиология и иммунология. 2012;4(4):328-337.
- Карпов И.А., Киселев Р.С. Выделенные штаммы и биохимическая метициллинрезистентная стафилококка (MRSA) по геному стафилококковой группы. Медицинское наследие. 2008;10:28-32.
- Лебедев И.И. Русские штаммы стрептококков по метициллин-стойкости микробиоты. М., Медицина, 1973.
- Муравкин И.И., Лукин М.И., Слободкин Н.О., Биласкин А.Л., Матвеевич А.И., Гусева М.М., Хитов А.А. Результаты многоцентрового исследования устойчивости стафилококка к антибиотикам в тяжелых формах гнойного гонорейи в условиях больницы. Вестник дерматологии и венерологии. 2012;1:66-74.
- Нарыков А.И., Татаров М.А., Вихарук Д.М., Бальсевич И.И. Препараты по микробиологии. М., Академик, 2005.
- Сидоренко С.В., Ревин С.П., Сидоричев С.А., Кривошапа О.А., Старкова Г.В. Результаты многоцентрового исследования устойчивости стафилококков к антибиотикам в Москве и Санкт-Петербурге. Антибиотики и химиотерапия. 1998;7:18-25.
- Сидоренко С.В., Ганкин В.И. Метилциклины: основы генетики устойчивости к антибиотикам. Учен. зап. КнГУ. 2004;44:263-306.
- Чернин В.И., Катасонов А.И., Ковалева И.В. Антибиотикорезистентность: справочник методов критических состояний. Москва. ИЦ «Академик», 2010.
- Bond R., Coeffer A. What's happened to *Staphylococcus intermedius*? Taxonomic revision and emergence of methicillin resistance. J. Small Anim. Pract. 2012;53(5):147-154. DOI: 10.1111/j.1748-5827.2011.01105.x
- Dworkin M. The Genera *Staphylococcus* and *Micrococcus*. The Prokaryotes. N. Y.: Springer, USA, 2006:5-75.
- Golebiewska B., Layer T., König W., König B. Genetic classification and distinguishing of *Staphylococcus* species based on different partial *gpr*, *16S rRNA*, *ispA*, *spcB*, *sodA*, and *ndf* gene sequences. J. Clin. Microbiol. 2008;46(5):1019-1025.
- Götz F., Brannen T., Scheller K-H. The genera *Staphylococcus* and *Micrococcus*. The Prokaryotes. N. Y.: Springer, 2006.
- Mahajan M., Martinko J. Brock Biology of Microorganisms. N. Y.: Prentice-Hall, 2005.
- Stevens D.M., Ricks B., Edwards J.R., Schneider A., Patel J., Shivakumar A., Kallen A., Lumbag B., Fadlun S. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections – summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009-2010. Infect. Control Hosp. Epidemiol. 2013;34(1):1-14. DOI: 10.1017/S0950268812000770.
- Wang Y., Qian F.Y. Conserved fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. PLoS One. 2009;4(10):e7401. DOI: 10.1371/journal.pone.007401

Рисунок 1.2 - Страница с указанием источника финансирования статьи Ю.Н. Козловой и др. Идентификация стафилококков, включая метициллинрезистентные штаммы, биохимическими и генетическими методами. Вавиловский журнал генетики и селекции, 2017; 21(8):952-958, DOI 10.18699/VJ17.318.

# PLOS ONE

## Novel mouse monoclonal antibodies specifically recognize *Aspergillus fumigatus* galactomannan --Manuscript Draft--

**Manuscript Number:**

**Article Type:** Research Article

**Full Title:** Novel mouse monoclonal antibodies specifically recognize *Aspergillus fumigatus* galactomannan

**Short Title:** mAbs to *Aspergillus fumigatus* galactomannan

**Corresponding Author:** Nikolay E. Nifantiev, Professor  
N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences  
Moscow, RUSSIAN FEDERATION

**Keywords:** galactomannan, *Aspergillus fumigatus*, monoclonal antibody, glycoarray, glycobiology

**Abstract:** A panel of specific monoclonal antibodies (mAbs) against synthetic pentasaccharide  $\beta$ -D-Galp-(1-5)-[ $\beta$ -D-Galp-(1-5)] $\beta$ -D-Manp, structurally related to *Aspergillus fumigatus* galactomannan, was generated using mice immunization with synthetic pentasaccharide-BSA conjugate and by hybridoma technology. Two selected mAbs, 7B8 and 8G4, could bind to the parent pentasaccharide with affinity constants of approximately 5.3 nM and 6.4 nM, respectively, based on surface plasmon resonance biosensor assay. The glycoarray, built from a series of synthetic oligosaccharide derivatives representing different galactomannan fragments, demonstrated that the minimal oligosaccharide effectively recognized by mAb 8G4 is parent pentasaccharide while mAb 7B8 recognizes its constituting oligosaccharide parts. Immunofluorescence studies showed that both 7B8 and 8G4 could stain *A. fumigatus* cells in culture efficiently, but not the mutant strain lacking galactomannan. In addition, confocal microscopy demonstrated that *Candida albicans*, *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus plantarum*, and numerous gram-positive and gram-negative bacteria were not labeled by mAbs 7B8 and 8G4. The generated mAbs can be considered as promising components for the development of a new specific enzyme-linked assay for the detection of *A. fumigatus*, which is highly demanded for medical and environmental controls.

