Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

1.3. ОБЩИЕ ВОПРОСЫ. ЭПИДЕМИОЛОГИЯ

Организация работы лабораторий, использующих методы электронной и атомно-силовой микроскопии при исследовании культур микроорганизмов I—IV групп патогенности

Методические указания
МУ 1.3.3103—13

Издание официальное

Москва • 2013

gost.e-ecolog.ru

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

1.3. ОБЩИЕ ВОПРОСЫ. ЭПИДЕМИОЛОГИЯ

Организация работы лабораторий, использующих методы электронной и атомно-силовой микроскопии при исследовании культур микроорганизмов I—IV групп патогенности

Методические указания
МУ 1.3.3103—13

ББК 51.9
О64

О64 **Организация** работы лабораторий, использующих методы электронной и атомно-силовой микроскопии при исследовании культур микроорганизмов I—IV групп патогенности: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2013.—20 с.

ISBN 978—5—7508—1213—4

1. Разработаны: ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора (Н. П. Коннов, Д. В. Уткин, О. С. Кузнецов, Н. А. Осина, С. А. Щербакова, В. В. Кутырев); ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора (Н. П. Агеева, В. Я. Курилов, Е. В. Молчанова); ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора (А. Б. Мазрухо, Н. Р. Телесманич, И. Я. Черепахин, О. С. Чемисов, И. А. Иванов); ФБУН «ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» (О. С. Таранов, Б. Н. Зайцев, Л. Е. Булычев, В. В. Золин, А. А. Сергеев, А. П. Агафонов, А. Н. Сергеев); ФБУН «ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора (С. Г. Игнатов, А. Г. Волошин, С. Н. Вирясов, Г. Н. Федюкина, В. В. Мочалов, В. Д. Потапов, В. Н. Герасимов, Е. А. Тюрин, М. В. Храмов, И. А. Дятлов).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию при Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол от 30 мая 2013 г. № 1).

3. Утверждены руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 16 августа 2013 г.

ББК 51.9

Редакторы Н. Е. Акопова, Н. В. Кожока
Технический редактор Е. В. Ломанова

Подписано в печать 06.12.13

Формат 60x88/16 Печ. л. 1,25

Тираж 200 экз. Заказ 87

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 и тиражирован
отделом издательского обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а
Отделение реализации, тел./факс 8(495)952-50-89

© Роспотребнадзор, 2013
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2013

Содержание

1. Область применения 4
2. Нормативные ссылки 4
3. Термины и сокращения 5
4. Общие положения 6
5. Требования к организации работ в лабораториях, выполняющих исследования микроорганизмов I—IV групп патогенности с применением атомно-силовой и электронной микроскопии 6
6. Общие требования к помещениям и оборудованию лабораторий, выполняющих исследования микроорганизмов I—IV групп патогенности с применением атомно-силовой и электронной микроскопии 8
7. Требования к проведению работ 10
8. Требования к защитной одежде 12
9. Требования к обработке помещений, обеззараживанию инфицированного материала и утилизации отходов после проведения исследований 12
Приложение 1. Порядок подготовки, обеззараживания культур микроорганизмов I—IV групп патогенности и приготовления препаратов для проведения атомно-силовой и электронной микроскопии 13
Приложение 2. Фиксаторы и буферные растворы 19
Библиографические данные 20

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
16 августа 2013 г.

1.3. ОБЩИЕ ВОПРОСЫ. ЭПИДЕМИОЛОГИЯ

Организация работы лабораторий, использующих методы электронной и атомно-силовой микроскопии при исследовании культур микроорганизмов I—IV групп патогенности

Методические указания МУ 1.3.3103—13

1. Область применения

1.1. Методические указания предназначены для специалистов лабораторий, использующих методы атомно-силовой и электронной микроскопии для проведения экспериментальных исследований микроорганизмов I—IV групп патогенности.

1.2. Методические указания определяют принципы организации работ при исследовании культур микроорганизмов I—IV групп патогенности с использованием методов атомно-силовой и электронной микроскопии, включающих этапы обеззараживания культур микроорганизмов, приготовления препаратов суспензий клеток бактерий для атомно-силовой и электронной микроскопии, проведения атомно-силовой и электронной микроскопии, утилизации отходов после проведения исследований.

1.3. Методические указания регламентируют деятельность персонала лаборатории при выполнении экспериментальной работы с помощью методов атомно-силовой и электронной микроскопии, проводимых с использованием оборудования, разрешенного к применению на территории Российской Федерации в установленном порядке.

2. Нормативные ссылки

2.1. СП 1.3.1285—03 «Безопасность работы с микроорганизмами I—II групп патогенности (опасности)».

2.2. СП 1.3.2628—10. Изм. и доп. 1 к СП 1.3.1285—03 «Безопасность работы с микроорганизмами I—II групп патогенности (опасности)».

2.3. СП 1.3.2322—08 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

2.4. СП 1.3.2518—09. Доп. и изм. 1 к СП 1.3.2322—08 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезнсй».

2.5. СП 1.3.2885—11. Доп. и изм. 2 к СП 1.3.2322—08 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

2.6. СП 1.2.036—95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I—IV групп патогенности».

