Федеральная служба по надзору
в сфере защиты прав потребителей
и благополучия человека

Государственная система
санитарно-эпидемиологического
нормирования Российской Федерации

ISSN 2219-5262

# БЮЛЛЕТЕНЬ

## НОРМАТИВНЫХ И МЕТОДИЧЕСКИХ ДОКУМЕНТОВ ГОССАНЭПИДНАДЗОРА

ИЗДАНИЕ ОФИЦИАЛЬНОЕ

МОСКВА — 2015

Издается с 2000 года

Выпуск 2 (60)
Июнь

gost.e-ecolog.ru

**УЧРЕДИТЕЛЬ**

**Федеральное бюджетное учреждение здравоохранения «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека**

**РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ**

**Главный редактор** Г. Г. Онищенко

Е. Н. Беляев,
А. И. Верещагин,
Л. П. Гульченко,
С. И. Иванов,
Г. Ф. Лазикова,
С. С. Перель,
Г. С. Перминова,
М. П. Шевырева,
Н. В. Шестопалов

**РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ**

А. Х. Агиров (Майкоп),
Г. В. Айдинов (Ростов-на-Дону),
В. А. Алешкин (Москва),
А. А. Баранов (Москва),
Н. Н. Верещагин (Оренбург),
А. Л. Гинцбург (Москва),
В. В. Губернаторова (Иваново),
В. И. Евдокимов (Белгород),
Н. А. Забродин (Ижевск),
А. И. Заиченко (Москва),
Н. Ф. Измеров (Москва),
О. Л. Гавриленко (Московская область),
И. В. Корабельников (Сыктывкар),
С. В. Куркатов (Красноярск),
Г. И. Куценко (Москва),
В. Р. Кучма (Москва),
Б. В. Лимин (Вологда),
Г. Д. Минин (Уфа),
Б. И. Никонов (Екатеринбург),
В. И. Покровский (Москва),
А. И. Потапов (Москва),
Ю.А. Рахманин (Москва),
С. И. Савельев (Липецк),
И. П. Салдан (Барнаул),
В. Р. Саухат (Магадан),
В. П. Сергиев (Москва),
В. А. Тутельян (Москва),
Н. Н. Филатов (Москва),
В. П. Чашин (Санкт-Петербург),
М. И. Чубирко (Воронеж),
М. Г. Шандала (Москва)

Подписка на *Бюллетень нормативных и методических документов госсанэпиднадзора* принимается во всех почтовых отделениях России.
**Подписной индекс** в каталоге агентства «Роспечать» «*Газеты. Журналы*» – **79682**

**Адрес редакции:**

117105, Москва, Варшавское ш., 19а
Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора

# БЮЛЛЕТЕНЬ

## НОРМАТИВНЫХ И МЕТОДИЧЕСКИХ ДОКУМЕНТОВ

# ГОССАНЭПИДНАДЗОРА

*Выпуск 2 (60), июнь 2015*

Издается с 2000 г.

# НОРМАТИВНЫЕ ПРАВОВЫЕ АКТЫ

# МЕТОДИЧЕСКИЕ ДОКУМЕНТЫ

**Зарегистрирован Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор)**

**Свидетельство о регистрации средства массовой информации от 24 января 2012 г. ПИ № ФС77-48297**

Подписано в печать 11.06.15

Формат 60×84/8, усл. печ. л. 16,74, заказ № 1486, тираж 500 экз.

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
127994, Москва, Вадковский пер., д. 18, стр. 5, 7

Оригинал-макет подготовлен к печати
отделом издательского обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а

**Отделение реализации, тел./факс 8 (495) 952-5089**
**E-mail:** gost.e-ecolog.ru

**© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2015**

СОДЕРЖАНИЕ

# НОРМАТИВНЫЕ ПРАВОВЫЕ АКТЫ


Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев): СП 2.2.1.3218—14 ..... 3

Санитарно-эпидемиологические требования к размещению, устройству оборудованию, содержанию и режиму работы бань и саун: СанПиН 2.1.2.3150—13 ..... 15

Предельно допустимые концентрации (ПДК) О-(1,2,2-триметилпропил)-метилфторфосфоната (зомана) и О-изопропилметилфторфосфоната (зарина) в отходах после печей (золе) объектов по уничтожению химического оружия: ГН 2.1.7.3199—14 ..... 23

Предельно допустимые концентрации (ПДК) загрязняющих веществ в атмосферном воздухе населенных мест: Изм. в ГН 2.1.6.1338—03. Утверждены постановлением Главного государственного санитарного врача от 12.01.2015 № 3 ..... 27

