

**Государственный комитет санитарно-эпидемиологического надзора  
Российской Федерации**

## **МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ**

**по экспериментальному обоснованию ПДК  
микроорганизмов-продуцентов и содержащих их  
готовых форм препаратов в объектах  
производственной и окружающей среды**

**Москва • 1993**

**Экспериментальное обоснование ПДК микроорганизмов-продуцентов и содержащих их готовых форм препаратов в объектах производственной и окружающей среды: Методические указания. – М.: Информационно-издательский центр Госкомсанэпиднадзора России, 1993. – 20 с.**

Документ разработан: Научно-исследовательским объединением практической экологии и токсикологии «Экотокс» (проф. О. Г. Алексеева, проф. Г. А. Багдасарян, к.б.н. П. Л. Зельцер, к.м.н. И. З. Зельцер, д.м.н. Г. Б. Штейнберг, д.м.н. Ж. Г. Умеров); ВНИИ гигиены и токсикологии пестицидов, полимерных и пластических масс (д.м.н. Т. Г. Омелянец, д.м.н. Е. А. Мельникова); ВНИИ антибиотиков (к.м.н. И. И. Прохорова); НИИ общей и коммунальной гигиены им. А. Н. Сысина АМН СССР (д.м.н. В. И. Немира); ЦНИЛ Рижского медицинского института (д.м.н. И. Я. Квятковская, к.м.н. И. М. Ремез, к.б.н. И. А. Иванова); ВНИЦ биологически активных веществ (к.м.н. А. Ф. Гирич).

Рецензенты: д.м.н. В. В. Влодавец (НИИ гигиены им. Ф. Ф. Эрисмана МЗ РСФСР); проф. А. А. Аравийский (ВНИИ антибиотиков и ферментов медицинского назначения); к.м.н. В. В. Шевляков, д.м.н. А. И. Олофир (БелНИСГИ).

Председатель экспертной комиссии: к.м.н. Г. В. Цариченко.

Государственный комитет санитарно-эпидемиологического надзора при Президенте Российской Федерации на основании Закона РСФСР «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» и Постановления Верховного Совета РСФСР «О ратификации Соглашения о создании Содружества Независимых Государств» от 12 декабря 1991 года постановляет:

Установить, что на территории России действуют санитарные правила, нормы и гигиенические нормативы, утвержденные бывшим Министерством здравоохранения СССР, в части, не противоречащей санитарному законодательству Российской Федерации.

Указанные документы действуют впредь до принятия соответствующих нормативных актов Российской Федерации в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения.

## **УТВЕРЖДАЮ**

Начальник Главного санитарно-профилактического  
Управления Минздрава СССР  
В. И. Чибураев  
11 июня 1991 г.  
№ 5789/1-91

## **СОГЛАСОВАНО**

Генеральный директор  
Всесоюзной ассоциации  
профилактической меди-  
цины и экологии «Промедэк»  
П. Л. Зельцер

## **СОГЛАСОВАНО**

Председатель проблемной  
комиссии союзного значе-  
ния «Научные основы гиги-  
ены окружающей среды»,  
академик АМН СССР  
Г. Н. Сидоренко

## **СОГЛАСОВАНО**

Председатель проблемной  
комиссии союзного значе-  
ния «Научные основы гиги-  
ены труда и профпатологии»,  
академик АМН СССР  
Н. Ф. Измеров

# **Методические указания**

**по экспериментальному обоснованию ПДК микроор-  
ганизмов-продуцентов и содержащих их готовых форм  
препаратов в объектах производственной и окружаю-  
щей среды**

С выходом в свет данных методических указаний считать утратившими силу методические указания «Постановка исследований для обоснования предельно допустимых концентраций производственных штаммов микроорганизмов и на их основе готовых форм препаратов в воздухе рабочей зоны» № 2955-83 от 23.12.83.

## **1. Общие положения**

Настоящие методические указания предназначены для специали-  
стов, занимающихся обоснованием гигиенических нормативов в  
объектах производственной и окружающей среды (воздух рабочей зоны,  
атмосферный воздух и вода водоемов) производственных штаммов  
микроорганизмов и готовых форм препаратов, действующим началом  
которых являются живые микроорганизмы или их споры.

Разработка настоящих методических указаний обусловлена широ-  
ким промышленным применением микроорганизмов  
(дрожжеподобные и плесневые грибы, бактерии и др.) в различных  
отраслях народного хозяйства и связанной с этим проблемой  
гигиенического регламентирования их содержания в объектах  
производственной и окружающей среды.

Настоящие методические указания должны способствовать получению сопоставимых материалов, выбору оптимального объема исследований, необходимых для научного обоснования гигиенических регламентов производственных штаммов микро-организмов и готовых форм препаратов на их основе. В то же время предлагаемая схема исследований, их объем и рекомендуемые методы не должны ограничивать творческую инициативу исследователей в плане расширения, углубления методических приемов и использования дополнительных и новых методов исследования.

Регламентированию подлежат штаммы микроорганизмов, прошедшие первичную санитарно-гигиеническую оценку как продуценты для целей микробиологического синтеза и допущенные МЗ СССР к использованию в технологических процессах, а также изготовленные на их основе товарные формы препаратов, содержащие живые клетки или споры.