**Order of Authors:** Andrey L. Matveev  
Vadim B. Kuylov  
Ljudmila A. Emelyanova  
Arsenii S. Soloviev  
Yana F. Khusevich  
Ivan Baykov  
Thierry Fontaine  
Jean-Paul Latge  
Nina V. Titunova  
Nikolay E. Nifantiev, Professor

**Opposed Reviewers:**

**Additional Information:**

**Question** **Response**

**Financial Disclosure** Synthesis of biotinylated oligosaccharids and of BSA-based glycoconjugate, and assaying of antibodies on glycoarray were supported by Russian Science Foundation (<http://rsf.ru>, grant 14-23-00199 to N. E. Nifantiev); development of mouse mAbs, SPR-study, and confocal microscopy were supported by Russian Science Foundation

Published online: August 14, 2015  
DOI: 10.1371/journal.pone.0134401

Рисунок 1.3 – Первая страница статьи Matveev A.L. et al. Novel mouse monoclonal antibodies specifically recognize *Aspergillus fumigatus* galactomannan, отправленная в журнал PLOSone (WoS) и принятая в печать.

Please describe all sources of funding that have supported your work. This information is required for submission and will be published with your article, should it be accepted. A complete funding statement should do the following:

Include grant numbers and the URLs of any funder's website. Use the full name, not acronyms, of funding institutions, and use initials to identify authors who received the funding.

Describe the role of any sponsors or funders in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. If the funders had no role in any of the above, include this sentence at the end of your statement: "The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript."

However, if the study was unfunded, please provide a statement that clearly indicates this, for example, "The authors received no specific funding for this work."

(<http://iscl.ru>, grant 16-14-00063 to N.V. Titunova); microorganisms used in this work were provided by the Collection of Extremophile Microorganisms and Type Cultures (developed within Project 0309-2017-0008 granted by the Russian Federal Agency of Scientific Organizations (<http://fano.gov.ru/>); study of the recognition of cell cultures by monoclonal antibodies was supported by The French National Research Agency (<http://www.agence-nationale-recherche.fr/en/>), provided support to J.-P. Latgé; there is no grant number).

**Competing Interests**

The authors have declared that no competing interests exist.

You are responsible for recognizing and disclosing on behalf of all authors any competing interest that could be perceived to bias their work, acknowledging all financial support and any other relevant financial or non-financial competing interests.

Do any authors of this manuscript have competing interests (as described in the [PLOS Policy on Declaration and Evaluation of Competing Interests](#))?

If yes, please provide details about any and all competing interests in the box below. Your response should begin with this statement: "I have read the journal's policy and the authors of this manuscript have the following competing interests:"

If no authors have any competing interests to declare, please enter this statement in the box: "The authors have

Journal of International Management & Information Technology, Volume 14(1), Winter 2018

Рисунок 1.4 – Страница статьи Matveev A.L. et al. Novel mouse monoclonal antibodies specifically recognize *Aspergillus fumigatus* galactomannan, содержащая ссылку на поддержку проектом 0309-2017-0008 программы биоресурсных коллекций.

Tema: PLOS ONE Decision: Revision required [PONE-D-17-40706] -  
[EMID:18974da14309c74d]  
От: "PLOS ONE" <em@editorialmanager.com>  
Дата: Чтв, 21 Декабрь 2017 11:47  
Кому: "Nikolay E. Nifantiev" <nen@ioc.ac.ru>

---

PONE-D-17-40706  
Novel mouse monoclonal antibodies specifically recognize *Aspergillus*  
*fumigatus* galactomannan  
PLOS ONE

Dear Professor Nifantiev,

Thank you for submitting your manuscript to PLOS ONE. After careful consideration, we feel that it has merit but does not fully meet PLOS ONE's publication criteria as it currently stands. Therefore, we invite you to submit a revised version of the manuscript that addresses the points raised during the review process.

=====  
Please pay particular attention to the specificity of the new mAb in your revision, as both reviewers had concerns here (Reviewer #1, point #4 and Reviewer #2, point #2). Additionally, make sure the animal usage section is accurate (Reviewer #1, point #5).  
=====

We would appreciate receiving your revised manuscript by Feb 04 2018 11:59PM, when you are ready to submit your revision, log on to <http://pone.edmgr.com/> and select the Submissions Needing Revision folder to locate your manuscript file.