Предельно допустимая концентрация (ПДК) О-изобутил-β-N-диэтиламиноэтилтиолового эфира метилфосфоновой кислоты (вещества типа Vx) в воздухе рабочей зоны (включая аэрозоль дезинтеграции строительных материалов) при выводе объектов по уничтожению химического оружия из эксплуатации: ГН 2.2.5.3224—14 ..... 31

Ориентировочный допустимый уровень (ОДУ) метилфосфоновой кислоты в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования: ГН 2.1.5.3225-14 ..... 35

Предельно допустимый уровень (ПДУ) загрязнения О-изобутил-β-N-диэтиламиноэтилтиоловым эфиром метилфосфоновой кислоты (веществом типа Vx) впитывающих и невпитывающих поверхностей технологического оборудования, подлежащего перемещению/транспортировке за пределы объекта по уничтожению химического оружия, и строительных конструкций: ГН 2.2.5.3226—14 ..... 39

Предельно допустимая концентрация (ПДК) метилфосфоновой кислоты в отходах строительных конструкций, включая отходы после термического обезвреживания: ГН 2.1.7.3227—14 ..... 43

Предельно допустимый уровень (ПДУ) загрязнения О-изобутил-β-N-диэтиламиноэтилтиоловым эфиром метилфосфоновой кислоты (веществом типа Vx) поверхности металоотходов, прошедших термообезвреживание: ГН 2.1.7.3228—14 ..... 47

Предельно допустимый уровень (ПДУ) загрязнения поверхности технологического оборудования О-изобутил-β-N-диэтиламиноэтилтиоловым эфиром метилфосфоновой кислоты (веществом типа Vx): ГН 2.2.5.3229—14 ..... 51


# МЕТОДИЧЕСКИЕ ДОКУМЕНТЫ


Использование метода времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-ToF MS) для индикации и идентификации возбудителей I—II групп патогенности: МР 4.2.0089—14 ..... 55

Использование методов полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (рибопринтинг, электрофорез в пульсирующем поле) для идентификации возбудителей I—II групп патогенности: МР 4.2.0090—14 ..... 71

Расчет фактических и предотвращенных в результате контрольно-надзорной деятельности экономических потерь от смертности, заболеваемости и инвалидизации населения, ассоциированных с негативным воздействием факторов среды обитания: МР 5.1.0095—14 ..... 93

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ
И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

# Использование метода времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-ToF MS) для индикации и идентификации возбудителей I—II групп патогенности

**Методические рекомендации**
**МР 4.2.0089—14**

1. Разработаны Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Ю. В. Демина, Н. В. Шеенков); ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» (В. Е. Куклев, Н. А. Осина, А. В. Осин, И. Н. Шарова, С. А. Портенко, А. Н. Спицын, Д. В. Уткин, Н. С. Червякова, А. С. Абдрашитова, С. А. Щербакова); ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» (С. В. Титова, О. С. Чемисова, В. В. Агафонова, С. О. Чайка, И. А. Чайка, О. А. Рыковская, И. А. Молдаван, Н. В. Павлович, М. В. Цимбалистова); ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» (С. В. Балахонов, М. В. Чеснокова, М. В. Афанасьев, Л. В. Миронова, С. А. Татарников, Е. Г. Токмакова, Г. В. Вдовиченко, А. С. Остяк, М. Б. Ярыгина, Е. А. Басов); ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» (И. А. Дятлов, Е. А. Тюрин, Л. В. Чекан, К. В. Детушев, А. Е. Хомяков); ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» (В. А. Антонов, Г. А. Ткаченко, С. С. Савченко, В. В. Алексеева, О. В. Зинченко, И. М. Шпак, М. А. Гришина, Н. В. Вьючнова, О. С. Ульянова, Д. В. Викторов).

2. Утверждены руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации А. Ю. Поповой 24 апреля 2014 г.

3. Введены впервые

## Содержание

1. Область применения ... 58
2. Общие положения ... 58
3. Требования к организации работ ... 59
4. Культивирование микроорганизмов ... 60
4.1. Культивирование возбудителя чумы ... 60
4.2. Культивирование возбудителя холеры ... 60
4.3. Культивирование возбудителя туляремии ... 61
4.4. Культивирование возбудителя сибирской язвы ... 61
5. Подготовка проб для масс-спектрометрии ... 61
5.1. Экстракция белков с использованием муравьиной кислоты ... 61
5.2. Экстракция белков с использованием трифторуксусной кислоты ... 62
5.3. Прямое нанесение образцов на мишень ... 62
6. Проведение MALDI-ToF масс-спектрометрии ... 63
7. Учет и интерпретация результатов ... 63
8. Дополнение базы данных программ ... 63
*Приложение 1.* Среды, используемые для культивирования возбудителей чумы, холеры, туляремии, сибирской язвы ... 65
*Приложение 2.* Оборудование и программное обеспечение для проведения исследований методом MALDI-ToF масс-спектрометрии ... 66
*Приложение 3.* Реактивы для проведения исследований методом MALDI-ToF масс-спектрометрии ... 67
*Приложение 4.* Расходные материалы для проведения исследований методом MALDI-ToF масс-спектрометрии ... 67
*Приложение 5.* Приготовление рабочих растворов для проведения исследований методом MALDI-ToF масс-спектрометрии ... 68
*Приложение 6.* Очистка MALDI-чипа (мишени) ... 69
Библиография ... 70