2.7. СанПиН 2.1.7.2790—10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

2.8. СП 2.6.1.2612—10 «Основные санитарные правила обеспечения радиационной безопасности (ОСПОРБ-99/2010)».

2.9. СанПиН 2.6.1.2748—10 «Гигиенические требования по обеспечению радиационной безопасности при работе с источниками неиспользуемого рентгеновского излучения».

2.10. СанПиН 2.6.1.2523—09 «Нормы радиационной безопасности (НРБ-99/2009)».

2.11. Межгосударственный стандарт ГОСТ 17925—72 «Знак радиационной опасности».

2.12. Межгосударственный стандарт ГОСТ ИСО 14644-1—2002 «Чистые помещения и связанные с ними контролируемые среды. Часть 1. Классификация чистоты воздуха».

2.13. Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р 8.635—2007 «ГСИ. Микроскопы сканирующие зондовые атомно-силовые. Методика калибровки».

2.14. Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р 8.630—2007 «ГСИ. Микроскопы сканирующие зондовые атомно-силовые. Методика поверки».

2.15. Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р 8.636—2007 «ГСИ. Микроскопы электронные растровые. Методика калибровки».

2.16. Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р 8.594—2009 «ГСИ. Микроскопы электронные растровые. Методика поверки».

2.17. Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р ИСО 14644-5—2005 «Чистые помещения и связанные с ними контролируемые среды. Часть 5. Эксплуатация».

2.18. Государственный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р 50723—94 «Лазерная безопасность. Общие требования при разработке и эксплуатации лазерных изделий».

3. Термины и сокращения:

АСМ – атомно-силовая микроскопия;

мкЗв/ч (микрозиверт в час) – единица измерения мощности эквивалентной дозы; 1мкЗв/ч=100 мкР/ч;

об./мин – обороты в минуту;

ПБА – патогенные биологические агенты;

РЭМ – растровая электронная микроскопия;

ТЭМ – трансмиссионная электронная микроскопия;

ЭМ – электронная микроскопия.

4. Общие положения

4.1. Атомно-силовая микроскопия является одним из методов сканирующей зондовой микроскопии.

4.2. Атомно-силовая микроскопия основана на сканировании поверхности исследуемого образца зондом микроскопа, исследовании микрорельефа и локальных свойств поверхности образца с нанометровым разрешением.

4.3. Атомно-силовая микроскопия включает контактные и полуконтактные методы.

4.4. Методы атомно-силовой микроскопии используют для изучения поверхностной структуры клеток микроорганизмов, локальных свойств поверхности клеток.

4.5. Электронная микроскопия основана на электростатическом или электромагнитном фокусировании потока электронов в вакууме на исследуемый образец и визуализации картины распределения электронов на флуоресцирующем экране.

4.6. Электронная микроскопия подразделяется на растровую (сканирующую) электронную микроскопию и трансмиссионную (просвечивающую) электронную микроскопию.

4.7. Методы растровой электронной микроскопии используют для изучения поверхностной структуры клеток микроорганизмов, субклеточных структур, микроколоний микроорганизмов.

4.8. Методы трансмиссионной электронной микроскопии используют для изучения внутренней ультраструктуры клеток микроорганизмов, поверхностных и внутриклеточных структур, определения локализации эпитопов прикрепления специфических антител с использованием функционализированных наночастиц коллоидного золота.

5. Требования к организации работ в лабораториях, выполняющих исследования микроорганизмов I—IV групп патогенности с применением атомно-силовой и электронной микроскопии

5.1. Исследование культур микроорганизмов I—IV групп патогенности методами атомно-силовой и электронной микроскопии требует

обеспечения и соблюдения персоналом правил биологической, радиационной безопасности и требований безопасности при эксплуатации приборов, содержащих источник лазерного излучения.

5.2. Биологическая безопасность работы при исследовании культур микроорганизмов I—II групп патогенности должна быть обеспечена в соответствии с действующими нормативно-методическими документами, регламентирующими работу с микроорганизмами I—II групп патогенности, с микроорганизмами III—IV групп патогенности и регламентирующими порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I—IV групп патогенности.

5.3. Подготовка проб для исследования методами электронной и атомно-силовой микроскопии проводится в два этапа. На первом этапе проводится обеззараживание с составлением Акта об инактивации и одновременно фиксация микроорганизмов. Работы проводят в организациях, имеющих лицензию на деятельность, связанную с возбудителями инфекционных заболеваний человека, в лабораториях, имеющих санитарно-эпидемиологическое заключение о возможности проведения данных работ, выданное в установленном порядке. Дальнейшая пробоподготовка и непосредственно микроскопическое исследование может проводиться в специализированной микроскопической лаборатории (в том числе, находящейся в другой организации) без соблюдения требований санитарно-эпидемиологических правил. Решение о возможности передачи инактивированного материала в другую организацию принимает руководитель организации.

5.4. Радиационная безопасность при проведении работ с использованием электронной микроскопии должна быть обеспечена в соответствии с действующими нормативно-методическими документами.