If you would like to make changes to your financial disclosure, please include your updated statement in your cover letter.

To enhance the reproducibility of your results, we recommend that if applicable you deposit your laboratory protocols in [protocols.io](http://protocols.io), where a protocol can be assigned its own identifier (DOI) such that it can be cited independently in the future. For instructions see: <http://journals.plos.org/plosone/s/submitting-guidelines#loc-laboratory-protocols>

Please include the following items when submitting your revised manuscript: A rebuttal letter that responds to each point raised by the academic editor and reviewer(s). This letter should be uploaded as separate file and labeled Response to Reviewers. A marked-up copy of your manuscript that highlights changes made to the original version. This file should be uploaded as separate file and labeled Revised Manuscript with Track Changes. An unmarked version of your revised paper without tracked changes. This file should be uploaded as separate file and labeled Manuscript. We look forward to receiving your revised manuscript.

Kind regards,

Joshua J. Obar  
Academic Editor  
PLOS ONE

Рисунок 1.5 – Страница письма из редакции PLOSone о приеме к публикации с исправлениями статьи Matveev A.L. et al. Novel mouse monoclonal antibodies specifically recognize *Aspergillus fumigatus* galactomannan.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2  
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.

2 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.

3 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.

4 Пересмотр:

Данная СОП вводится впервые.

# 1 Материалы и оборудование

## 1.1 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

Наименование основных реактивов и материалов	НТД, производитель, страна
Бактериологическая петля пластиковая одноразовая	Citotest, Китай
Газогенерирующие пакеты, 3,5 л	Oxoid, Великобритания
Флаконы градуированные с завинчивающейся крышкой, 500 мл	Isolab, Германия
Спиртовка лабораторная	ГОСТ 23932-90Е
Пробирки с закручивающимися крышками, 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	Vochem, Германия

### *1.2 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

### *1.3 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

## 2 Помещения

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

## 3 Процедура

### 3.2 *Подготовительный этап*

#### 3.1.1 *Подготовка персонала к проведению работ*

– надеть медицинский халат и перчатки

#### 3.1.2 *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;

#### 3.1.3 *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.

#### 3.1.4 *Приготовление 70% раствора этилового спирта*

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

#### 3.1.5 *Приготовление LB-среды для хранения культур*

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

– автоклавировать при 121°C в течение 15 мин;

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

– 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°C 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)°C в течение 18 – 24 ч для выявления случайной контаминации.

### *3.1.6 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°C в течение 15 мин.

### *3.1.7 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.

## *3.2 Основной этап*

### *3.2.1 Первичная микроскопия*

#### *3.2.1.1 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.

#### *3.2.1.2 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 дистиллированной 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.

### *3.2.2 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 2.1);

– 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;

Таблица 2.1 – 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

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

– для выявления термотолерантных и термофильных природных микроорганизмов чашки Петри инкубировать при 45, 60 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 анаэроостате и инкубируют до 72 часов.

### 3.2.3 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  $(36\pm 1)^\circ\text{C}$  в течение 18–24 ч.;
- микроскопировать мазки из чистой культуры. При выявлении смешанной культуры данный этап повторяют.

#### *3.2.4 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 крышечкой и резиновой прокладкой для того, чтобы избежать вымораживания;
- перемешать на вортексе и поместить три пробирки на хранение при температуре  $-20^\circ\text{C}$ , три на хранение при температуре  $-70^\circ\text{C}$ ;

#### *3.3 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.

#### 4 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(2x15-01) «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.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 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.
- 2 Донецкая Э. Г.-А. Клиническая микробиология: Руководство для специалистов клинической лабораторной диагностики. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. – 480 с.
- 3 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.
- 4 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

## ПРИЛОЖЕНИЕ 3

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.

### 2 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.

### 3 Термины и определения

СОП – стандартная операционная процедура;

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

Секвенирование – определение последовательности ДНК;

ТАЕ – трис-ацетатный буфер.

### 4 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

Наименование основных реактивов и материалов	ГОСТ, ОСТ, страна
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, США
ДНК-буфер	Thermo Fisher Scientific, США
Прямой праймер, 8F 5'-AGRGTTCGATCCTGGCTCA-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 электрофореза	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 <sup>®</sup> Terminator v3.1 Sequencing Kit	Applied Biosystems, США
Полипропиленовые пробирки, 50 мл	Falcon, США
Реагент-растворитель Hi-Di Formamide	Applied Biosystems, США
Планшет для нанесения продуктов реакции Сэнгера	Applied Biosystems, США
Септа для планшетов	Applied Biosystems, США
Септа для анодного буфера	Applied Biosystems, США