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
А. Ю. Попова
24 апреля 2014 г.
Дата введения: с момента утверждения

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ
И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

# Использование метода времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-ToF MS) для индикации и идентификации возбудителей I—II групп патогенности

**Методические рекомендации**
**МР 4.2.0089—14**

## 1. Область применения

Настоящие методические рекомендации предназначены для специалистов лабораторий, осуществляющих диагностические, мониторинговые и научные исследования с возбудителями опасных инфекционных болезней.

Методические рекомендации по использованию метода масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией для идентификации возбудителей чумы, холеры и туляремии включают описание применения масс-спектрометрии для видовой идентификации микроорганизмов – возбудителей опасных инфекционных заболеваний. Описание охватывает такие разделы, как культивирование исследуемых штаммов, получение из них белковых препаратов, снятие спектров, дополнение базы данных референсных спектров, проведение идентификации с использованием расширенной базы данных, интерпретацию полученных результатов, приводится список используемых реактивов и расходных материалов.

## 2. Общие положения

Масс-спектрометрический анализ (МС-анализ) является аналитической процедурой, физическим методом исследования, в процессе которого осуществляется измерение отношения массы заряженных частиц материи (ионов) к их заряду. Полученный результат – спектральный сигнал – представляет собой рассортировку заряженных частиц по значению отношения молекулярной массы иона к его заряду.

Первоначально, с момента разработки, МС-анализ применялся в основном в аналитической и биологической химии и физике для изучения химического и изотопного состава веществ, в том числе и многокомпонентных, сложных биополимеров, их структуры и химических модификаций.

Для исследования применяется прибор – масс-спектрометр. Несмотря на большое количество различных моделей инструментов для МС-анализа, любой при-

бор включает три компонента: источник ионов (ионизатор), систему разделения ионов и систему детекции ионов. Ионизатор переводит исследуемый образец в ионизированную форму. Существует большое количество систем ионизации, ее выбор зависит от типа исследуемых молекул, агрегатного состояния образца (твердого, жидкого, газообразного). Далее ионизированные компоненты образца оказываются в системе разделения ионов, которая, используя различные физические механизмы, ранжирует их по значению отношения массы иона к заряду. Детектор регистрирует образовавшиеся и рассортированные ионы, позволяя генерировать визуальный спектр, на котором в виде пиков различной интенсивности представлены отношения массы иона к заряду всех ионизированных компонентов исследуемого образца.

Последнее десятилетие ознаменовалось активным внедрением одного из видов МС-анализа, метода матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (англ. Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization, MALDI) с времяпролетным разделением (англ. Time of Flight, ToF) ионов (MALDI-ToF-MS), в клиническую микробиологию для идентификации микроорганизмов. MALDI – метод мягкой ионизации, позволяющий ионизировать биологические макромолекулы (пептиды, белки, ДНК, олигонуклеотиды, липополисахариды и сахара) в присутствии особого вещества, «матрицы», под воздействием лазера. Полученные ионы, преимущественно однозарядные, ранжируются во времяпролетной системе разделения за счет разной скорости перемещения, обратно пропорциональной массе иона. Зная длину пути перемещения иона от ионизатора до детектора, а также время этого перемещения, можно вычислить скорость движения иона и на основании ее значения рассчитать массу частицы.

Использование в качестве исследуемого образца чистой культуры микроорганизма или его экстрактов позволяет получить спектр, характеризующий качественный молекулярный состав исследуемого объекта. Получаемый спектральный паттерн является уникальной видо-, а в некоторых случаях и штаммоспецифичной характеристикой, позволяющей однозначно идентифицировать микроорганизм до вида, а в некоторых случаях осуществить и внутривидовую дифференциацию или определить дополнительные свойства микроорганизма, в том числе и клинически значимые.

Собранные в процессе анализа спектры исследуемых микроорганизмов могут сравниваться с референсными спектрами, присутствующими в базе данных, поставляемых производителями вместе с оборудованием для MALDI-ToF MS. При определенном проценте совпадений выводится результат о таксономической принадлежности исследуемого объекта.

### 3. Требования к организации работ

Работу в микробиологической лаборатории с пробами материалов, содержащих возбудителей опасных инфекционных болезней бактериальной природы, на MALDI-ToF масс-спектрометре выполняют в соответствии с действующими нормативными и методическими документами.

