МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР
ГЛАВНОЕ САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЕ УПРАВЛЕНИЕ

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

ПО ОЦЕНКЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ РЕАКТИВНОСТИ ЛЮДЕЙ НА ОСНОВАНИИ СОСТОЯНИЯ АУТОФЛОРЫ КОЖИ И ПОЛОСТИ РТА

Москва — 1978

gost.e-ecolog.ru

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР

ГЛАВНОЕ САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЕ УПРАВЛЕНИЕ

УТВЕРЖДАЮ
Начальник Главного
санитарно-эпидемиологического
управления
Министерства здравоохранения
СССР
Ковшило В. Е.
«. . » . . . . . 1978 г.

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

ПО ОЦЕНКЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ РЕАКТИВНОСТИ ЛЮДЕЙ НА ОСНОВАНИИ СОСТОЯНИЯ АУТОФЛОРЫ КОЖИ И ПОЛОСТИ РТА

Москва — 1978

Разработаны Институтом биофизики Министерства здравоохранения СССР (доктором медицинских наук, профессором Н. Н. Клемпарской и доктором медицинских наук Г. А. Шальновой).

Составлены в соответствии с приказом № 115 Минздрава СССР от 2 февраля 1976 года.

Рекомендованы к утверждению Лабораторным советом при Главном санитарно-эпидемиологическом управлении Министерства здравоохранения СССР.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время состояние иммунологической реактивности признано одним из наиболее чувствительных показателей для выявления влияния на организм человека различных неблагоприятных факторов. Многие гигиенисты использовали различные методы оценки отдельных факторов иммунологической реактивности, а именно: фагоцитарной функции лейкоцитов и бактерицидности крови, количества комплемента или лизоцима, способности к образованию специфических антител в ответ на иммунизацию.

Широкое применение этих методов часто встречает затруднения, так как многие из них технически сложны, трудоемки и требуют взятия крови (часто из вены), что вызывает отрицательные реакции у обследуемых лиц. Кроме того, установлено, что определение состояния какого-либо одного из факторов иммунитета еще не характеризует состояние всего организма, так как может быть компенсаторное усиление одного из факторов на фоне угнетения других.

Интегральным обобщающим показателем, характеризующим иммунологическую реактивность организма, является степень его антимикробной устойчивости, зависящей от совместной функции всех факторов иммунитета.

Было предложено оценивать антимикробную резистентность организма по простому и наглядному показателю — общему количеству и качественному составу аутофлоры кожи слизистых оболочек человека. Установлено, что у здоровых людей количество и видовой состав микробов аутофлоры относительно постоянны. Даже небольшие отклонения в состоянии здоровья изменяют это равновесие вследствие угнетения защитных факторов, при этом число микробов аутофлоры увеличивается и появляются необычные для здоровья организмов виды микробов. Эти изменения наступают еще при отсутствии клинических признаков поражения вредными факторами и дают возможность выявлять ранние стадии вредного влияния химических, промышленных или бытовых аген-

тов. Нормализация микрофлоры свидетельствует об эффективности защитных мероприятий.

Данный метод может использоваться врачами-гигиенистами и для выявления на производствах лиц с начальными формами повреждений организма, вызванных профессиональными факторами (химическими веществами, физическими агентами, изменением микроклимата) и врачами-специалистами по коммунальной гигиене для суждения о влиянии тех или иных химических продуктов на здоровье человека в условиях населенных мест. Метод может быть использован и врачами-токсикологами для оценки неблагоприятного воздействия на людей как отдельных вредных веществ, так и их сочетаний.

Для характеристики состояния аутофлоры кожи слизистой оболочки полости рта разработаны простые безвредные методы, описанные в настоящих методических рекомендациях. Эти методы не вызывают никакой отрицательной реакции у взрослых и детей и позволяют проводить широкие массовые обследования. Методы доступны для освоения и использования любой санитарно-эпидемиологической станцией.