Наименование основных реактивов и материалов	ГОСТ, ОСТ, страна
Полимер POP-7	Appied Biosystems. США
Катодный буфер	Appied Biosystems. США
Анодный буфер	Appied Biosystems. США
Реактив для очистки помпы автоматического секвенатора	Appied Biosystems, США
Капиллярный блок для автоматического секвенатора 3500 Genetic Analyzer	Appied Biosystems. США
Колонки Centrisep Spin Columns	Princeton Separations Inc., США
Сорбент Sephadex G-50 Superfine	GE Healthcare, Швеция
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)	LabSystems. Россия

А или В)	
Твердотельный термостат для пробирок типа Eppendorf	BioSan, Латвия
Микроцентрифуга «Minispin»	Eppendorf, Германия
Центрифуга Eppendorf	Eppendorf, Германия
Вортекс	BioSan, Латвия
Пипетки вместимостью 100÷1000 мкл	«Ленпипет», Россия
вместимостью 100÷1000 мкл	«Ленпипет», Россия
вместимостью 20÷200 мкл	«Ленпипет», Россия
вместимостью 200 мкл	«Ленпипет», Россия
вместимостью 20 мкл	«Ленпипет», Россия
Холодильник	Indesit, Италия
Автоматический секвенатор 3500 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, США
Программируемый амплификатор PCR System 9700	Applied Biosystems, США
Камера для горизонтального электрофореза SE-2	Хеликон, Россия
Источник питания «Эльф»	ДНК-технология, Россия
Ультрафиолетовый трансиллюминатор Molecular Imager GelDoc™ 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

## 5 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.

## 6 Процедура

### *Подготовительный этап*

#### *6.1.1 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 ( $70 \pm 1$ ) мл 96% этилового спирта и довести объем до 100 мл дистиллированной водой;

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

– взвесить ( $1,5 \pm 0,1$ ) 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  $65 - 70$  °С гель в плашку толщиной 0,6 см. Если образовались пузырьки, 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 рН до 8,0 ледяной уксусной кислотой и довести объем раствора в мерном цилиндре 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 TAE*

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

*6.1.7 Приготовление рабочего буфера TAE-GTG*

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

*6.1.8 Приготовление раствора кристаллического фиолетового*

– взвесить  $(2.0 \pm 0.1)$  мг красителя и растворить в бидистиллированной воде.

*6.1.9 Приготовление буфера для нанесения проб на гель*

– взвесить  $(1.0 \pm 0.1)$  мг кристаллического фиолетового, добавить 3 мл стерильного глицерина и довести объем рабочим TAE буфером до 10 мл.

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

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

– добавить 50 мл рабочего буфера TAE-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 °С 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 Columns 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 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 95°C 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 (10 – 20 сек);
- запустить программу амплификатора (таблица 3.1);

Таблица 3.1 – Условия амплификации для гена 16S рРНК

	Стадии амплификации	Температура, °С	Время, мин	Количество циклов
1	Предварительный прогрев матрицы	95 °С	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 °С. 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 °С.

### 6.2.3 Электрофорез в агарозном геле в буфере TAE

- 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 электрофореза, 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 электрофореза, 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 1,5 мл. 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<sup>®</sup> Terminator v3.1 Sequencing Buffer (5×) – 6 мкл,  
реагент BigDye<sup>®</sup> Terminator v3. – 1 мкл;  
прямой праймер 8F или обратный праймер 1350R – 1 мкл в концентрации 3,3 пмоль;

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 (таблица 3.2).

Таблица 3.2 – 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°C 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 окончании разделения продуктов реакции Сэнгера обесчитать 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.4.1.1.;
- 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.

## 7 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(2x15-01) «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.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 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

ПРИЛОЖЕНИЕ 4  
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.

2 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.

3 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;

Инокулом – посевной материал микроорганизма.

4 Пересмотр:

Данная СОП вводится впервые.

5 Материалы и оборудование

5.1 Материалы и реактивы

Наименование основных реактивов и материалов	ИТД, производитель, страна
Набор дисков с антибактериальными препаратами	НИЦФ, Россия
Агар Мюллера – Хинтон	Oxoid, Великобритания

Наименование основных реактивов и материалов	НТД, производитель, страна
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 Instruments, 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

## *5.2 Оборудование*

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

### 5.3 Комплект спецодежды

Колпак медицинский	ГОСТ 2313478
Перчатки хирургические резиновые	ГОСТ 3-88
Маска медицинская	ГОСТ EN 13795-1-2011
Халат медицинский	ГОСТ 24760-81

## 6 Помещения

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

## 7 Процедура

### 7.1 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°C 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°C 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 вершущек колоний в пробирку с физиологическим раствором, перемешать на вортексе;

– довести оптическую плотность инокулюма до 0,5 по стандарту МакФарленда, что соответствует концентрации клеток  $1,5 \times 10^8$  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 Апликация 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 сверху дном непосредственно после апликации 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.