Пробы, содержащие или подозрительные на содержание возбудителей опасных инфекционных болезней, подготавливают и обеззараживают в «заразной» зоне в боксах биологической безопасности II класса. Работу с подготовленными пробами осуществляют после их выноса из микробиологического бокса или из «заразной» зоны в зависимости от того, где установлен MALDI-ToF масс-спектрометр. Средства индивидуальной защиты и тип дезинфицирующего раствора определяются кон-

кретным видом возбудителя, с которым проводятся работы, в соответствии с действующими нормативными и методическими документами.

Каждое структурное подразделение (лаборатория), проводящее работы по индикации возбудителей опасных инфекционных болезней на MALDI-ToF масс-спектрометре, должно иметь санитарно-эпидемиологическое заключение о соответствии санитарно-эпидемиологическим правилам и нормативам при проведении работ с возбудителями опасных инфекционных болезней.

Исследования методом MALDI-ToF масс-спектрометрии проводят в организациях, имеющих лицензию на деятельность, связанную с возбудителями инфекционных болезней, в лабораториях, имеющих санитарно-эпидемиологическое заключение о возможности проведения данных работ, выданных в установленном порядке.

## 4. Культивирование микроорганизмов

Стандартная среда культивирования бактерий для MALDI-ToF MS анализа – кровяной агар (прилож. 1), содержащий 5 % овечьей крови.

Допускается исследование культур, полученных на других питательных средах, а также с различных фаз роста или выращенных при разных температурах. Следует помнить, что наилучшие результаты получаются при использовании условий (среда, фаза роста, температура), идентичных тем, что были использованы для культивирования образцов, использованных для создания референсных единиц базы данных.

Для масс-спектрометрического анализа необходимо использовать только чистые культуры или изолированные колонии микроорганизмов, выращенных с соблюдением условий, специфических для каждого патогена. В случае работы с медленнорастущими микроорганизмами допускается использование культур, выращиваемых более суток. Если в исследуемом образце содержатся микроорганизмы более чем одного вида, то идентификация пройдет некорректно.

Все манипуляции с живыми ПБА I—II групп проводятся в боксах биологической безопасности II В класса, с ПБА III—IV групп – в боксах биологической безопасности II А класса.

При выполнении работ необходимо руководствоваться действующими нормативными правовыми и методическими документами, регламентирующими требования биологической безопасности при проведении работ с возбудителями инфекционных заболеваний, а также иными документами и внутренними инструкциями, разработанными и согласованными с органом по контролю соблюдения требований биологической безопасности учреждения, утвержденными руководителем, регламентирующими работу с возбудителями I—IV группы патогенности.

### 4.1. Культивирование возбудителя чумы

Для исследования используют чистые культуры суточного роста. Исследуемые штаммы *Y. pestis* выращивают на питательном агаре для культивирования микроорганизмов общего назначения, pH 7,2 (прилож. 1), в течение 24 ч при температуре 28 °С. Полученные суточные культуры используют для приготовления образцов для масс-спектрометрии. Культуры возбудителя чумы подвергают предварительной экстракции белка перед нанесением на чип (мишень).

### 4.2. Культивирование возбудителя холеры

Культуры, выросшие на щелочном агаре (pH 7,6) в течение 18—24 ч (прилож. 1), проверяют в ориентировочной слайд-агглютинации с холерными сыво-

ротками О1 в разведении 1 : 100, РО и О139 в разведении 1 : 50. Культуры, агглютинирующиеся одной из серогруппоспецифических сывороток, исследуют масс-спектрометрически с предварительной экстракцией белка, не агглютинирующиеся – прямым нанесением на MSP-чип.

### 4.3. Культивирование возбудителя туляремии

Культивирование проводят на чашках с FT-агаром (прилож. 1) в течение 72 ч при температуре 37 °С. Культуры возбудителя для масс-спектрометрического исследования подвергают предварительной экстракции белка перед нанесением на чип (мишень).

### 4.4. Культивирование возбудителя сибирской язвы

Культивирование проводят на чашках с агаром Хоттингера (рН 7,2) в течение 24 ч при температуре 37 °С (прилож. 1). Культуры возбудителя для масс-спектрометрического исследования подвергают предварительной экстракции белка перед нанесением на чип (мишень).

## 5. Подготовка проб для масс-спектрометрии

### 5.1. Экстракция белков с использованием муравьиной кислоты

Данный метод применяют для возбудителей I—II групп патогенности (за исключением спорообразующих микроорганизмов, дрожжей, грибов) – возбудителей чумы, туляремии и холеры, агглютинирующих с одной из указанных серогруппоспецифических сывороток.

Проведение экстракции:

1. Готовят и маркируют необходимое число микропробирок, соответствующее числу исследуемых штаммов.