5.5. Электронные микроскопы, генерирующие ионизирующее излучение, в условиях нормальной эксплуатации которых мощность эквивалентной дозы в любой доступной точке на расстоянии 0,1 м от внешней поверхности превышает 1,0 мкЗв/ч, допускаются к эксплуатации при наличии санитарно-эпидемиологического заключения о соответствии условий работы с ними санитарным правилам и подлежат обязательному радиационному контролю и учету.

5.6. Радиационный контроль должен осуществляться не реже 1 раза в год на рабочих местах персонала дозиметрическими приборами, предназначенными для проведения измерений рентгеновского излучения соответствующей энергии, и имеющими действующее свидетельство о метрологической поверке.

5.7. Работу с использованием электронных микроскопов, мощность эквивалентной дозы которых в любой доступной точке на расстоянии

0,1 м от внешней поверхности превышает 1,0 мкЗв/ч, проводят в лабораториях, имеющих специальное разрешение (лицензию) на право проведения данных работ, выданное в установленном порядке органами, осуществляющими государственный санитарно-эпидемиологический надзор и уполномоченными на ведение лицензирования, с соблюдением требований ОСПОРБ-99/2010 и СанПиН 2.6.1.2748—10.

5.8. Санитарно-эпидемиологическое заключение о соответствии условий работы с электронными микроскопами санитарным правилам действительно на срок не более пяти лет. По истечении срока действия санитарно-эпидемиологического заключения по запросу юридического или физического лица органы, осуществляющие государственный санитарно-эпидемиологический надзор, решают вопрос о продлении срока его действия.

5.9. Электронные микроскопы, генерирующие ионизирующее излучение, в условиях нормальной эксплуатации которых мощность эквивалентной дозы в любой доступной точке на расстоянии 0,1 м от внешней поверхности не превышает 1,0 мкЗв/ч, освобождаются от радиационного контроля и учета.

5.10. Лаборатории, осуществляющие работу с использованием электронных микроскопов, мощность эквивалентной дозы которых в любой доступной точке на расстоянии 0,1 м от внешней поверхности не превышает 1,0 мкЗв/ч, освобождаются от необходимости получения специального разрешения (лицензии) на право проведения данных работ.

5.11. Лазерная безопасность при эксплуатации сканирующих зондовых атомно-силовых микроскопов, имеющих источник лазерного излучения 2 класса опасности, должна быть обеспечена в соответствии с ГОСТ Р 50723—94.

6. Общие требования к помещениям и оборудованию лабораторий, выполняющих исследования микроорганизмов I—IV групп патогенности с применением атомно-силовой и электронной микроскопии

6.1. Лаборатория, осуществляющая экспериментальные исследования культур микроорганизмов I—IV групп патогенности с использованием методов атомно-силовой и (или) электронной микроскопии, должна включать следующий набор самостоятельных рабочих зон (помещений), обеспечивающих поточность движения исследуемого материала:

- первичной подготовки и обеззараживания материала (рабочая зона 1);
- приготовления препаратов для атомно-силовой и (или) электронной микроскопии (рабочая зона 2);

• исследования препаратов с использованием методов атомно-силовой и (или) электронной микроскопии (рабочая зона 3).

6.2. В случае если лаборатория, в которой проводятся исследования с использованием методов атомно-силовой и электронной микроскопии, выделена в самостоятельную структурную единицу и материал для исследования поступает в нее уже инактивированным, рабочая зона 1 располагается в помещениях других лабораторий, отвечающих требованиям биологической безопасности при работе с ПБА соответствующей группы патогенности.

В рабочей зоне 1 осуществляют работу с ПБА I—IV групп патогенности: культивирование на твердых и жидких питательных средах, приготовление взвесей микроорганизмов, обеззараживание взвесей бактерий для проведения исследований с использованием методов атомно-силовой и электронной микроскопии.

6.3. Рабочую зону 1 располагают на территории «заразной» зоны в боксированных помещениях или помещениях, оснащенных боксами биологической безопасности II или III классов для проведения микробиологических исследований в соответствии с действующими нормативно-методическими документами.

6.4. В рабочей зоне 2 проводят приготовление и хранение рабочих растворов, фиксаторов, буферных растворов, приготовление пленок-подложек для электронной микроскопии, приготовление препаратов из обеззараженного материала для исследования методом атомно-силовой и электронной микроскопии.

6.5. Рабочую зону 2 располагают в помещениях «чистой» зоны (биохимической, препараторской и т. п.), где не проводят непосредственную работу с ПБА. Помещения рабочей зоны 2 должны быть оборудованы вытяжным шкафом и холодильником с морозильной камерой для хранения реактивов.

6.6. Рабочая зона 3 предназначена для проведения атомно-силовой и (или) электронной микроскопии.