При направлении для исследования производственных штаммов микроорганизмов или готовой формы препарата с целью обоснования их гигиенического регламента обязательно указывают следующие данные.

Для микроорганизмов:

полное наименование штамма микроорганизма, его таксономическое положение, происхождение, условия культивирования, селективную питательную среду, способ идентификации, способ применения и мощность предприятия.

Для готовых форм препаратов:

товарное название, назначение, способ получения и применения, мощность предприятия, состав (действующее начало, наполнитель, технологические добавки, стадия развития и количество клеток микроорганизмов-продуцентов на единицу массы готового препарата; содержание посторонней микрофлоры; агрегатное состояние препарата, дисперсный состав аэрозоля).

Кроме этого, в обоих случаях должно быть представлено заключение о патогенности и аллергенности штамма, о влиянии его на экосистемы и процессы самоочищения воды и почвы с указанием действующих, пороговых и недействующих концентраций.

В последние годы все большее развитие получает промышленное применение микроорганизмов-продуцентов, конструируемых методом геной инженерии и содержащих рекомбинантные молекулы ДНК. Степень опасности таких рекомбинантных систем зависит от инфекционных и токсикогенных свойств клетки хозяина и рекомбинантной ДНК, их способности к выживанию в объектах производственной и окружающей среды и, что особенно важно, к передаче генетической информации другим организмам.

Принимая во внимание отсутствие методических подходов к гигиеническому нормированию таких штаммов, с учетом последнего

эффекта и в соответствии с санитарно-противоэпидемическими правилами «Безопасность работы с рекомбинантными молекулами ДНК» (МЗ СССР, М., 1989), выброс данных штаммов микроорганизмов в процессе производства в воздух рабочей зоны и объекты окружающей среды запрещается.

Исследования проводят на следующих видах лабораторных животных молодого возраста: белые мыши (масса тела 16-18 г), белые крысы (масса тела 160-180 г), морские свинки (масса тела 200-250 г), кролики (масса тела 1500-2000 г). При этом необходимо указать вид, линию (популяцию), из какого питомника получены животные, пол, исходную массу тела, пищевой рацион, сезон, в котором проводилась каждая серия экспериментов.

Подбор животных и формирование из них однородных опытных и контрольных групп осуществляют с учетом одинаковой массы тела, отсутствия различий в поведении, общем состоянии, содержании лейкоцитов в крови и состоянием нормальной микрофлоры организма.

Количество лабораторных животных должно соответствовать требованиям, изложенным в разделе IX методических указаний «Постановка исследований для обоснования санитарных стандартов вредных веществ в воздухе рабочей зоны» (М., 1980), а условия содержания - требованиям санитарных правил «Устройство, оборудование и содержание экспериментально-биологических клиник (вивариев)», утвержденных МЗ СССР (М., 1973). С соответствующей аргументацией могут быть использованы и другие лабораторные модели (клетки культуры ткани, куриные эмбрионы и др.).

Учитывая качественное отличие изучаемых агентов (живые клетки), принципы их гигиенического нормирования существенно отличны от таковых, используемых при обосновании санитарных стандартов (ОБУВ и ПДК) химических вредных веществ, в том числе продуктов микробиологического синтеза (кормовые белки, белково-витаминные концентраты, аминокислоты, ферменты, антибиотики и др.). Показателями опасности действия непатогенных (не вызывающих у человека инфекционных процессов) микроорганизмов-продуцентов является транзитное бактерионосительство (диссеминация во внутренних органах), специфическое влияние на иммунную систему (иммунотоксичность) и на нормальную микрофлору микроорганизма (дисбиотическое действие).

В соответствии с этими положениями составлены схемы постановки исследований для установления ПДК. В схему постановки исследований по обоснованию санитарных стандартов готовых форм препаратов, содержащих живые микроорганизмы, учитывая наличие в них различных химических соединений в виде добавок и наполнителей, включены отдельные тесты, используемые при гигиеническом нормировании вредных химических соединений.

При нормировании штаммов, относящихся к уже изученному виду микроорганизмов, их исследование проводится по сокращенной схеме, включающей изучение уровня воздействия по показателю, являющемуся лимитирующим для данного вида.

## 2. Принципиальная схема исследований

### 2.1. Схема проведения исследований по обоснованию ПДК микроорганизмов-продуцентов в воздухе рабочей зоны, атмосферном воздухе и воде водоемов

Исследования предусматривают оценку опасности изучаемого микроорганизма при поступлении в организм лабораторных животных путями, адекватными реальным условиям трудовой деятельности и обитания человека, с целью выбора лимитирующего критерия вредности и установления ПДК:

выявление раздражающего слизистую оболочку глаза действия; проведение хронического эксперимента при поступлении микроорганизма через органы дыхания или энтерально для выявления лимитирующего критерия вредности (иммунотоксического, дисбетического или по диссеминации микроорганизма во внутренних органах);

при нормировании в воде водоемов учитываются данные по изучению влияния продуцента на процессы микробного самоочищения водной среды.