Данные методические рекомендации состоят из трех разделов, посвященных описанию методики исследования аутофлоры кожи, методики изучения аутофлоры полости рта, способов обработки и оценки получаемых результатов.

1. МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА И КАЧЕСТВА МИКРОФЛОРЫ КОЖИ

Для выявления и учета микробов, находящихся на поверхности кожи, готовят пластинки с питательной средой на предметном стекле и прикладывают их к коже обследуемого человека, чтобы получить отпечаток, затем помещают их в термостат на ночь, и на месте каждой микробной клетки, прилипшей к питательной среде, вырастает колония, видимая простым глазом. Подсчитав число колоний на отпечатке, можно определить, сколько живых микробов находилось на данном участке кожи человека в момент обследования.

Однако микробы находятся не только на поверхости, но и в глубине кожи — в протоках потовых и сальных желез. Там их гораздо больше, чем на поверхности. Для изучения этой «глубиной» флоры кожу надо смазать 0,25% раствором

аммиака и через 1—2 мин. сделать отпечаток на среду. Под влиянием такого слабого раздражения происходит «вынос» на поверхность кожи вместе с секретом желез и микробных клеток.

Необходимое оснащение

Аппаратура: автоклав, водяная баня, сухожаровой шкаф для стерилизации посуды, термостат, отрегулированный на 37°С, лабораторные весы, пинцет.

Посуда: кастрюля, чашки Петри, градуированные и пастеровские пипетки, предметные стекла, флаконы.

Реактивы: 90° этиловый спирт, индикатор — бромтимолблау, сухой мясопептонный агар, маннит, 0,25% раствор аммиака, гигроскопическая вата, фильтровальная бумага.

Приготовление питательных сред

Чаще всего для изучения микрофлоры кожи используют среду Коростелева — мясопептонный агар (pH 7,2—7,4) с добавлением 1 г маннита на 100 мл агара и 0,5 мл 1,5% раствора индикатора-краски бромтимолблау (заранее готовят спиртовой раствор этой краски (1,5 г на 100 мл спирта).

Флаконы со 100 мл готового стерильного мясопептонного агара помещают в водяную баню для расплавления, после чего в них добавляют маннит и раствор бромтимолблау. Путем вращения и покачивания флакона содержимое смешивают. Правильно приготовленная среда должна иметь темно-зеленый цвет (pH 7,2—7,4). Желтый оттенок указывает на кислую реакцию, а синий — на щелочную; такие среды для работы не пригодны. Готовая среда может сохраняться в холодильнике в течение 1—2 нед.

Другой средой, используемой для изучения микрофлоры кожи, является кровяной агар, который готовят также из обычного стерильного мясопептонного агара, растапливая его, остужая до 42—45°С и стерильно добавляя к нему 5 мл свежей стерильно взятой крови кролика (дефибринированной или цитратной). Покачиванием флакона кровь смешивают с агаром. Необходимость использования крови кролика связана с тем, что патогенные стафилококки чаще всего образуют токсины, разрушающие эритроциты кролика (α-токсин), но не оказывающие такого действия на эритроциты других видов животных и человека.

Разлив питательных сред на пластинки

Теплую, свежеприготовленную питательную среду при помощи стерильной пастеровской пипетки наливают на стерильные предметные стекла, лежащие по 2 шт. в чашках Петри. Удобнее использовать не целые предметные стекла, а разрезанные пополам, тогда их кладут в чашки Петри по 3—4 шт. Разлив питательной среды начинают с центра стекла, заполняя всю его поверхность возможно более толстым слоем (около 2,5—3 мл) и дают питательной среде застыть. Крышки чашек при этом держат приоткрытыми во избежание сильного запотевания. После застывания среды чашки закрывают и ставят в холодильник на нижнюю полку, чтобы не подвергать замораживанию. Изготовление пластинок с питательной средой можно производить накануне дня обследования.