6.7. Рабочую зону 3 располагают в помещениях «чистой» зоны (биофизической, электронной и (или) атомно-силовой микроскопии и т. п.), где не проводят непосредственную работу с ПБА. Помещение рабочей зоны 3 согласно ГОСТ Р 8.635—07, ГОСТ Р 8.630—07, ГОСТ Р 8.636—07, ГОСТ Р 8.594—09 должно соответствовать классу чистоты не более 8 ИСО по ГОСТ ИСО 14644-1—02, ГОСТ Р ИСО 14644-5—05. Помещения рабочей зоны 3 должны быть оборудованы приточно-вытяжной вентиляцией, обеспечивающей требуемый класс чистоты.

6.8. Работу с электронными микроскопами, мощность эквивалентной дозы которых в любой доступной точке на расстоянии 0,1 м от внешней поверхности превышает 1,0 мкЗв/ч, осуществляют в помеще-

ниях, зданиях (сооружениях) и на территориях, указанных в санитарно-эпидемиологическом заключении.

6.9. На дверях помещения, где проводится работа с использованием электронных микроскопов, мощность дозы излучения от которых в рабочем положении превышает 1,0 мкЗв/ч на расстоянии 0,1 м от доступных частей внешней поверхности микроскопа, должны быть указаны назначение помещения и знак радиационной опасности по ГОСТ 17925—72.

6.10. Дополнительных требований к отделке помещений рабочей зоны 3, их освещенности и вентиляции не предъявляется и санитарно-эпидемиологическое заключение на проект размещения не требуется.

6.11. При использовании электронных микроскопов, мощность дозы излучения от которых в рабочем положении не превышает 1,0 мкЗв/ч на расстоянии 0,1 м от доступных частей внешней поверхности микроскопа, специальные требования к помещениям по обеспечению радиационной безопасности не предъявляются.

6.12. Допускается объединение рабочих зон 2 и 3 с выделением отдельных рабочих подзон.

6.13. Приборы, оборудование и средства измерений, используемые в работе лаборатории, выполняющей исследования с применением атомно-силовой и электронной микроскопии, должны быть аттестованы, технически исправны, иметь технический паспорт и рабочую инструкцию по эксплуатации. Средства измерения подвергают метрологическому контролю в установленные сроки.

7. Требования к проведению работ

7.1. Не допускается исследование необеззараженного материала, содержащего ПБА I—IV групп патогенности методами атомно-силовой и электронной микроскопии, в рабочих зонах 2 и 3.

7.2. Обеззараживание исследуемого материала осуществляют в соответствии с настоящими методическими указаниями (прилож. 1) в рабочей зоне 1 в боксированном помещении для проведения микробиологических исследований или комнате, оснащенной боксом биологической безопасности II или III класса.

7.3. Исследование материала, содержащего ПБА I—IV групп патогенности, осуществляют специалисты с высшим или средним медицинским или биологическим (ветеринарным) образованием, окончившие соответствующие курсы специализации с освоением методов безопасной работы с ПБА I—IV групп, прошедшие подготовку на лицензированных курсах профессиональной переподготовки по специальности «Бактериология. Основы безопасной работы с патогенными биологическими агентами (ПБА) I—II групп» или «Вирусология. Основы безопасной работы с патогенными биологическими агентами (ПБА) I—IV групп».

7.4. Допуск персонала к работе в рабочей зоне 1 осуществляется в порядке, регламентированном действующими санитарно-эпидемиологическими правилами проведения работ с микроорганизмами I—IV групп патогенности.

7.5. К работе на атомно-силовом и электронном микроскопе допускаются лица, не имеющие медицинских противопоказаний, прошедшие обучение и инструктаж правил безопасности ведения работ и действующих в организации инструкций.

7.6. Руководитель учреждения утверждает список лиц, допущенных к работе на атомно-силовом и электронном микроскопе, обеспечивает их необходимое обучение и инструктаж, назначает лиц, ответственных за радиационный контроль.

7.7. Работу с ПБА I—IV групп патогенности, их обеззараживание осуществляют в рабочей зоне 1.

7.8. Исследуемый материал подлежит передаче из рабочей зоны 1 в рабочую зону 2 только после обеззараживания с составлением Акта об инактивации.

7.9. Материал из рабочей зоны 1 переносят или передают через передаточный шлюз в рабочую зону 2 в маркированных стеклянных или пластиковых пробирках (для м/о I—II групп патогенности – только в пластиковых), помещенных в металлические или пластмассовые контейнеры, предварительно обработанные регламентированными дезинфицирующими средствами.

7.10. В рабочей зоне 2 осуществляют последующую подготовку материала и приготовление препаратов, готовых для просмотра в атомно-силовой и (или) электронный микроскоп.

7.11. Работу с применением четырехокиси осмия, глутаральдегида, ацетона, амилацетата, уранилацетата, какодилата натрия в рабочей зоне 2 проводят только в вытяжном шкафу.

7.12. После приготовления препаратов в рабочей зоне 2 их передают в рабочую зону 3 для проведения атомно-силовой и (или) электронной микроскопии.

7.13. Материал из рабочей зоны 2 в рабочую зону 3 переносят в маркированных пластиковых чашках Петри, помещенных в металлические или пластмассовые контейнеры, или непосредственно в пробирках или флаконах.

7.14. В рабочей зоне 3 осуществляют напыление образцов металлами для исследования методом РЭМ, исследуют приготовленные препараты с помощью атомно-силового или электронного микроскопа.