### 2.2. Особенности исследования по обоснованию ПДК готовых форм препаратов, содержащих живые микроорганизмы или споры

В дополнение к исследованиям, проводимым для определения опасности микроорганизма (раздел 2.1), выполняют в соответствии с методическими указаниями «Постановка исследования для обоснования санитарных стандартов вредных веществ в воздухе рабочей зоны» (М., 1980):

определение раздражающего действия на кожу;\*

определение порогов острого и хронического общетоксического действия;

выявление сенсибилизирующего действия.

\* При выявлении раздражающего действия микроорганизмов-продуцентов или готовых форм препаратов необходимо проведение на предприятиях профилактических мероприятий по защите глаз и кожных покровов работающих (защитные очки, перчатки, одежда, обувь).

### 3. Методы исследования

#### 3.1. Определение раздражающего слизистую оболочку глаза действия

Для проведения опыта берут не менее 3 кроликов. В конъюнктивный мешок глаза однократно закапывают 1 каплю взвеси живой культуры микроорганизма-продуцента, содержащей  $10^9$  кл./мл или 50 % суспензии готовой формы препарата. Учет эффекта проводят в течение двух суток (прил. 3).

#### 3.2. Выявление сенсibilизирующего действия готовой формы препарата

Специальных опытов по выявлению сенсibilизирующего действия микроорганизмов-продуцентов не проводят, поскольку они как чужеродные для макроорганизма клетки являются облигатными аллергенами и различаются лишь степенью выраженности данного эффекта.

Однако, при контакте с готовой формой препарата возможно проявление сенсibilизирующего действия входящих в ее состав химических соединений (добавки, наполнители и т. д.). Если они не нормированы, то проводят специальные эксперименты.

При выявлении сенсibilизирующего действия готовой формы препарата для сенсibilизации используют введение (интраназальное или внутрижелудочное) ее суспензии в концентрации на порядок ниже величины ЛД<sub>50</sub>, а также ингаляционное воздействие в концентрациях, выбранных для определения  $Lim_{AC}$  (действующая, пороговая и ниже).

Сенсibilизацию определяют как по отношению к микроорганизму-продуценту (или к каждому из микроорганизмов, если в готовую форму препарата входит смесь микроорганизмов), так и к входящим в композицию химическим соединениям. При тестировании химическими соединениями руководствуются методическими рекомендациями по нормированию химических аллергенов (см. список литературы), а микроорганизмами -- согласно методикам, изложенным в разделе 3.3.1.

Если сенсibilизирующее действие готовой формы препарата было обнаружено только при тестировании входящим в его состав микроорганизмом-продуцентом, то в последующих хронических экспериментах определяют порог сенсibilизации для данного микроорганизма. Если же входящие в состав препарата химические соединения также проявили сенсibilизирующий эффект, то животных в хронических опытах тестируют и микроорганизмом-продуцентом, и химическим аллергеном.

### **3.3. Постановка хронического эксперимента для определения лимитирующего критерия вредности**

Микроорганизмы-продуценты вводят животным интраназально в виде суспензии в физиологическом растворе с последующим пересчетом вводимой дозы на концентрацию клеток во вдыхаемом воздухе (прил. 2). При наличии специальных камер для создания микробных аэрозолей проводят ингаляционное введение. При нормировании микроорганизмов-продуцентов в воде водоемов используют энтеральное введение. При исследовании готовых форм препаратов на основе живых микроорганизмов используют ингаляционное введение в пылевых заправочных камерах, при этом ежедневная экспозиция при установлении ПДК в воздухе рабочей зоны – 4 ч, а для ПДК в атмосферном воздухе – круглосуточно. Энтеральное и интраназальное введение осуществляют 1 раз в сутки.

Для определения порогов иммунотоксического и дисбиоти-ческого действия введение живой культуры микроорганизма-продуцента или готовой формы препарата осуществляют в течение 1 месяца. Длительность периода ингаляционного воздействия готовой формы препарата при установлении порога хронического общетоксического действия ( $Lim_{ch}$ ) – 4 месяца.

#### **3.3.1. Определение порога иммунотоксического действия**

Имунотоксическое действие может проявляться сенсibilизацией, иммунизацией (признак антигенности микроорганизма) и неспецифической иммуномодуляцией (стимуляция и иммунодефицит) организма, поэтому в настоящем документе предусмотрено определение всех трех возможных иммунотоксических эффектов.

Для оценки опасности развития сенсibilизации в хроническом эксперименте тестирование животных осуществляют живой культурой микроорганизма-продуцента. Аллергены из микроорганизмов используют только при наличии коммерческих препаратов, прошедших государственный контроль, т. е. с гарантированной специфичностью и активностью. При оценке готовых форм препаратов кроме того применяют их суспензию и растворы (взвеси) отдельных химических соединений. С микроорганизмами выполняют определение ГЗТ и ГНТ, с химическими соединениями – тесты, указанные в разделе 3.2.