## 8 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(2x15-01) «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  
Критерии интерпретации результатов определения чувствительности микроорганизмов из разных семейств представлены в таблицах 4.1 – 4.5.

Таблица 4.1 – 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 ацетил	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
Левифлоксацин	5	≤ 13	14—16	≥ 17

Продолжение таблицы 4.1

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
Фосфомидин	200	≤ 12	13—15	≥ 16

Примечание – \*при определении чувствительности к фосфомидину в питательную среду необходимо вносить 25 мг/л глюкозо-6-фосфата.

Таблица 4.2 – Критерии интерпретации результатов определения чувствительности *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. и других НФБ<sup>1</sup>

Антибактериальные препараты	Содержание в диске (мкг)	Диаметр зон подавления (мм)		
		Резистентный	Промежуточный	Чувствительный
Бета-лактамы				
Ампициллин/сульбактам	10/10	≤ 11	12—14	≥ 15
Тикарциллин/клавуланат <sup>2)</sup>				
<i>P. aeruginosa</i>	75/10	≤ 14	15—19	≥ 15
<i>Acinetobacter</i> spp.	75/10	≤ 14	15—19	≥ 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
Левифлоксацин	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

Примечание – <sup>1</sup>ДДМ стандартизирован только для *P. aeruginosa* и *Acinetobacter* spp. При определении чувствительности других НФБ необходимо использовать методы серийных разведений. <sup>2</sup>Метод серийных разведений не стандартизован для определения чувствительности *Acinetobacter* spp. к тикарциллину/клавуланату.

Таблица 4.3 — Критерии интерпретации 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 <sup>2</sup>	1	≤ 10	11—12	≥ 13
<i>S. aureus</i>	1	≤ 17	–	≥ 18
Коагулазонегативные стафилококки				
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
Левифлоксацин	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

Примечание — <sup>1</sup> В практических лабораториях оценивать чувствительность *Staphylococcus* spp. к бета-лактамам кроме бензилпенициллина и оксациллина нецелесообразно. <sup>2</sup> Штаммы, устойчивые к оксациллину должны однозначно рассматриваться как устойчивые ко всем доступным бета-лактамам.

Таблица 4.4 – 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
Левифлоксацин	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
Фосфомидин	200	≤ 12	13—15	≥ 16
Стрептомицин (высокий уровень)	300	6	7—9	≥ 10
Гентамицин (высокий уровень)	120	6	7—9	≥ 10

Таблица 4.5 – 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
Левифлоксацин	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 4.6 – Критерии интерпретации результатов определения чувствительности *Streptococcus* spp. (кроме *S. pneumoniae*)

Антибактериальные препараты	Содержание в диске	Диаметр зон подавления роста (мм)		
		Резистентный	Промежуточный	Чувствительный
Бета-лактамы				
Бензилпенициллин <sup>2</sup>	10 ЕД	≤ 19	20—27	≥ 28
Ампициллин <sup>2</sup>	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 <sup>3</sup>	5	≤ 12	13—15	≥ 16
Левифлоксацин	5	≤ 13	14—16	≥ 17
Гатифлоксацин	5	≤ 17	18—20	≥ 21
Хлорамфеникол	30	≤ 17	18—20	≥ 21
Ванкомицин	30	–	–	≥ 17
Линезолид	30	–	–	≥ 21

Примечание – <sup>1</sup> – штаммов *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, устойчивых к пенициллину не описано. <sup>2</sup> – критерии диско-диффузионного метода применимы только для β-гемолитических стрептококков. <sup>3</sup> – критерии диско-диффузионного метода и метода серийных разведений применимы только для β-гемолитических стрептококков.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Методические указания МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам»
- 2 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.
- 3 Инструкция по использованию перекиси водорода с моющими средствами для целей дезинфекции (Утв. Минздравом СССР от 29.08.70 № 858 – 70).
- 4 Инструкция № 01/Б-13 по применению дезинфицирующего средства «Перекись водорода 6 %» (ООО «РосбиоАгроФарм», Россия).
- 5 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



ПРИЛОЖЕНИЕ 5  
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.Е. 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.

2 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.

3 Термины и определения

СОП – стандартная операционная процедура;

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

Секвенирование – определение последовательности ДНК;

ТАЕ – трис-ацетатный буфер

4 Материалы и оборудование

4.1 Материалы и реактивы

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;

Тақ ДНК-полимераза Thermo Fisher Scientific, США;

ДНК-буфер Thermo Fisher Scientific, США;

Праймер NS1 5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3' БиоСан, Новосибирск;

Праймер NS2 5'-GGCTGCTGGCACCAGACTTGC-3' БиоСан, Новосибирск;

Праймер NS8 5'-TCCGCAGGTTACCTACGGA-3' БиоСан, Новосибирск;