7.15. По окончании исследований в рабочей зоне 3 отработанный материал подлежит утилизации согласно п. 9.6 настоящих методических указаний.

7.16. При подключении атомно-силового и электронного микроскопа необходимо использование источников бесперебойного электропитания.

8. Требования к защитной одежде

8.1. При работе с ПБА I—IV групп патогенности в рабочей зоне 1, оборудованной боксами биологической безопасности II или III класса используют, в зависимости от вида возбудителя, защитный костюм, тип которого соответствует требованиям действующих нормативно-методических документов.

8.2. В помещениях рабочих зон 2 и 3 персонал одет в рабочую одежду (пижама или комбинезон, сменная обувь).

8.3. При работе с растворами четырехокиси осмия, глутаральдегида, ацетона, амилацетата, уранилацетата, какодилата натрия, эпоксидными смолами, их катализаторами и уплотнителями в рабочей зоне 2 дополнительно используют резиновые перчатки и медицинский халат.

9. Требования к обработке помещений, обеззараживанию инфицированного материала и утилизации отходов после проведения исследований

9.1. Обработку помещений рабочей зоны 1 проводят в соответствии с требованиями действующих нормативно-методических документов.

9.2. Обеззараживание материала, предназначенного для исследования методами атомно-силовой и электронной микроскопии, осуществляют в рабочей зоне 1 в соответствии с настоящими методическими указаниями (прилож. 1).

9.3. Обеззараживание посевов микроорганизмов, посуды, защитной одежды в помещениях рабочей зоны 1 и утилизацию твёрдых и жидких отходов осуществляют в соответствии с требованиями действующих нормативно-методических документов.

9.4. Обработка помещений рабочей зоны 2 включает ежедневную текущую уборку помещений влажным способом после окончания рабочего дня и еженедельную генеральную уборку с применением моющих средств.

9.5. Обработка помещений рабочей зоны 3 должна обеспечивать уровень чистоты класса 8 ИСО в соответствии с ГОСТ Р ИСО 14644-5—2005.

9.6. Отработанный исследуемый материал и твердые отходы после проведения исследований (микропробирки, наконечники, перчатки) из рабочих зон 2 и 3 утилизируют в соответствии с действующими нормативно-методическими документами – выносят в контейнер для мусора с последующим вывозом на полигон бытовых отходов, жидкие отходы сливают в канализацию.

Приложение 1
(обязательное)

Порядок подготовки, обеззараживания культур микроорганизмов I—IV групп патогенности и приготовления препаратов для проведения атомно-силовой и электронной микроскопии

1. Работу по подготовке и обеззараживанию культур микроорганизмов I—IV групп патогенности проводят в боксированных помещениях рабочей зоны 1 с соблюдением требований действующих нормативно-методических документов

2. Подготовку и обеззараживание взвесей культур бактерий I—IV групп патогенности для исследования методами АСМ и ТЭМ проводят следующим способом:

• агаровую культуру микроорганизмов суспендируют в 1—2 мл 2,5 %-го глутаральдегидного фиксатора (pH 7,2) (прилож. 2) – для неспорообразующих микроорганизмов или в 1—2 мл 5 %-го глутаральдегидного фиксатора (pH 7,5—8,5) – для спорообразующих микроорганизмов и доводят до концентрации, равной 10 единицам отраслевого стандартного образца мутности ГИСК им. Л. А. Тарасевича (ОСО 42-28-59-86П) для возбудителей чумы, туляремии, бруцеллеза, сибирской язвы и 5 единицам ОСО 42-28-59-86П для возбудителя холеры. Взвеси микроорганизмов инкубируют в течение 2 ч при температуре 4 °С – для неспорообразующих микроорганизмов, в течение 3 ч при температуре 25 °С – для спорообразующих микроорганизмов.

Составляют акт об инактивации культур бактерий I—IV групп патогенности.

Обеззараженную взвесь микроорганизмов передают в рабочую зону 2 для приготовления препаратов для АСМ и ЭМ.

2.1. Для исследования методом АСМ взвесь объемом 1 мл переносят в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл и центрифугируют при 6 000 об./мин в течение 20 мин. Супернатант отбирают в емкость для сброса отходов. Осадок суспендируют в 1 мл дистиллированной воды и повторно центрифугируют при 6 000 об./мин в течение 20 мин. Супернатант отбирают, а осадок суспендируют в 1 мл дистиллированной воды. Взвесь микроорганизмов объемом 4 мкл наносят на твердую подложку (покровное стекло, слюду, пирографит и др.). Препарат высушивают на воздухе и переносят в рабочую зону 3 для последующего исследования методом атомно-силовой микроскопии.