Определение гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ): тестирование животных опытной (сенсibilизированной) и контрольной (интактной) групп проводят путем введения под аноневроз задней лапки взвеси микроорганизма-продуцента (в объеме 0,05 мл), выращенного на оптимальной плотной питательной среде и суспензированного в физиологическом растворе, в концентрации, кото-



рая у контрольных животных не вызывает воспалительной реакции. При оценке готовой формы препарата второй партии животных опытных групп вводят 100 мкг наполнителя. На следующие сутки (через 18-20 ч), измеряя толщину каждой из задних лапок инженерным микрометром (или по объему вытесненной воды), определяют выраженность отека в мм (или в мл) по разнице между толщиной (объемом) двух задних лапок каждого животного и вычисляют среднegrупповые показатели отека животных опытной и контрольной групп.

**Определение реактивной гиперчувствительности немедленного типа (ГНТ):**

опытным и контрольным крысам внутрибрюшинно вводят 6-8 мл среды 199 и в течение 1-1,5 мин проводят легкий массаж передней стенки живота. Затем по средней линии делают послойный разрез длиной 1,5-2 см и, перевернув животное, собирают перитонеальную жидкость в пробирку, смоченную гепарином, центрифугируют при 1000 об/мин в течение 5 мин. Осажденные тучные клетки ресуспензируют в среде 199 до концентрации  $10^6$  мл.

На предметное стекло, окрашенное 0,03 % нейтрал-рот (в абсолютном спирте) наносят 0,05 мл суспензии тучных клеток и добавляют 0,05 мл суспензии микроорганизмов-продуцентов или препарата в концентрации, которая не вызывает дегрануляции тучных клеток интактных крыс. Смесь покрывают покровным стеклом, края которого смазывают вазелином и помещают в термостат при 37 °C на 10-15 мин. Затем под микроскопом подсчитывают число дегранулированных клеток на 50 тучных клеток.

Для оценки антигенности микроорганизмов применяют определение иммунных антител в реакциях агглютинации и фагоцитоза изучаемого микроорганизма нейтрофилами крови.

**Реакция агглютинации:**

готовят сыворотки крови опытных и контрольных животных. Реакцию выполняют в пробирках 10 × 75 мм по 10 штук в ряду для каждой сыворотки; в первую пробирку каждого ряда наливают 0,95 мл, в остальные – по 0,5 мл физиологического раствора. Затем в первую пробирку добавляют 0,05 мл испытуемой сыворотки крови, перемешивают и переносят 0,5 мл во вторую и т. д. до последней пробирки, из которой лишние 0,5 мл выливают. После получения двукратного разведения сывороток (от 1 : 20 до 1 : 10250) в каждую пробирку добавляют по 0,5 мл взвеси живой культуры микроорганизма-продуцента, содержащей  $10^9$  кл./мл; перемешивают содержимое встряхиванием и центрифугируют в течение 10 мин при 1000 об/мин. Реакцию считают положительной, если в пробирке появляется осадок, дающий крупные хлопья при осторожном постукивании по нижней части пробирки. За титр агглютининов принимают наибольшее разведение сыворотки, вызывающее агглютинацию микроорганизмов. Вычисляют среднегеометрическое, используя  $\log_2$  основания титра.

**Реакция фагоцитоза:**

из живой культуры микроорганизма-продуцента готовят суспензию на физиологическом растворе, содержащую  $10^9$  клеток/мл; к 0,1 мл данной суспензии добавляют 0,1 мл гепаринизированной крови как опытных, так и контрольных животных, перемешивают и инкубируют при  $37^\circ\text{C}$  в течение 30 мин (реакцию ставят или в полистероловых планшетах, или в обрезанных пробирках), затем готовят мазки для подсчета формулы крови. Подсчитывают 200 нейтрофилов крови, вычисляют процент фагоцитирующих нейтрофилов и индекс активности фагоцитоза (общее число фагоцитированных микроорганизмов, разделенное на число фагоцитирующих нейтрофилов).

Для оценки иммуномодулирующего эффекта определяют в крови и лимфоидных органах содержание лимфоцитов, Т- и В-лимфоцитов и ауто-РОК (прекиллеры и предшественники иммунорегулирующих Т-клеток), массовые коэффициенты лимфоидных органов (тимус, селезенка, трахеобронхиальные и брыжечные лимфоузлы). Содержание лимфоцитов и их популяций определяют как в процентах, так и по числу в 1 мкл крови или 1 г органа; исследования проводят одновременно с гематологическим анализом.

#### Выделение лимфоцитов:

под эфирным наркозом забирают кровь из подъязычной артерии без антикоагулянта (получение сыворотки крови) и с антикоагулянтом – гепарином (для выделения лимфоцитов и аутоэритроцитов). После декапитации выделяют лимфоузлы, тимус и селезенку. Органы взвешивают для последующего пересчета содержания лимфоцитов в 1 г органа, промывают в забуференном физиологическом растворе ( $\text{pH} = 7,3$ ), подсушивают фильтровальной бумагой, измельчают ножницами, затем – в фарфоровой ступке и протирают через двойную капроновую сетку. Клетки ресуспендируют в 2 мл забуференного физиологического раствора, подсчитывают их число в 1 мкл в камере Горяева. Лимфоциты выделяют в градиента плотности верификола или верографина по общепринятым методикам. В реакциях розеткообразования используют взвесь лимфоцитов в концентрациях  $2-5 \times 10^6$  кл./мл.