2. В каждую пробирку вносят 300 мкл деионизованной воды.

3. Микробиологической петлей диаметром 1 мм в пробирку вносят одну изолированную колонию возбудителя и плавными движениями суспендируют.

4. К суспензии добавляют 900 мкл 96 %-го этилового спирта.

5. Полученную смесь тщательно перемешивают на микроцентрифуге-вортексе.

6. После перемешивания пробирки помещают в центрифугу (необходимо сохранять ориентацию пробирок после помещения их в ротор) и центрифугируют в течение 2 мин при 13 тыс. об./мин.

7. Полученный супернатант аккуратно, не задевая осадка, отбирают одноразовым наконечником и сливают в емкость с дезинфицирующим раствором.

8. Этапы 6 и 7 повторяют для удаления остатков раствора этанола.

9. К осадку добавляют 25 мкл 70 %-го водного раствора муравьиной кислоты, полученную смесь тщательно перемешивают пипетированием или на микроцентрифуге-вортексе (объем муравьиной кислоты зависит от первоначального количества культуры, взятой в исследование, и может варьировать от 1 до 80 мкл).

10. К суспензии добавляют равный объем ацетонитрила и смесь повторно тщательно перемешивают.

11. После перемешивания пробирки помещают в центрифугу (необходимо сохранять ориентацию пробирок после помещения их в ротор) и центрифугируют в течение 2 мин при 13 тыс. об./мин.

12. В лунку MSP-чипа вносят 1 мкл полученного супернатанта. Для каждой исследуемой единицы (колония, штамм) используют 5 лунок для получения достоверного результата.

13. Сразу после высыхания нанесенной на чип капли супернатанта сверху наносят 1 мкл матрицы (прилож. 3, 5).

14. В лунку H12 MSP-чипа вносят 1 мкл калибровочного стандарта для масс-спектрометрии, на который также после высыхания наносят 1 мкл матрицы. Необходимо дождаться высыхания раствора матрицы, после чего можно приступать к масс-спектрометрическим исследованиям.

15. После проведения мероприятий по заключительной дезинфекции рабочей зоны бокса 70 %-м спиртом чип с нанесенными на него образцами может быть перенесен в «чистую» зону для дальнейшего анализа.

### 5.2. Экстракция белков с использованием трифторуксусной кислоты

Данный метод применяют для спорообразующих возбудителей инфекционных болезней II—IV групп патогенности:

1. Готовят и маркируют необходимое число микропробирок, соответствующее числу исследуемых штаммов.

2. В каждую пробирку вносят 300 мкл деионизованной воды.

3. Микробиологической петлей диаметром 1 мм в пробирку вносят одну изолированную колонию возбудителя, аккуратными, плавными движениями тщательно суспендируют.

4. В микропробирку добавляют 50 мкл 80 %-й ТФУ и перемешивают пипетированием.

5. Инкубируют при комнатной температуре в течение 30 мин.

6. Добавляют 150 мкл ультрачистой $H_2O$.

7. Добавляют 200 мкл ацетонитрила и перемешивают пипетированием.

8. Центрифугируют микропробирки в течение 2 мин при 13 000 об./мин.

9. В лунку MSP-чипа вносят 1 мкл полученного супернатанта. Для каждой исследуемой единицы (колония, штамм) используют 5 лунок для получения достоверного результата.

10. Сразу после высыхания нанесенной на чип капли супернатанта сверху наносят 1 мкл матрицы (прилож. 3, 5).

11. В лунку H12 MSP-чипа вносят 1 мкл калибровочного стандарта для масс-спектрометрии, на который также после высыхания наносят 1 мкл матрицы. Необходимо дождаться высыхания раствора матрицы, после чего можно приступать к масс-спектрометрическим исследованиям.

12. После проведения мероприятий по заключительной дезинфекции рабочей зоны бокса 70 %-м спиртом чип с нанесенными на него образцами может быть перенесен в «чистую» зону для дальнейшего анализа.

### 5.3. Прямое нанесение образцов на мишень

Данный метод применяют для микроорганизмов III—IV групп патогенности, в частности штаммов *V. cholerae*, не агглютинирующихся ни с одной из указанных серогруппоспецифических сывороток.

Одну изолированную колонию возбудителя захватывают одноразовой микробиологической петлей (стерильной зубочисткой) и равномерно наносят на лунку MSP-чипа, не выходя за края. Для каждой исследуемой единицы (колония, штамм) используют 5 лунок для получения достоверного результата.

Сразу после высыхания нанесенной на чип биомассы сверху наносят 1 мкл матрицы.

В лунку H12 MSP-чипа вносят 1 мкл калибровочного стандарта для масс-спектрометрии, на который также после высыхания наносят 1 мкл матрицы. Необходимо дождаться высыхания раствора матрицы, после чего можно приступать к масс-спектрометрическим исследованиям.