2.2. Для приготовления ультратонких срезов для исследования методом ТЭМ взвесь переносят в микроцентрифужные пробирки по 1 мл и центрифугируют в течение 20 мин при 6 000 об./мин. Супернатант отбирают пипеткой и сливают в емкость для сброса отходов, осадок ресуспендируют в 0,1 мл 1 %-го осмиевого фиксатора (прилож. 2) и инкубируют 1,5 ч при температуре не ниже 15 °С [1]. Взвесь снова центрифугируют в течение 20 мин при 6 000 об./мин. Супернатант отбирают пипеткой и сливают в емкость для сброса отходов, к осадку добавляют 1 мл 50 %-го охлажденного до температуры 4—6 °С этанола, инкубируют в течение 10 мин при температуре 4—6 °С, не суспендируя осадок, затем надосадочную жидкость отбирают и вносят 1 мл 70 %-го этанола и инкубируют в течение 6—18 ч при температуре 4—6 °С, не суспендируя осадок, затем процедуру повторяют дважды с 96 %-м этанолом и инкубируют по 20 мин при температуре 4—6 °С, затем добавляют 100 %-й этанол два раза по 10 мин.

Супернатант из пробирки с материалом отбирают в емкость для сброса отходов, к осадку добавляют раствор пропиленоксида или абсолютного ацетона и выдерживают 1—2 мин, процедуру повторяют. К раствору добавляют заливочную смесь эпоксидных смол с катализатором по следующей схеме:

• заливочная смесь/пропиленоксид (1 : 2) – инкубируют в течение 30 мин—1 ч при комнатной температуре;

• заливочная смесь/пропиленоксид (1 : 1) – инкубируют в течение 30 мин—1 ч при комнатной температуре;

• заливочная смесь/ацетон (2 : 1) – инкубируют в течение 1—1,5 ч при комнатной температуре.

Материал суспендируют, в зависимости от объема капсулы, в 300—500 мкл заливочной смеси с катализатором и переносят в капсулы Бима или капсулы других типов. Полимеризацию образцов проводят при температуре 56 °С в течение 18—24 ч. После полимеризации смолы застывшие блоки вынимают из капсулы. Блок закрепляют в держателе вершиной пирамиды вверх и помещают держатель в зажим микротома, осуществляют заточку блоков и приготовление ультратонких срезов. Срезы монтируют на сетки с угольными и/или стабилизированными углем формваровыми (коллодиевыми) пленками, либо на сетки без пленок-подложек. Срезы контрастируют насыщенным 1 %-м раствором уранилацетата в 70 %-м этаноле при температуре 56 °С в течение 5—10 мин или 1 %-м водным раствором уранилацетата при комнатной температуре в течение 1—1,5 ч и (или) цитратом свинца. Для этого сетку со

срезом, обращенным вниз, опускают на поверхность контрастирующего вещества в чашке Петри. После контрастирования сетки берут пинцетом, погружают в дистиллированную воду для промывки, высушивают на фильтровальной бумаге и переносят в чашке Петри в рабочую зону 3 для исследования методом ТЭМ.

2.3. Для исследования взвесей методом негативного контрастирования пинцетом берут сетку с обращенной вверх пленкой-подложкой. На сетку наносят 1 каплю обеззараженной взвеси микроорганизмов. После минутной экспозиции с поверхности сетки удаляют излишек жидкости путем касания конца сетки с фильтровальной бумагой. После отбора жидкости фильтровальную бумагу помещают в емкость для сброса отходов. После высушивания на поверхность сетки наносят 3—4 капли 1 %-го осмиевого фиксатора (прилож. 2) и инкубируют 1—1,5 мин при комнатной температуре. Затем на сетку наносят 2—4 капли 0,1 моль/л какодилатного буфера, затем 2—4 капли дистиллированной воды для удаления солей буферного раствора. Избыток жидкости с поверхности сетки удаляют фильтровальной бумагой. На поверхность сетки наносят 1 каплю раствора для негативного контрастирования (1—2 %-й раствор натриевой или калиевой соли фосфорно-вольфрамовой кислоты, 1—2 %-й раствор уранилацетата, раствор ацетата или формиата натрия, молибдата аммония) на 1—3 мин. Избыток жидкости с поверхности сетки удаляют фильтровальной бумагой, сетки высушивают на воздухе 10—15 мин.

3. Подготовку, обеззараживание и приготовление препаратов мазков и биопленок культур микроорганизмов I—IV групп патогенности для исследования методами АСМ проводят следующим способом:

• мазки для исследования и биопленки микроорганизмов готовят на покровном стекле. Покровное стекло с клетками микроорганизмов погружают в 2,5 %-й глутаральдегидный фиксатор (pH 7,2) – для неспорообразующих микроорганизмов или в 5,0 %-й глутаральдегидный фиксатор (pH 7,5—8,5) – для спорообразующих микроорганизмов, инкубируют в течение 2 ч при температуре 4 °С – для неспорообразующих микроорганизмов, в течение 3 ч при температуре 25 °С – для спорообразующих микроорганизмов. Стекла промывают троекратно дистиллированной водой и высушивают на воздухе. Стекла переносят для просмотра в рабочую зону 3.