#### Определение Т-лимфоцитов:

в силиконированной пробирке смешивают 0,1 мл взвеси лимфоцитов и 0,1 мл 0,5 %-ной взвеси отмытых эритроцитов барана (при исследовании Т-лимфоцитов крыс, мышей) или эритроцитов кролика (при определении Т-лимфоцитов морских свинок), затем инкубируют при  $37^\circ\text{C}$  в течение 15 мин, центрифугируют в течение 1-2 мин при 1000 об/мин, затем 1 ч выдерживают в холодильнике при  $4^\circ\text{C}$ , после чего сразу же добавляют для фиксации розеток 0,1 мл 0,6 %-ного глютарового альдегида, выдерживают при комнатной температуре 15-20 мин, центрифугируют при том же режиме, из осадка готовят мазок, высушивают, фиксируют метанолом в течение 3 мин, промывают дистиллированной водой, окрашивают

по Романовскому-Гимза. Подсчитывают 200 лимфоцитов, вычисляют процент Т-лимфоцитов, образовавших розетки не менее, чем с тремя эритроцитами.

#### Определение В-лимфоцитов:

проводится так же, как и определение Т-лимфоцитов, но вместо эритроцитов в реакцию вводят 0,1 мл 0,1 %-ной взвеси зимозан-комплемента (зимозан, проинкубированный в течение 30 мин при 37 °С с комплементом морской свинки и отмытый от последнего в физиологическом растворе). Доля лимфоцитов, фиксирующих 3 и более зерен зимозана, отражает процент В-лимфоцитов.

#### Определение ауто-РОК (по Х. М. Векслеру):

в силиконированной пробирке смешивают 0,1 мл взвеси лимфоцитов и 0,1 мл аутосыворотки, инкубируют при 8 °С в холодильнике в течение 30 мин, затем добавляют 0,1 мл 0,5 %-ной взвеси аутоэритроцитов и оставляют на 5 мин при комнатной температуре, после чего центрифугируют 5 мин при 1000 об/мин и еще 18 часов инкубируют при 8 °С. Далее фиксируют глутаровым альдегидом, готовят мазки, окрашивают их и ведут подсчет так же, как и при определении процента Т-лимфоцитов.

Иммуномодулирующий эффект изучают также на крысах, предварительно иммунизированных эритроцитами барана. При таком подходе выявляется суммарное содержание активированных Т- и В-лимфоцитов. Последний вариант дает возможность одновременно определения в сыворотке крови крыс титра специфических антител к эритроцитам с помощью реакции прямой гематглютинации. Это позволяет дополнительно оценить отдельно антителообразующую способность В-лимфоцитов, т. е. их функциональную активность.

Для скрипинг-метода возможно использование клеток тимуса и селезенки, минуя градиентное центрифугирование с фиккол-верэграфином. Лимфоидные клетки используют в концентрации  $2-5 \times 10^6$  в 1 мл ЭБР. При этом достаточно оценить динамику показателей относительного содержания иммунокомпетентных клеток двух классов Т- и В-систем иммунитета.

Оценку выраженности иммунотоксического эффекта определяют, вычисляя достоверность различия среднegrупповых показателей опытных и контрольных животных, а также учитывая число животных с проявлением иммунотоксического действия:

сенсibiliзирующего – появление ГЗТ, ГНТ, положительных тестов на химические аллергии;

антигенного – появление иммунных антител, существенное усиление фагоцитоза микроорганизма-продуцента;

неспецифического иммуномодулирующего – выход за пределы средненормальных показателей содержания Т-, В-лимфоцитов и ауторозеткообразующих клеток. За пороговую концентрацию принимают ту, при действии которой не более, чем у  $1/3$  опытных

животных были обнаружены признаки одного или всех типов иммунотоксического действия, а среднегрупповые показатели существенно не отличались от таковых у контрольных животных. За действующую концентрацию принимают ту, при воздействии которой признаки иммунотоксического эффекта были выявлены более, чем у половины животных, а среднегрупповые показатели статистически достоверно отличались от контрольных.

### 3.3.2. Определение порога дисбиотического действия

При изучении повреждающего действия исследуемых объектов на аутофлору макроорганизма в качестве тест-системы используется микробиоценоз толстого кишечника.

Бактериологическое обследование животных проводится в динамике: до затравки (фон), на 2-й и 4-й неделях затравочного периода и через 1 месяц после окончания затравки (восстановительный период).

Схема проведения бактериологических исследований (рекомендуемые микробиологические показатели, состав и способ приготовления питательных сред, используемые разведения посевного материала, условия культивирования различных микроорганизмов, способ расчета количества колониобразующих единиц микроорганизмов на 1 г исследуемого материала) изложена в методических указаниях «Постановка исследований для установления предельно допустимых концентраций антибиотиков в воздухе рабочей зоны» (М., МЗ СССР, № 5051—89).

#### Критерии оценки дисбиотического действия

По характеру и степени изменения состава кишечной микрофлоры дисбиотическое действие воздействующего фактора может быть оценено как умеренно выраженное и сильное.