После проведения мероприятий по заключительной дезинфекции рабочей зоны бокса 70 %-м спиртом чип с нанесенными на него образцами может быть перенесен в «чистую» зону для дальнейшего анализа.

## 6. Проведение MALDI-ToF масс-спектрометрии

Идентификацию проводят на масс-спектрометрах. На первом этапе идентификации программные продукты, прилагаемые к масс-спектрометрам (прилож. 2), производят сбор исходных спектров исследуемых образцов. Для получения одиночного масс-спектра используют 40 импульсов лазера (частота 60 Гц), анализируемый диапазон масса/заряд составляет 2 000—20 000 Да. С каждой лунки чипа снимается исходный спектр, представляющий собой сумму шести одиночных спектров (240 импульсов лазера). Для получения достоверных результатов идентификации с каждого образца необходимо получить не менее пяти исходных спектров.

## 7. Учет и интерпретация результатов

С помощью программ (прилож. 2) проводится автоматическая идентификация на основании сравнения собранных исходных спектров с референсными спектрами базы данных. По окончании процесса идентификации программа отображает результат идентификации, приводя наиболее ревалентную исходному спектру таксономическую единицу базы данных с указанием значения коэффициента соответствия. Чем выше коэффициент соответствия, тем вероятнее классификация вида. Для лучшего восприятия результаты идентификации помечены одним из трех цветов: зеленый, желтый или красный. Значение коэффициента соответствия большее или равное 2,0 рассматривается как достоверная идентификация (зеленый цвет).

После завершения процесса идентификации результат выводится в таблицу классификации, показывающую наилучший результат идентификации полученных спектров. Достоверность полученных результатов характеризуется значением «Score» и соответствующим цветовым, сим-вольным и буквенным обозначением.

| Диапазон **Score** | Описание | Символы | Цвет |
|---|---|---|---|
| 2.300—3.000 | Высокий уровень видовой идентификации | (+++) | Зеленый |
| 2.000—2.299 | Надежная родовая идентификация, возможная видовая идентификация | (++) | Зеленый |
| 1.700—1.999 | Возможная родовая идентификация | (+) | Желтый |
| 0.000—1.699 | Ненадежная идентификация | (–) | Красный |

## 8. Дополнение базы данных программ

Поскольку коммерчески доступные базы данных, поставляемые с масс-спектрометрами на территорию России, не содержат спектров возбудителей особо опасных инфекций, необходимо создание референсных спектров (MSP) для микро-

организмов I—II групп патогенности и внесение их в базу данных. Для создания референсных спектров необходимо использовать исключительно белковые экстракты.

Чип с нанесенными на него образцами помещается в масс-спектрометр. После позиционирования чипа в ионизационной камере необходимо дождаться набора прибором значений вакуума не более $5 \times 10^{-7}$ атм. После достижения указанных значений необходимо провести калибровку с помощью нанесенного на лунку H12 калибровочного стандарта. После этого можно приступать к сбору спектров в ручном или автоматическом режиме.

Сбор спектров проводят на масс-спектрометрах (прилож. 2). Для получения одиночного масс-спектра используют 40 импульсов лазера (частота 60 Гц), анализируемый диапазон масса/заряд составляет 2 000—20 000 Да.

Для штаммов, используемых для расширения референсной базы данных, сбор спектров проводят по следующей схеме: из каждой лунки (5 лунок на одну исследуемую единицу) с нанесенным образцом снимают по четыре исходных спектра, что в сумме составляет по 20 исходных спектров для каждого штамма. Из исходных спектров создают референсные и вносят их в базу данных программ (прилож. 2). После дополнения базы данных представляется возможным идентификация микроорганизмов в автоматическом режиме.

Приложение 1

**Среды, используемые для культивирования возбудителей чумы, холеры, туляремии, сибирской язвы**

Для культивирования возбудителей I—II групп патогенности с целью последующего исследования методом MALDI-ToF масс-спектрометрии применяются неселективные среды накопления, не содержащие красителей и антибиотиков.

| | |
|---|---|
| 1 | Питательный ГРМ-агар. Питательный агар для культивирования микроорганизмов, сухой (или эквивалент) |
| 2 | Щелочной агар. Питательная среда для выделения и культивирования холерного вибриона, сухая (или эквивалент) |
| 3 | FT-агар. Питательная среда для культивирования и выделения туляремийного микроба, сухая (или эквивалент) |
| 4 | Основа кровяного агара (Blood Agar Base) (или эквивалент) |
| 5 | Агар Хоттингера. Питательный агар для культивирования микроорганизмов, готовый к применению (или эквивалент) |