Прајмер ITS 1F 5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA -3' БиоСан, Новосибирск;  
Прајмер ITS 4 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC -3' БиоСан, Новосибирск;  
Прајмер ITS 3 5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC -3' БиоСан, Новосибирск;  
Вода для инъекций ЛП-002529;  
Реагент-растворитель Hi-Di Formamide Applied Biosystems, США;  
Планшет для нанесения продуктов реакции Сэнгера Applied Biosystems, США;  
Септа для планшетов Applied Biosystems, США;  
Септа для анодного буфера Applied Biosystems, США;  
Полимер POP-7 Applied Biosystems, США;  
Катодный буфер Applied Biosystems, США;  
Анодный буфер Applied Biosystems, США;  
Реактив для очистки помпы автоматического секвенатора Applied Biosystems, США;  
Капиллярный блок для автоматического секвенатора 3500 Genetic Analyzer Applied Biosystems, США;  
Пленка Parafilm Pechiney Plastic Packaging Company, США;  
Спирт этиловый ЛРС 000279/10;  
Агароза для электрофореза 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, Швеция;  
Концентрированная (ледяная) уксусная кислота Реахим, Россия;  
Перекись водорода, медицинская ГОСТ 177-88;  
Дистиллированная вода ГОСТ 6709-72;  
Центрифужные фильтры Амнокон Ультра-4, 100 кДа Millipore, Ирландия;  
Тампон-зонды, целлюлоза, 15 см Ningbo Greetmed Medical Instruments, 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, Россия;  
Пипетки вместимостью 100÷1000 мкл; 100÷1000 мкл; 20÷200 мкл; 200 мкл; 20 мкл «Ленпипет», Россия.

#### *4.2 Оборудование*

Бокс абактериальной воздушной среды (класс биологической безопасности II тип А или В), LabSystems, Россия;  
Твердотельный термостат для пробирок типа Eppendorf, BioSan, Латвия;  
Автоматический секвенатор 3500 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, США;  
Микроцентрифуга «Minispin», Eppendorf, Германия;  
Центрифуга Eppendorf, Eppendorf, Германия;  
Вортекс, BioSan, Латвия;  
Холодильник Indesit, Италия;  
Программируемый амплификатор PCR System 9700, Applied Biosystems, США;  
Камера для горизонтального электрофореза SE-2, Хеликон, Россия;  
Источник питания «Эльф» ДНК-технология, Россия;  
Ультрафиолетовый трансиллюминатор Molecular Imager GelDoc™ 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, Россия.

#### *4.3 Комплект спецодежды*

Колпак медицинский ГОСТ 2313478, Россия;  
Перчатки резиновые ГОСТ 3-88, Россия;  
Маска медицинская ГОСТ EN 13795-1-2011, Россия;  
Халат медицинский ГОСТ 24760-81, Россия.

## 5 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

### 5.1 Подготовительный этап

#### 5.1.1 Подготовка персонала к проведению основных работ:

– надеть хирургический халат, перчатки перед началом работ.

#### 5.1.2 Приготовление 70% раствора этилового спирта:

– налить в стеклянный цилиндр ( $70 \pm 1$ ) мл 96% этилового спирта и довести объем до 100 мл дистиллированной водой.

#### 5.1.3 Приготовление 1%-ного агарозного геля:

– взвесить ( $1,5 \pm 0,1$ ) 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 планку 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  $65 - 70$  °С гель в плашку толщиной 0,6 см, если образовались пузырьки, 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.

#### 5.1.4 Приготовление концентрированного буфера TAE (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 цилиндре до 2 л.

5.1.5 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.

#### 5.1.6 Приготовление рабочего буфера ТАЕ:

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

#### 5.1.7 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.

#### 5.1.8 Приготовление раствора кристаллического фиолетового:

- взвесить ( $2.0 \pm 0.1$ ) мг красителя и растворить в бидистиллированной воде.

#### 5.1.9 Приготовление буфера для нанесения проб на гель:

- взвесить ( $1.0 \pm 0.1$ ) мг кристаллического фиолетового, добавить 3 мл стерильного глицерина и довести объем рабочим ТАЕ буфером до 10 мл.

#### 5.1.10 Приготовление 0,6% геля GTG-агарозы:

- взвесить ( $0.3 \pm 0.1$ ) 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 винга. Выровнять столик для заливки геля. Вставить гребенку в плашку и залить расплавленный охлажденный до температуры 65 – 70 °С гель в плашку толщиной 0,6 см. Если образовались пузыри, их необходимо удалить, для чего:

- 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.

#### 5.1.115 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 Columns 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.

## 5.2 Основной этап

### 5.2.1 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 суспензий набором НК-технология по инструкции производителя.

### 5.2.2 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 °С. Закрыть крышку прибора и запустить программу на амплификаторе. Пробы после амплификации можно хранить 16 ч при комнатной температуре или в течение недели при температуре 2–8 °С.