Если показатели количественного состава микрофлоры более, чем в двух группах микроорганизмов отличаются от контроля, но после прекращения воздействия изучаемого агента различия исчезают, то его дисбиотическое действие оценивается как умеренно выраженное.

Если показатели количественного состава микрофлоры кишечника подопытных животных отличаются от контроля хотя бы по одной из изученных групп, но изменения не исчезают после восстановительного периода, то это рассматривается как сильное дисбиотическое действие.

При гигиеническом нормировании дозу или концентрацию микробного агента, вызывающую умеренно выраженный дисбиоз, следует считать порогом дисбиотического действия. Дозу или концентрацию, которая обусловила сильное дисбиотическое действие, — действующей по этому эффекту.

### 3.3.3. Определение порога диссеминации

Определение порога диссеминации микроорганизма во внутренних органах осуществляют путем посева крови и отпечатков легких, сердца, печени, селезенки и почек на агаризованную селективную среду с последующим микроскопированием выросших колоний. Исследования проводят в конце хронического эксперимента и через 2 недели после его окончания. На каждый срок забивают не менее 6 животных. Параллельно с бактериологическими проводят гистологические исследования внутренних органов с использованием общепринятых методов (прил. 5).

За пороговую принимается минимальная доза или концентрация, при которой через 2 недели после окончания хронического эксперимента (период восстановления) микроорганизмы высеиваются из внутренних органов, или в последних обнаруживаются патоморфологические изменения.

## 4. Обоснование величины ПДК

Величина ПДК устанавливается, исходя из лимитирующего порога хронического действия (иммунотоксического, дисбиотического, диссеминации микроорганизмов во внутренних органах).

Коэффициент запаса для ПДК в воздухе рабочей зоны и воде водоемов принимается равным 10, а для ПДК в атмосферном воздухе – равным 100. Максимальная величина ПДК микроорганизмов-продуцентов в воздухе рабочей зоны ограничивается  $5 \times 10^4$  м.кл/м<sup>3</sup>, в атмосферном воздухе –  $5 \times 10^3$  м.кл/м<sup>3</sup>. При нормировании микроорганизмов-продуцентов в воде помимо результатов токсикологического исследования учитываются данные по оценке воздействия на экосистему и процессы самоочищения при первичной санитарно-гигиенической оценке штамма. Если лимитирующим признаком вредности является влияние на процессы самоочищения водоема, то ПДК устанавливается на уровне пороговой концентрации (в соответствии с методическими указаниями «Разработка и научное обоснование ПДК вредных веществ в воде водоемов», МЗ СССР, 1976). Максимальная величина ПДК составляет  $5 \times 10^4$  м.кл/л.

Поскольку микроорганизмы, разрешаемые МЗ СССР в качестве промышленных штаммов, относятся к непатогенным, введение дополнительной классификации по классам опасности не представляется целесообразным. При установлении ПДК микробных препаратов расчеты следует производить по основному действующему началу – микроорганизму-продуценту – и выражать ее величину в микробных клетках на единицу измерения объекта среды, для которого дается норматив (м<sup>3</sup>, л). Если в готовую форму препарата

входят несколько штаммов микроорганизмов-продуцентов, то при оценке эффектов хронического действия, определяемых отдельно для каждого, следует ориентироваться на наиболее активный из них.

В случаях, когда лимитирующим признаком вредного действия микроорганизма-продуцента является сенсibiliзирующее, ставится пометка А (аллерген).

Последующая клинико-гигиеническая проверка и корректировка экспериментально установленной ПДК микроорганизмов-продуцентов и готовых форм препаратов проводится с использованием методических приемов, принятых в практике гигиенического нормирования, и предусматривает:

для воздуха рабочей зоны – гигиеническую оценку производственной среды и изучение общей и профессиональной заболеваемости рабочих;

для атмосферного воздуха – оценку загрязнения микроорганизмом-продуцентом или готовой формой препарата воздушной среды сельтебной зоны и изучение заболеваемости населения;

для воды водоемов – оценку загрязнения микроорганизмом-продуцентом воды конкретного водоема и изучение влияния на процессы микробного самоочищения воды;

при гигиенической оценке микробных средств защиты растений целесообразно изучение влияния препарата на процессы микробного самоочищения почвы.

## Приложение 1.

### Приготовление взвеси и количественный учет микроорганизмов

При проведении работ по исследованию штаммов-микроорганизмов необходимо использовать свежую культуру микроба-продуцента, выращенную с учетом скорости роста продуцента и того возраста культуры, при котором, согласно регламенту конкретного производства, наиболее вероятно попадание продуцента в воздух производственной и окружающей среды.

Питательные среды, используемые для выращивания, должны обеспечивать рост высеваемой культуры.

При приготовлении взвеси культуры продуцента следует учитывать особенности его строения и роста, различные размеры и неоднородность частиц во взвеси, что требует введения поправочного коэффициента при стандартизации микробной взвеси по стандарту мутности.

С этой целью полученный смыв (соскоб) микроорганизмов дезинтегрируют и отмывают от остатков питательной среды повторным центрифугированием в изотоническом растворе хлорида натрия. Определяют оптическую плотность полученной (исходной) микробной суспензии, после чего ее раститровывают последовательными

десятикратными разведениями до предполагаемой концентрации 100-1000 клеток в 1 мл.