Приложение 2

**Оборудование и программное обеспечение для проведения исследований методом MALDI-ToF масс-спектрометрии**

| | |
|---|---|
| 1 | MALDI-ToF масс-спектрометр, например: MicroFlex (Bruker Daltonik GmbH) или эквивалент |
| 2 | MSP-мишень (чип) для нанесения образцов, 96-луночная (Bruker Daltonik GmbH, # 224989 или эквивалент) |
| 3 | Бокс биологической безопасности II класса тип B |
| 4 | Термостат для температурного режима 37 °C |
| 5 | Термостат для температурного режима 28 °C |
| 6 | Лабораторная настольная центрифуга с ротором для микропробирок объемом 1,5 мл, до 13 000 об./мин |
| 7 | Микроцентрифуга-встряхиватель |
| 8 | Дозатор механический одноканальный 0,5—10 μL |
| 9 | Дозатор механический одноканальный 10—100 μL |
| 10 | Дозатор механический одноканальный 100—1 000 μL |
| 11 | Штатив для шести механических дозаторов |
| 12 | Таймер-секундомер |
| 13 | Колбы мерные градуированные (объемом до 100, 200, 500, 1 000 мл) |
| 14 | Программы для управления времяпролетными масс-спектрометрами |
| 15 | Программы для дальнейшей обработки спектров, полученных с помощью масс-спектрометра. С помощью программы возможно анализировать спектры и сравнивать их друг с другом. Программа содержит алгоритмы для полностью автоматического и интерактивного обнаружения пиков (SNAP, Centroid и Sum peak finder), их сглаживания, вычитания величины сравнения (baseline subtraction), рекалибровки спектров. Поддержка экспорта спектров в различные форматы. Данные, обработанные в программе, могут быть экспортированы в формат списка пиков (peak lists) для дальнейшей обработки |
| 16 | Программные пакеты, необходимые для идентификации микроорганизмов в автоматическом и ручном режимах, создания пользовательских баз данных референсных спектров, построения дендрограмм, отображения референсных спектров в виде псевдогелей. Программа дает возможность импортировать результат автоматической идентификации в HTML-файл или распечатать его. Программы выражают результат идентификации в виде коэффициента соответствия (Score Value) |

Приложение 3

**Реактивы для проведения исследований методом MALDI-ToF масс-спектрометрии**

Все используемые реактивы должны быть наивысшей химической чистоты, специальные для масс-спектрометрического анализа или жидкостной хроматографии.

| | |
|---|---|
| 1 | Ацетонитрил, 99,8 % |
| 2 | Вода деионизованная ультрачистая (ОСТ 11.029.003—80) |
| 3 | Муравьиная кислота, ≥ 95 % |
| 4 | Калибровочный стандарт для масс-спектрометра |
| 5 | Спирт этиловый, 96 %-й (ГОСТ Р 51652—2000) |
| 6 | Трифторуксусная кислота |
| 7 | α-Циано-4-гидроксикоричная кислота |

Приложение 4

**Расходные материалы для проведения исследований методом MALDI-ToF масс-спектрометрии**

| | |
|---|---|
| 1 | Пробирки микроцентрифужные Safe-Lock Tubes 1,5 mL |
| 2 | Наконечники для механического дозатора, 0,1—10 μL |
| 3 | Наконечники для механического дозатора, 10—100 μL |
| 4 | Наконечники для механического дозатора 100—1 000 μL |
| 5 | Петля бактериологическая, стерильная, 1 мкл |
| 6 | Емкость-контейнер полимерный для дезинфекции ЕДПО-5-01 |
| 7 | Штативы для микроцентрифужных пробирок, 80 лунок |
| 8 | Вата хлопковая медицинская гигроскопическая |
| 9 | Марля медицинская |
| 10 | Лабораторные салфетки |

Приложение 5

**Приготовление рабочих растворов для проведения исследований методом MALDI-ToF масс-спектрометрии**

1) Приготовление 70 %-го этанола (100 мл):

- Отмерить 27 мл деионизованной воды с помощью 100-миллиметрового градуированного цилиндра;
- Воду налить в мерный стакан;
- Отмерить 73 мл 96 %-го этанола с помощью 100-миллиметрового градуированного цилиндра;
- Спирт налить в мерный стакан с 27 мл воды;
- Тщательно перемешать.

2) Приготовление 70 %-го раствора муравьиной кислоты (FA) (100 мл):

- Внести 30 мкл деионизованной воды в 1,5-миллиметровую микропробирку;
- Осторожно добавить 70 мкл 100 %-го FA;
- Тщательно перемешать на микроцентрифуге-вортексе;
- Раствор готов для использования.

3) Приготовление раствора матрицы.

Для приготовления раствора матрицы (α-Циано-4-гидроксикоричная кислота) удобно использовать сухую порционную матрицу. Рекомендуется готовить матрицу в день проведения масс-спектрометрического исследования.