Взятие посевов-отпечатков

Пластинку с питательной средой берут только за ее края-«ребра», не прикасаясь пальцами к ее поверхности, на 1—2 с плотно прижимают к поверхности кожи, отнимают и кладут в чашку Петри отпечатком к верху, поставив восковым карандашом на ее обратной стороне номер. Чашку закрывают. Для контроля 1—2 пластинки из партии оставляют в чашках не использованными с целью наблюдения за качеством среды и ростом микробов из воздушной среды (роста не должно быть!).

Место взятия отпечатка определяется задачами исследования. Обычно для суждения об общей реактивности организма отпечаток берут с ладонной поверхности правого и левого предплечья. Однако следует учесть, что на коже покрывающей пораженные органы, микробов вырастает значительно больше (феномен зонального рефлекторного угнетения бактерицидности кожи). Поэтому на тех производствах, где используются вещества, влияющие на печень, следует брать отпечатки флоры с кожи правого подреберья; там, где возможно попадание веществ, изменяющих функцию желудка, — с эпигастральной области и т. п.

Полезно брать отпечатки и с области «входных ворот», где впервые поражающий фактор сталкивается с организмом, например, с кожи в области гортани и верхней трети грудины (для химических веществ, проникающих с вдыхаемым воздухом, и изучения влияния холодного или горячего

воздуха). Если используют одновременно две среды (например: среду Коростелева и кровяной агар), то отпечатки берут в двух соседних местах. Для изучения глубокой микрофлоры тот же участок кожи обтирают ватным тампоном, смоченным раствором нашатырного спирта (0,25 мл аммиака на 100 мл дистиллированной воды), и через 1 —2 мин (после подсыхания участка) берут отпечатки на среды.

Взятие поверхностной флоры проще, и ее исследование дает вполне убедительные результаты. При этом кожу нельзя подвергать какой-либо обработке (обтирать, промывать и т. п.), так как это только увеличит число микробов на ней за счет выхода на поверхность глубокой флоры.

Если же кожа обильно загрязнена маслами, пылью и химическими веществами, ее необходимо очистить, и тогда уже остается изучать только глубокую флору после обработки раствором аммиака. Можно оба вида микрофлоры изучать одновременно. Тогда последующая обработка данных покажет, который из них наиболее точно отражает именно данный вредный фактор воздействия.

Учет результатов

Результаты учитывают либо непосредственно подсчитывая колонии, выросшие на пластинах-отпечатах, и записывая в специальный журнал, либо прикладывая каждый отпечаток поверхностью с колониями к белой бумаге, и, получив его точную копию подсчитывают колонии. В том случае, когда количество колоний на отпечатке более 200, их сосчитать очень трудно, и они регистрируются как сплошной рост. При учете результатов посевов отмечают как общее число колоний на пластинке, так и состав выросших микробов. Следует отметить, что глубокая микрофлора кожи гораздо более обильна, чем поверхностная, но по своему составу почти идентична ей. Для массовых обследований на производстве достаточно ограничиться средой Коростелева. Для выявления наиболее ранних стадий изменения реактивности организма в условиях влияния минимального уровня вредного фактора удобнее использовать кровяной агар. На нем вырастает больше колоний, чем на среде Коростелева, так как бромтимолблау, содержащийся в последней, задерживает рост некоторых микробов (например, сарцин, некоторых кокков и пр.).

В норме у здоровых людей на коже находится небольшое число микробов, и на пластинке с кровяным агаром площадью 6 см^2, используемых для отпечатков с поверхностной микрофлоры вырастает около 30 (иногда до 50) колоний, на отпечатках с глубокой микрофлоры вырастает 50—70 (иногда до 100) колоний. На среде Коростелева соответственно вырастает до 20 колоний микробов поверхностной флоры и до 50 колоний — глубокой. При нарушении реактивности организма или каких-либо заболеваниях на коже увеличивается число микробов, что легко регистрируется по обильному росту их на агаровых отпечатках.