Условия 1 раунда амплификации для межгенных спейсеров ITS и NS: предварительный прогрев матрицы – 95 °С, 5 мин; денатурация матрицы – 95 °С, 10 сек; отжиг праймеров – 50 °С, 15 сек; элонгация – 72 °С, 2 мин; 35 циклов финальная элонгация – 72 °С, 10 мин.

Условия 2 раунда амплификации для межгенного спейсера ITS: предварительный прогрев матрицы – 95 °С, 5 мин; денатурация матрицы – 95 °С, 10 сек; отжиг праймеров – 56 °С, 15 сек; элонгация – 72 °С, 2 мин; 35 циклов; финальная элонгация – 72 °С, 10 мин.

Условия 2 раунда амплификации для межгенного спейсера NS: предварительный прогрев матрицы – 95 °С, 5 мин; денатурация матрицы – 95 °С, 10 сек; отжиг праймеров – 54 °С, 15 сек; элонгация – 72 °С, 2 мин; 35 циклов; финальная элонгация – 72 °С, 10 мин.

### 5.2.3 Проведение электрофореза в агарозном геле в буфере ТАЕ:

- 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 электрофореза, 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.

#### 5.2.4 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 электрофореза, 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 1,5 мл. 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.

#### 5.2.5 Постановка реакции 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 – 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 1 мкл прямого праймера NS1 в концентрации 3,3 пмоль;
- для секвенирования межгенного спейсера ITS добавить 1 мкл 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. Условия реакции секвенирования по Сенгеру для ПЦР-фрагментов межгенных спейсеров ITS и NS: предварительный прогрев матрицы – 95 °С, 5 мин; денатурация матрицы – 95 °С, 10 сек; отжиг праймеров – 50 °С, 15сек; элонгация – 60 °С, 2 мин; 35 циклов; финальная элонгация – 72 °С, 10 мин; дополнительное прогревание – 98 °С, 3 мин.

#### 5.2.6 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 5.1.11) 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, США, для проведения капиллярного гель-электрофореза.

#### 5.2.7 Проведение капиллярного гель-электрофореза 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°C 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 окончании разделения продуктов реакции Сэнгера обчислить 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.

#### 5.2.8 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.

#### 5.3 Завершающий этап

- Полученные данные внести в электронную базу данных КЭМТК.

### 6 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(2x15-01) «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.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Raja H.A., Miller A.N., Pearce C.J., Oberlies N.H., 2017. Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. *J. Nat. Prod.*, 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.

### Список ознакомления

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

ПРИЛОЖЕНИЕ 6  
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.

2 Назначение

Идентификация микроорганизма является необходимым этапом при депонировании микроорганизма в Коллекции ЭМТК.

3 Термины и определения

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;

СОП – стандартная операционная процедура.

4 Пересмотр

Данная СОП вводится впервые.

5 Материалы и оборудование

5.1 Материалы и реактивы

РПА ТУ 9385-012-14237183-07. Россия;

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, Россия;  
Колбы мерные вместимостью 250 мл ГОСТ 1770-74, Россия;  
Флаконы градуированные с завинчивающейся крышкой. 500 мл. Isolab, Германия;  
Цилиндры мерные вместимостью 50 мл, 500 мл и 1 л. ГОСТ 1770-74, Россия;  
Пробирки типа Eppendorf. 1.5 мл Thermo, Россия;  
Наконечники для автоматических дозаторов объемом 200 мкл, «Eppendorf», США;  
Спирт этиловый, ректифицированный ЛРС 000279/10, Россия;  
Перекись водорода, медицинская ГОСТ 177-88, Россия;  
Вода дистиллированная рН от 5.0 до 7.0. ГОСТ 6709-72. Россия;  
Натрий хлористый, хч, ГОСТ 4233-77, Россия;  
Чашки Петри, пластиковые диаметр 90 мм, Greiner Bio-One, Австрия;  
Бактериологическая петля пластиковая одноразовая, Citotest, Китай.

### *5.2 Оборудование*

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, Россия;  
Автоклав ВК-75. ТЗМОИ, Россия;  
Вортекс, BioSan. Латвия.

### *5.3 Комплект спецодежды*

Колпак медицинский ГОСТ 2313478, Россия;  
Перчатки хирургические резиновые ГОСТ 3-88, Россия;

Маска медицинская ГОСТ EN 13795-1-2011, Россия;

Халат медицинский ГОСТ 24760-81, Россия.

## 6 Помещения

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

## 7 Процедура

### 7.1 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  $(100 \pm 1)$  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  $(70 \pm 1)$  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  $(4,0 \pm 0,5)$  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 раскатать 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 (A, B, или C);

– инкубировать планшет в термостате-инкубаторе при 33 °C 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.

## 8 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(2x15-01) «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.