Для приготовления раствора:

- Внести 475 мкл ультрачистой деионизованной воды, 25 мкл 100 %-го TFA и 500 мкл ацетонитрила в микропробирку до конечного объема 1 мл.
- Тщательно перемешать на микроцентрифуге-вортекс. Получившаяся смесь называется «стандартный растворитель».
- Перенести 250 мкл стандартного растворителя в пробирку с сухой порционной матрицей.
- Растворить матрицу перемешиванием при комнатной температуре до просветления раствора (все кристаллы должны раствориться). Конечная концентрация матричного раствора – 10 мг/мл.
- Раствор готов для использования.

**Примечание.** Приготовленный раствор может храниться в темном месте (во избежание ультрафиолетового воздействия) при комнатной температуре в течение рабочего дня.

Приложение 6

**Очистка MALDI-чипа (мишени)**

MALDI-чипы (мишени), используемые в идентификации, должны подвергаться тщательной очистке после использования с помощью 70 %-го раствора этанола и 80 %-го раствора TFA.

**Примечание.** Не используйте реагентов кроме тех, что указаны выше. Не оставляйте мишени в органических растворителях более чем на 20 мин.

Для чистки мишеней:

- поместить мишень в подходящий контейнер и налить достаточное для полного покрытия поверхности мишени количество 70 %-го этанола;
- выдержать мишень в течение 5 мин при комнатной температуре;
- вынуть мишень и тщательно промыть в проточной водопроводной воде;
- используя лабораторную салфетку (прилож. 2), смоченную в 70 %-м этаноле, тщательно очистить мишень;
- промыть мишень проточной водой и промокнуть салфеткой до полного высушивания;
- промыть мишень деионизованной водой и промокнуть салфеткой;
- дать мишени полностью высохнуть при комнатной температуре (не менее 15 мин);
- мишень готова к использованию.

**Примечание.** Чистые мишени могут храниться в сухом месте при комнатной температуре продолжительное время.

**МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.**

Поскольку в работе используются концентрированные растворы сильных органических кислот и растворители, все манипуляции с ними при приготовлении рабочих растворов и обработке чипа после исследования должны проводиться с использованием средств индивидуальной защиты (латексных перчаток, очков, фартука), в изолированном рабочем пространстве, оснащенном вытяжной вентиляцией.

**НЕОБХОДИМО ИЗБЕГАТЬ ПОПАДАНИЯ СТОКОВЫХ И РАБОЧИХ РАСТВОРОВ НА ОТКРЫТЫЕ УЧАСТКИ КОЖИ И СЛИЗИСТЫХ.**

В случае попадания раствора кислоты на кожные покровы:

1. Удалить пропитанную кислотой одежду.
2. Промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.
3. Промыть рану раствором соды.
4. Наложить асептическую повязку.
5. Обратиться для оказания квалифицированной медицинской помощи к специалисту, предоставив ему информацию о виде и концентрации поражающего агента.

## Библиография

1. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 30 апреля 2003 г. № 85 «О введении в действие санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.1318—03 «Порядок выдачи санитарно-эпидемиологического заключения о возможности проведения работ с возбудителями инфекционной заболеваемости человека I—IV групп патогенности (опасности), генно-инженерно-модифицированными микроорганизмами, ядами биологического происхождения и гельминтами».

2. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 15 апреля 2003 г. № 42 «О введении в действие санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.1285—03 «Безопасность работы с микроорганизмами I—II групп патогенности (опасности)».

3. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 28 января 2008 г. № 4 «Об утверждении санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2322—08 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

4. СП 1.2.036—95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I—IV групп патогенности», утверждены постановлением Государственного комитета санитарно-эпидемиологического надзора Российской Федерации от 28 августа 1995 г. № 14.

5. Приказ Роспотребнадзора от 8 мая 2008 года № 152 «О совершенствовании организации и проведения мероприятий по профилактике чумы».

6. МУК 4.2.2413—08 «Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы», утверждены Роспотребнадзором 29 июля 2008 г.

7. МУК 4.2.2939—11 «Порядок организации и проведения лабораторной диагностики туляремии для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней», утверждены Роспотребнадзором 14 июля 2011 г.

8. МУК 4.2.2940—11 «Порядок организации и проведения лабораторной диагностики чумы для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней», утверждены Роспотребнадзором 14 июля 2011 г.

9. МУК 4.2.2870—11 «Порядок организации и проведения лабораторной диагностики холеры для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней», утверждены Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 25 мая 2011 г.

10. МУК 4.2.3010—12 «Порядок организации и проведения лабораторной диагностики бруцеллеза для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней», утверждены Роспотребнадзором 29 марта 2012 г.

gost.e-ecolog.ru