Особое внимание уделяется качественному составу микрофлоры кожи. При изучении микрофлоры по отпечаткам на кровяном агаре главное значение придается наличию и количеству гемолитических форм микробов. Вокруг колоний этих микробов образуется зона просветления. В норме у здоровых людей число гемолитических форм микробов составляет 6—8% (иногда до 10%) общего их числа. Как известно, одним из признаков патогенности микробов является способность растворять эритроциты. Увеличение количества гемолитических форм микробов свидетельствует о более патогенном составе кожной микрофлоры, что, в свою очередь, зависит от нарушения взаимоотношений макро- и микроорганизмов и указывает на ослабление защитных сил организма.

На среде Коростелева, содержащей маннит и бромтимоблау, вырастают колонии различного цвета: белые, зеленые, а также желтые. Окраска колоний в желтый цвет обусловлена биохимической активностью микробов, которые вырабатывают фермент, сбраживающий маннит с образованием кислоты. В кислой среде бромтимолблау имеет желую окраску, и эти колонии также приобретают желтый цвет. Установлено, что способность сбраживать маннит является одним из показателей патогенности стафилококков. Следовательно, увеличение на коже числа маннит-разлагающих кокков свидетельствует о нарушении иммунологической реактивности организма.

В норме у здоровых людей при отпечатках с кожи на пластинке со средой Коростелева вырастает не более 10% (иногда до 20%) желтых колоний стафилококка, а часто эти микробы на коже вообще не обнаруживаются. Повышение числа таких колоний говорит об увеличении количества патогенных форм микробов на коже и соответственно о снижении иммунологической реактивности.

Для учета результатов следует завести журналы с регистрацией даты и порядкового номера обследования, фамилии, имени и отчества, пола и возраста обследуемого, его профессии и стажа работы на данном производстве (для гигиенистов) или других данных, необходимых при обследовании населения или детских коллективов.

2. МЕТОДИКА ИЗУЧЕНИЯ МИКРОФЛОРЫ ПОЛОСТИ РТА (КОЛИ-ТЕСТ)

Основным признаком угнетения иммунологической реактивности организма, определяемого путем изучения аутофлоры полости рта, является наличие в ней кишечной палочки, которая у здоровых людей быстро гибнет при попадании на кожу и слизистые.

Метод ее выявления во рту основан на взятии материала путем прикладывания стерильного диска из фильтровальной бумаги к слизистой оболочке рта под языком, растирания диска в стерильном физиологическом растворе и посева полученной суспензии на элективную среду Эндо.

Для проведения анализа необходимы следующие материалы:

1. Стерильный физиологический раствор, разлитый по по 5 мл в стерильные пробирки.
2. Стерильные бумажные диски стандартного размера — 0,5 см в диаметре (готовятся из фильтровальной бумаги обычным канцелярским дыроколом, упаковываются по 5—10 шт. в бумажные пакетики и стерилизуются сухим жаром).
3. Стерильные ступки с пестиками.
4. Стерильные пипетки на 1 и 2 мл.
5. Пинцет.
6. Стерильный шпатель.
7. Чашки Петри с питательной средой Эндо.

Пинцетом, протертым спиртом (или лучше обоженным и остуженным), бедут бумажный диск и прикладывают к определенному участку слизистой оболочки (чаще всего под языком, но можно исследовать и другие участки полости рта) для пропитывания его секретом. Затем диск помещают в пробирку с физиологическим раствором. По возможности скорее (во избежание гибели микробов) производят посев на питательные среды. Для этого содержимое пробирки выливают в ступку, растирают диск пестиком до полного измельчения и 0,1 мл этой суспензии высевают на подсушенные

чашки с питательными средами, растирают шпателем и помещают в термостат при 37°С на 18—24 ч, после чего учитывают результаты. Посев производят на среду Эндо, являющуюся элективной для кишечной палочки, но можно для особых целей делать посевы и на кровяной агар (для выявления количеств гемолитических форм микробов).