#### 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 bacteria<sup>1,2</sup>. 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% CO<sub>2</sub>. 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*, *Ignavigramum*, *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 CO<sub>2</sub> (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  $\mu$ l. 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. Incubate 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" (Λ). 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" (Λ).

"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](http://www.biolog.com).

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 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

ПРИЛОЖЕНИЕ 7  
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.

2 Назначение

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

3 Термины и определения

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:

СМА – сердечно-мозговой агар;

СМБ – сердечно-мозговой бульон

СОП – стандартная операционная процедура;

РПА – рыбо-пептонный агар;

4 Пересмотр

Данная СОП вводится впервые.

5 Материалы и оборудование

5а. Материалы и реактивы

РПА ТУ 9385-012-14237183-07. Россия;

СМБ BioMerieux, Франция;

Бактоагар, BD, США;  
Дрожжевой экстракт, BD, США;  
Триптон, BD, США;  
Глицерин ГОСТ 6259-75, Россия;  
Среда Левина, Oxoid, Великобритания;  
Среда Nutrient Broth, Difco, США;  
Коринебакагар ТУ 9398-019-78095326-2006, Россия;  
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, Россия;  
Пробирки типа Eppendorf, 1.5 мл, Thermo, Россия;  
Наконечники для автоматических дозаторов до 200 мкл, «Eppendorf», США;  
Спирт этиловый, ректифицированный, ЛРС 000279/10, Россия;  
Перекись водорода, медицинская, ГОСТ 177-88, Россия;  
Вода дистиллированная pH от 5,0 до 7,0, ГОСТ 6709-72, Россия;  
Натрий хлористый, хч, ГОСТ 4233-77, Россия;  
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, Россия;  
Флаконы градуированные с завинчивающейся крышечкой, 500 мл, Isolab, Германия;  
Спиртовка лабораторная, ГОСТ 23932-90Е, Россия;  
Цилиндр вместимость 1 л, ГОСТ 1770-74, Россия;  
Пакеты для стерилизации, Citotest, Китай;  
Газогенерирующие пакеты, 3,5 л, Oxoid, Великобритания;

Пробирки с закручивающимися крышками, 2,0 мл DNase-free, RNase-free, SSIBIO, США.

#### *5b Оборудование*

Баня водяная лабораторная, BioSan, Латвия;

Бокс биологической (микробиологической) безопасности II класса, 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, Россия;

Анаэробат, 2,5 л, Oxoid, Великобритания;

Автоклав ВК-75, ТЗМОИ, Россия;

Вортекс, BioSan, Латвия.

#### *5c Комплект спецодежды*

Колпак медицинский ГОСТ 2313478, Россия;

Перчатки хирургические резиновые ГОСТ 3-88, Россия;

Маска медицинская ГОСТ EN 13795-1-2011, Россия;

Халат медицинский ГОСТ 24760-81, Россия.

### 6 Помещения

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

#### 7 Процедура

##### *7a 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 ( $70 \pm 1$ ) 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  $121^\circ\text{C}$  в течение 15 мин;

– взвесить ( $3.0 \pm 0.1$ ) г триптона, внести в мерный цилиндр;

– взвесить ( $1.5 \pm 0.1$ ) г дрожжевого экстракта, внести в мерный цилиндр с триптоном. добавить дистиллированной воды до 300 мл;

– разлить по флаконам градуированным;

– автоклавировать при  $121^\circ\text{C}$  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 крышечкой по 200 мкл, инкубировать при ( $36 \pm 1$ ) $^\circ\text{C}$  в течение 18 – 24 ч для выявления случайной контаминации.

#### 7.1.6 Приготовление физиологического раствора:

– взвесить ( $0.9 \pm 0.1$ ) 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  $121^\circ\text{C}$  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 ( $4.0 \pm 0.5$ ) 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  $-20^\circ\text{C}$ . 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  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , обратиться к музею, хранящемуся при  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , и высеять культуру из соответствующих пробирок из этого хранилища. В данном случае, высеивать культуру 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 высыхания;
- 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 дистиллированной 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 7.1);

Таблица 7.1 – 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 сверху дном и инкубировать при соответствующих оптимальному росту культуры условиях в течение 18 – 72 ч. Чашки с анаэробами поместить в термостат в анаэроостате;

– 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  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  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  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  как описано в разделе 7.2.5;

– при несоответствии морфологических данных колоний и клеток с повторного высева из музея при температуре  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  депонированному штамму высеять штамм из музейного хранилища при  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . При соответствии высеянной культуры описанному в журнале депонирования штамму перезаложить культуру в оба музея (на хранение при температуре  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  и при температуре  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) 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  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , три на хранение при температуре  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 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.

### 8 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(2x15-01) «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.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 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.
- 2 Донецкая Э. Г.-А. Клиническая микробиология: Руководство для специалистов клинической лабораторной диагностики. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. – 480 с.
- 3 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.
- 4 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