Из 3-5 последних разведений производят высев по 0,1 мл на 3-5 чашек Петри (можно по 2-3 разведения на 1 чашку). По истечении сроков инкубации по числу выросших колоний продуцента (учету подлежат чашки с ростом от 10 до 200 колоний) рассчитывается концентрация КОЕ (колониеобразующие единицы) в исходной суспензии и величина поправочного коэффициента. Расчет определяется по формулам:

$$M = a \cdot 10 \cdot 10^n$$

где M - количество КОЕ в 1 мл исходной суспензии; a - среднее количество колоний на 1 чашке Петри с выбранным разведением суспензии;  $10^n$  - степень разведения суспензии; 10 - постоянный коэффициент при посеве 0,1 мл суспензии.

$$K = \frac{M}{C}$$

где K - поправочный коэффициент; M - количество КОЕ в 1 мл «исходной» суспензии; C - концентрация клеток в «исходной» суспензии, определенная по стандарту мутности или другим нефелометрическим методом.

#### Пример расчета

По стандарту мутности исходная суспензия соответствовала 12 млрд микробных тел/мл ( $1,2 \times 10^{10}$ ). Из разведения  $10^{-6}$  выросло 51, 74, 68, 45 и 62 колоний на 1 чашке Петри при посеве 0,1 мл.

$$M = \frac{51 + 74 + 68 + 45 + 62}{5} \cdot 10 \cdot 10^6 = 60 \cdot 10 \cdot 10^6 = 6 \cdot 10^8$$

$$K = 6 \cdot 10^8 : 1,2 \cdot 10^{10} = 0,05$$

Условия приготовления суспензии должны быть хорошо стандартизированы для воспроизведения поправочного коэффициента (С 25 %). Необходимо периодически проверять концентрацию КОЕ в суспензии, при этом истинная доза медленно растущих микроорганизмов-продуцентов, введенная животным, может быть определена ретроспективно на 6-12 сутки.

Для определения концентрации в суспензии дрожжевых клеток, спор бактерий и грибов можно использовать камеру Горяева или другие счетные камеры.

Для учета жизнеспособных клеток взвесь микроорганизмов разводят вдвое краской следующего состава: 0,1 %-ный раствор эозина, приготовленный на 1,7 %-ном растворе хлорида натрия,

смешивается в соотношении 1 : 1 с 0,1 %-ным раствором трипанового синего, приготовленным на дистиллированной воде. Готовой взвесью заполняют счетную камеру и, в соответствии с инструкцией для используемой камеры, ведут подсчет клеток, отдельно учитывая окрашенные (мертвые) клетки. Определяют процент живых клеток. Учитывая двойное разведение суспензии при окрашивании, в числитель соответствующей формулы для расчета количества клеток вводится коэффициент 2.

## Приложение 2.

### Интраназальный способ введения микробной взвеси

Поскольку максимальная величина ПДК микроорганизмов-продуцентов в воздухе рабочей зоны ограничивается  $5 \times 10^4$  м.кл./м<sup>3</sup>, то при проведении хронического эксперимента испытывается данная концентрация и на порядок ниже. При необходимости исследования продолжаются с концентрациями, снижающимися на порядок.

Взвесь микроорганизмов с помощью пипетки вводят мышам в количестве 0,007-0,05 мл, крысам - 0,05-0,25 мл.

Пересчет концентрации микроорганизмов в воздухе на дозу, введенную животному, осуществляют по формуле:

$$D = K \cdot V$$

где  $K$  - количество микробных клеток в 1 м<sup>3</sup> воздуха;  $D$  - количество микробных клеток, введенных животному;  $V$  - объем вдыхаемого воздуха.

Величина объема вдыхаемого воздуха определяется как произведение легочной вентиляции для данного вида животных на массу тела животного и время ингаляции.

Показатели легочной вентиляции (в см<sup>3</sup>/г/мин) составляют для:

крысы - 0,65;

морской свинки - 0,33;

мыши - 1,24;

кролика - 0,29.\*

Концентрация  $5 \times 10^4$  м.кл./м<sup>3</sup> соответствует поглощенной дозе 1560 кл. на крысу массой 200 г, 990 кл. на морскую свинку массой 250 г, 133 кл. на мышшь массой 18 г.

\* Методы определения токсичности и опасности химических веществ (токсикометрия).—М.: Медицина, 1970.



### Приложение 3.

#### Оценка повреждающего действия на слизистые оболочки глаза кролика по Majda и Chrusaielska

А. Гиперемия конъюнктивы и роговицы оценивается по следующим признакам:

- сосуды инъецированы - 1 балл;
- отдельные сосуды трудно различить - 2 балла;
- диффузное глубокое покраснение - 3 балла.

Б. Отек век:

- слабые отеки - 1 балл;
- выраженный отек с частичным выворачиванием век - 2 балла;
- в результате отека глаз закрыт наполовину - 3 балла;
- в результате отека глаз закрыт полностью - 4 балла.