4. Подготовку, обеззараживание и приготовление препаратов культур микроорганизмов I—IV групп патогенности для исследования методом РЭМ проводят следующим способом:

• стерильный мембранный фильтр кладут на твердую питательную среду. На него наносят суспензию бактерий в концентрации (1—1,5)×10^9 м.к./мл и инкубируют в термостате при температуре 37 °С (для возбудителей холеры, туляремии, бруцеллеза, сибирской язвы), 37 и/или 28 °С (для возбудителя чумы). После необходимого времени инкубации фильтры осторожно снимают пинцетом и погружают в чашку Петри с 5 %-м глутаральдегидным фиксатором (прилож. 2) и инкубируют в течение 3 ч. Затем фильтры отмывают в 0,1 моль/л какодилатном буфере в чашке Петри. Фильтры в чашке Петри переносят в рабочую зону 2. Проводят дегидратацию материала в спиртах возрастающей концентрации согласно п. 2.2.

Мембранные фильтры переносят на столик вакуумного поста. В условиях высокого вакуума (/2—3/ × 10^4 торр и выше) исследуемый материал напыляют металлами (золотом, платиной, алюминием) или сплавами.

5. Подготовку и обеззараживание культур клеток, зараженных вирусами I—II групп патогенности, для микроскопического исследования проводят следующим способом:

• все работы с органами и тканями, а также с другими предназначенными для исследования методами микроскопии препаратами, подозрительными на контаминирование вирусами I—II групп патогенности, проводятся в «заразной» зоне в строгом соответствии с действующими нормативно-методическими документами.

Суспензию культур клеток в питательной среде переносят в центрифужную пробирку и центрифугируют при 5 000 об./мин 20 мин. Супернатант удаляют, а пробирку полностью заполняют 4 %-м раствором формальдегида, соблюдая условие, что на каждый миллион клеток должно приходиться не менее 1 мл 4 %-го раствора формальдегида. Культуру клеток в 4 %-м растворе формальдегида инкубируют не менее 48 ч при температуре 4—6 °С при полной замене через каждые 24 ч фиксирующего раствора свежим 4 %-м раствором формальдегида.

Органы и ткани (инфицированные хорион-аллантоисные оболочки, фрагменты органов и тканей куриных эмбрионов, лабораторных животных и человека), предназначенные для исследования, промывают в стерильном физиологическом растворе и помещают в стерильный пластиковый флакон. Толщина отобранной пробы органа или ткани не должна превышать 0,5 см. Соотношение объема фиксирующего раствора (4 %-го раствора формальдегида) и общего суммарного объема фрагментов органов и тканей должно быть не менее чем 10 к 1 (10 : 1). Флакон закрывают, помещают во вторичную упаковку (герметичный контейнер), по-

мещают в холодильник и выдерживают в течение 5 сут. при температуре 4—6 °С. Через 5 сут. от начала фиксации препаратов 4 %-м раствором формальдегида флакон вскрывают, фиксирующий раствор сливается и свежий 4 %-й раствор формальдегида наливается до верха емкости. При этом должно соблюдаться соотношение 10 объемов фиксирующего раствора к 1 объему исследуемого материала (10 : 1). Флакон закрывают, помещают во вторичную упаковку (герметичный контейнер), помещают в холодильник и выдерживают в течение 5 сут. при температуре 4—6 °С.

После проведенной процедуры материал считается обеззараженным, составляется акт об инактивации и материал может передаваться из «заразной» зоны в «чистую». Герметичную пробирку с инактивированным препаратом, полностью заполненную 4 %-м раствором формальдегида, помещают в емкость с 3 %-м раствором хлорамина или 6 %-м раствором перекиси водорода (экспозиция не менее 20 мин) и передают из «заразной» зоны в рабочую зону 2 («чистую» зону) через передаточный шлюз. В передаточном шлюзе емкость без крышки с погруженной в 3 %-й раствор хлорамина или 6 %-й раствор перекиси водорода пробиркой обрабатывают аэрозолем 3 %-го раствора хлорамина или 6 %-го раствора перекиси водорода, время экспозиции в передаточном шлюзе 60 мин.

В рабочей зоне 2 образцы подвергают обезвоживанию и пропитке эпоксидными смолами, получают твердые блоки, с которых готовят ультратонкие срезы, как описано выше (п. 2.2 прилож. 1). Ультратонкие срезы исследуют методом ТЭМ.

6. Подготовку и обеззараживание культур клеток, зараженных вирусами III—IV групп патогенности, для микроскопического исследования проводят следующим способом:

• все работы с органами и тканями, а также с другими предназначенными для исследования методами микроскопии препаратами, подозрительными на контаминирование вирусами III—IV групп патогенности, проводятся в «заразной» зоне в строгом соответствии с действующими нормативно-методическими документами.

Суспензию культур клеток в питательной среде переносят в центрифужную пробирку и центрифугируют при 5 000 об./мин 20 мин. Супернатант удаляют, а пробирку полностью заполняют 4 %-м раствором формальдегида, соблюдая условие, что на каждые 10 млн клеток должно приходиться не менее 1 мл 4 %-го раствора формальдегида. Культуру клеток в 4 %-м растворе формальдегида инкубируют не менее 24 ч при температуре 4—6 °С.