У здоровых людей кишечная палочка во рту отсутствует. При некоторых патологических состояниях, когда нарушается иммунологическая реактивность организма, коли-тест бывает положительным, т. е. на чашках при посевах взвеси из дисков-отпечатков вырастают колонии кишечной палочки. При угнетении реактивности организма возможно массивное заселение ротовой полости и зева кишечной палочкой и палочкой протея, которые попадают туда, вероятно, алиментарным путем или с кожи рук и находят благоприятные условия для приживления.

Площадь бумажного диска равна 19,6 мм^2. Поэтому можно вычислить число микробов на 1 мм^2 площади слизистой оболочки. Например, если на чашке выросло 10 колоний кишечной палочки, то в 0,1 мл посеянной взвеси содержалось 10 клеток этого микроба, а в 5 мл (объем, в котором растирался диск) 500 клеток, которые находились на площади диска, равной 19,6 мм^2, следовательно, на 1 мм^2 слизистой оболочки находилось примерно 25 клеток кишечной палочки.

Метод может быть использован и для исследования микрофлоры слизистой оболочки носа, вагины, мочевых путей.

3. СПОСОБЫ ОБРАБОТКИ МАТЕРИАЛОВ И ОЦЕНКА ПОЛУЧАЕМЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

На санитарно-эпидемиологических станциях основная работа по исследованию аутофлоры и слизистой оболочки полости рта производятся силами бактериологической лаборатории. Ее сотрудники готовят пластинки для отпечатков с кожи и стерильные диски из фильтровальной бумаги для взятия пробы из полости рта и передают их бригаде (врачу и его помощнику), которая берет анализ у лиц, работающих на производстве или проживающих в данном населенном пункте, ставит порядковый номер анализа на стеклах и пробирках с дисками и записывает основные данные о каждом человеке. Все это возвращается обратно в лабораторию, где пластинки помещают в термостат, а взятые из полости рта посевы обрабатывают, как указано выше, и также ставят в

термостат. Все данные по каждому обследованному заносят в специальный журнал в этот же день. На следующий день в лаборатории подсчитывают число колоний на пластинках и чашках и записывают в тот же журнал. По окончании обследования всего выбранного контингента производят оценку полученных данных путем определения величины среднего показателя и средней ошибки его ($M \pm m$) и сравнивают их с нормой, учитывая достоверность различия.

Очень наглядным является вычисление процента (по отношению к общему числу обследованных) случаев с повышеными показателями по сравнению с данными, характерными для людей этой местности, пола и возраста. В качестве контроля следует использовать группу лиц, не подвергавшихся воздействию вредных факторов.

Кроме того, полезно определить процент случаев сплошного роста микробов на пластинках или чашках, т. е. роста очень большого числа микробов, который наблюдается только при значительном угнетении реактивности организма.

Дальнейшую математическую обработку результатов исследований производит врач, ответственный за данную работу.

На основании полученных данных, характеризующих снижение иммунологической реактивности организма, можно выявить наличие ранее не установленного повреждающего фактора, определить степень его вредного воздействия и оценить (путем повторных обследований) эффективность проведенных оздоровительных мероприятий.

ОТРЫВНОЙ ЛИСТ

учета использования методических рекомендаций по оценке иммунологической реактивности людей на основании изучения аутофлоры кожи и полости рта

УТВЕРЖДЕНЫ
Начальником Главного санитарно-эпидемиологического управления Министерства здравоохранения СССР
Ковшило В. Е.
«. . .» . . . . . 197 г.

1. Кем и когда получены _____

_____

2. Количество и названия лечебно-профилактических учреждений, которые внедрили данные методические рекомендации _____

_____

_____

_____

_____

3. Формы внедрения (семинары, подготовка специалистов, сообщения) _____

_____

Результаты внедрения (количество наблюдений за 1 год и их эффективность)_____

_____

4. Замечания и положения _____

_____

_____

Подпись _____
(должность, фамилия, имя, отчество лица, заполнявшего лист)

gost.e-ecolog.ru

Формат 60×84 1/16 Объем 0,75 п. л. Зак. 897 Тир. 372 экз.

Вторая типография МЗ СССР