В. Выделения:

- минимальное количество выделений - 1 балл;
- количество выделений увлажняет веки - 2 балла;
- количество выделений увлажняет веки и окружающие ткани - 3 балла.

При резко выраженных повреждениях глаза суммарное количество баллов равно 10.

### Приложение 4.

#### Пересчет МНД при интэральном введении на МНК в воде

Так как в токсикологических экспериментах используется доза, выражаемая числом микробных клеток на животное, то в известную формулу пересчета:  $\text{МНК мг/л} = \text{МНД мг/кг} \times 20$ , следует внести изменения с учетом средней массы крысы (200 г):  $\text{МНК м.кл./л} = \text{МНД м.кл./жив} \times 100$ .

### Приложение 5.

#### Бактериологическое и патоморфологическое исследование внутренних органов

Для определения диссеминации и наличия бактеримии после введения микроорганизма-продуцента производят посев крови и отпечатков внутренних органов (легких, печени, селезенки, почек и др.) на оптимальную для выявления роста среду. Взятие материала для посева производят стерильно. Шкурка животного обрабатывается спиртом и обжигается. При исследовании после внутрибрюшинного или внутрижелудочного введения вскрытие животного начинают с грудной клетки, после ингаляции (интраназального или интрахеального введения) - с брюшиной. При исследовании продуцентов, чувствительных к действию спирта, можно орган или его часть

погрузить на несколько секунд в 70°-ный этиловый спирт, затем стерильно осушить фильтровальной бумагой и разрезать лезвием безопасной бритвы, скальпелем или ножницами, простерилизованными (погружение в спирт и обжигание) и охлажденными для каждого органа отдельно\*.

Делают мазки и отпечатки с 2-3 срезов каждого органа.

Кровь отбирают из полости сердца стерильной пастеровской пипеткой после прижигания места прокола сердечной мышцы. 1-2 капли крови наносят на поверхность питательной среды и растирают стерильным шпателем (газов).

Культивирование посевов проводят при оптимальных для выявления искомого продуцента условиях.

Параллельно с проведением бактериологических посевов кусочки органов помещают в 10 %-ный раствор формалина и далее подвергают обычной при патоморфологических исследованиях обработке. При микроскопическом исследовании определяют морфологические изменения в тканях. Применяя специальные (для конкретного микроорганизма) методы окраски, определяют его наличие в органах, стадии развития, массивность обсеменения.

#### Список литературы

1. Безопасность работы с рекомбинантными молекулами ДНК: Санитарно-противоэпидемические правила.—М., 1989.
2. Гигиеническая оценка микробных средств защиты растений от насекомых и болезней на основе неспорообразующих микроорганизмов.—Киев, 1982.
3. Постановка исследований для обоснования санитарных стандартов вредных веществ в воздухе рабочей зоны: Методические указания.—М., 1980.
4. Постановка исследований по гигиеническому нормированию промышленных аллергенов в воздухе рабочей зоны: Методические рекомендации.—Рига, 1980.
5. Постановка исследований для установления предельно допустимых концентраций антибиотиков в воздухе рабочей зоны: Методические указания.—М., 1989.
6. Разработка и научное обоснование предельно допустимых концентраций вредных веществ в воде водоемов: Методические указания.—М., 1976.
7. Санитарно-микробиологический анализ воды поверхностных водоемов: Методические указания.—М., 1981.

\* Следует учитывать, что рост микроорганизмов, относящихся к роду *Bacillus*, не подавляется спиртом, поэтому при исследовании таких продуцентов обязательно прижигание поверхности органа перед его рассечением. В границах обожженной поверхности срезается часть органа, из глубины вырезается кусок, из которого делают отпечаток.

## СОДЕРЖАНИЕ

1. Общие положения . . . . .	3
2. Принципиальная схема исследований . . . . .	6
2.1. Схема проведения исследований по обоснованию ПДК микроорганизмов-продуцентов в воздухе рабочей зоны, атмосферном воздухе и воде водоемов . . . . .	6
2.2. Особенности исследования по обоснованию ПДК готовых форм препаратов, содержащих живые микроорганизмы или споры . . . . .	7
3. Методы исследования . . . . .	7
3.1. Определение раздражающего слизистую оболочку глаза действия . . . . .	7
3.2. Выявление сенсibilизирующего действия готовой формы препарата . . . . .	7
3.3. Постановка хронического эксперимента для определения лимитирующего критерия вредности . . . . .	8
3.3.1. Определение порога иммуноксического действия . . . . .	9
3.3.2. Определение порога дисбиотического действия . . . . .	13
3.3.3. Определение порога диссеминации . . . . .	14
4. Обоснование величины ПДК . . . . .	14
Приложение 1. . . . .	15
Пример расчета . . . . .	16
Приложение 2. . . . .	17
Приложение 3 . . . . .	18
Приложение 4. . . . .	18
Приложение 5. . . . .	18
Список литературы . . . . .	19

Редактор Аकोпова Н. Е.

Технический редактор Бурунов А. Г.

Сдано в набор 16.11.92  
Формат 60 × 84/16.  
Печ. л. 1,25.

Печать офсетная.

Подписано в печать 24.03.93.  
Уч.-изд. л. 0,77.  
Заказ 000/ .