Органы и ткани (инфицированные хорион-аллантоисные оболочки, фрагменты органов и тканей куриных эмбрионов, лабораторных животных и человека), предназначенные для исследования, промывают в стерильном физиологическом растворе и помещают в стерильный пластиковый флакон. Толщина отобранной пробы органа или ткани не должна превышать 0,5 см. Соотношение объема фиксирующего раствора (4 %-го раствора формальдегида) и общего суммарного объема фрагментов органов и тканей должно быть не менее чем 5 к 1 (5 : 1). Органы и ткани в 4 %-м растворе формальдегида инкубируют не менее 24 ч при температуре 4—6 °С.

После проведенной процедуры материал считается обеззараженным, составляется акт об инактивации, и материал может передаваться из «заразной» зоны в «чистую». Пробирку с инактивированным препаратом передают из «заразной» зоны в рабочую зону 2 («чистую» зону) через передаточный шлюз. В передаточном шлюзе емкость обрабатывают аэрозолем 3 %-го раствора хлорамина или 6 %-го раствора перекиси водорода, время экспозиции в передаточном шлюзе 30 мин.

В рабочей зоне 2 образцы подвергают обезвоживанию и пропитке эпоксидными смолами, получают твердые блоки, с которых готовят ультратонкие срезы, как описано выше (п. 2.2 прилож. 1). Ультратонкие срезы исследуют методом ТЭМ.

7. Время обработки материала может быть увеличено при строгом соблюдении остальных параметров данных режимов. На всех этапах обработки и обеззараживания исследуемый материал считают инфицированным, и манипуляции с ним проводят в соответствии с действующими нормативно-методическими документами.

После обеззараживания готовят акт об инактивации, проводят дальнейшую подготовку препаратов для атомно-силовой и электронной микроскопии в рабочей зоне 2.

Приложение 2
(рекомендуемое)

Фиксаторы и буферные растворы

1. Приготовление 2,5 %-го глутаральдегидного фиксатора по D.Sabatini *et al.* [2, 3]

К 25 мл 0,2 моль/л какодилатного буфера добавляют 5 мл 25 %-го раствора глутаральдегида. pH раствора доводят до 7,2. Объем раствора доводят бидистилированной водой до 50 мл. Фиксатор хранят при температуре 4 °С не более 3 суток, при температуре 10—25 °С – не более суток.

2. Приготовление 5 %-го глутаральдегидного фиксатора по D. Sabatini *et al.* [2, 3]

К 25 мл 0,2 моль/л какодилатного буфера добавляют 10 мл 25 %-го раствора глутаральдегида; pH раствора доводят до 7,5—8,5. Объем раствора доводят бидистилированной водой до 50 мл. Фиксатор хранят при температуре 4 °С не более 3 сут., при температуре 10—25 °С – не более суток.

3. Приготовление 1 %-го осмиевого фиксатора по G. Milloning [4, 5]

Для приготовления 1 %-го осмиевого фиксатора используют следующие растворы:

А: 2,26 % раствор $NaH_2PO_4 \times H_2O$;

Б: 2,52 % раствор NaOH;

В: 5,4 % раствор глюкозы.

Для приготовления 5 мл 1 %-го осмиевого фиксатора к 3,74 мл раствора А добавляют 0,76 мл раствора Б, 0,5 мл раствора В и 0,05 г OsO_4. Фиксатор хранят при температуре минус (18—20) °С в течение 2—3 недель, при температуре 2—5 °С – не более 3 сут., при температуре 10—25 °С – не более суток.

4. Приготовление 4 %-го раствора формальдегида

В 50 мл 0,1 моль фосфатного буфера (pH 7,4—7,6) растворяют 2 г формальдегида, раствор нагревают до температуры 70 °С, помешивая, доводят до полного просветления раствора. Затем раствор охлаждают и фильтруют. Для количественного определения содержания формальдегида в фиксирующем растворе используют реакционно-хроматографический метод в соответствии с МУК 4.1.653—96 [6].

5. Приготовление 0,1 моль/л какодилатного буфера

Растворяют 0,535 г какодилата натрия в 25 мл бидистиллированной воды. Доводят pH раствора до 7,2, добавляя 0,2 моль/л соляной кислоты. Буфер хранят при температуре 4 °С в течение 2—3 недель.

Библиографические данные

1. Методические рекомендации по дезинфицирующим режимам фиксации для электронной микроскопии материала, зараженного возбудителями чумы, сапа, мелиоидоза, холеры, туляремии, бруцеллеза, кокцидиоидоза. Волгоград, 1983. 8 с.

2. Sabatini D.D., Miller F., Barrnett R.J. //J.Histochem.Cytochem. 1964. V. 12. P. 57—71.

3. Sabatini D.D., Bensh K., Barnett R.J. //J. Cell Biol. 1963. Vol. 17, № 1. P. 19—58.

4. Millonig G. //J. Appl. Physics. 1961. V. 32. P. 1637.

5. Millonig G. //Electron Microscopy. New York - London: Acad. Press, 1962. V. 2. P. 8.

6. Методические указания по реакционно-хроматографическому определению формальдегида в воде: МУК 4.1.653—96. М, 1996.

gost.e-ecolog.ru