МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР
ГЛАВНОЕ САНИТАРНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЕ УПРАВЛЕНИЕ

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

ПОСТАНОВКА ИССЛЕДОВАНИЙ ДЛЯ ОБОСНОВАНИЯ ПРЕДЕЛЬНО ДОПУСТИМЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ АНТИБИОТИКОВ В ВОЗДУХЕ РАБОЧЕЙ ЗОНЫ

Москва, 1989 г

gost.e-ecolog.ru

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР
ГЛАВНОЕ САНИТАРНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЕ УПРАВЛЕНИЕ

«УТВЕРЖДАЮ»

Заместитель главного
государственного
санитарного врача СССР

_____А. М. Скляров

« 18 » июня 1989 г.

№ 5051 — 89

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

ПОСТАНОВКА ИССЛЕДОВАНИЙ ДЛЯ ОБОСНОВАНИЯ ПРЕДЕЛЬНО ДОПУСТИМЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ АНТИБИОТИКОВ В ВОЗДУХЕ РАБОЧЕЙ ЗОНЫ

Москва, 1989 г

Методические указания разработаны во Всесоюзном научно-исследовательском институте антибиотиков Министерства медицинской промышленности СССР под руководством профессора **Б. А. Шендерова** при участии и использовании материалов **И. З. Зельцер, И. И. Прохоровой, Р. Г. Ануфриевой, А. В. Лапчинской, Р. В. Бару.** Рассмотрены и рекомендованы к утверждению Проблемной комиссией «Научные основы гигиены труда и профпатологии» АМН СССР.

1. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Уже более 40 лет антибиотики широко применяются в различных областях народного хозяйства. Итогом успешного использования антибиотических препаратов в медицине явилось существенное ограничение распространения многих эпидемических заболеваний, снижение смертности, особенно детской, улучшение демографических показателей.

По мере развития науки об антибиотиках, открытия и внедрения в промышленное производство большого количества антибактериальных препаратов существенно увеличился контингент лиц, имеющих профессиональный контакт с ними, что обусловило необходимость токсикологического изучения антибиотиков с целью их гигиенического нормирования. Являясь одним из разделов частной промышленной токсикологии и возникшее на ее основе, учение о гигиеническом нормировании антибиотиков имеет свои особенности, связанные со специфическими свойствами данной группы соединений.

Настоящие Методические указания разработаны в развитие действующих методических документов по гигиеническому нормированию химических веществ в воздухе рабочей зоны.

Методические указания предназначены для специалистов токсикологических лабораторий научно-исследовательских институтов Министерства здравоохранения и других министерств и ведомств, кафедр медицинских институтов, санитарно-эпидемиологических станций, занимающихся токсикологической оценкой и обоснованием гигиенических стандартов для антибиотиков и других антимикробных агентов в воздухе рабочей зоны.

Для проведения исследований по обоснованию ПДК антибиотиков в воздухе рабочей зоны необходимы сведения об условиях производства и применения препарата, химическом, строении, физико-химических свойствах и специфической биологической активности (спектр антимикробного действия), наличие метода количественного определения в воздухе, отвечающего требованиям ГОСТ 12.1.005—88 «ССБТ. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны» и ГОСТ 12.1.016—79 «ССБТ. Воздух рабочей зоны. Требования к методикам измерения концентраций вредных веществ».

Качество лабораторных животных, их содержание и затравочная техника должны соответствовать требованиям «Методических указаний к постановке исследований для обоснования санитарных стандартов вредных веществ в воздухе рабочей зоны» (М., МЗ СССР, № 2163 — 80).

2. ПРИНЦИПИАЛЬНАЯ СХЕМА ИССЛЕДОВАНИЙ ПО ГИГИЕНИЧЕСКОМУ НОРМИРОВАНИЮ АНТИБИОТИКОВ

Многолетний опыт изучения состояния здоровья лиц, занятых в производстве антибиотиков, позволил сделать объективные обобщения и сформулировать основные теоретические и практические

установки по характеристике заболеваний, вызываемых антибиотиками в условиях профессионального контакта с ними. Проявления профессиональной патологии рабочих, в целом, повторяют побочные реакции, отмечаемые в клинических условиях при контактном, пероральном и аэрозольном применении антибиотиков с лечебной целью. В большинстве случаев они сводятся к явлениям, связанным с антимикробным эффектом препаратов, аллергическим и токсическим реакциям. На основе этих предпосылок в принципиальную схему исследований по гигиеническому нормированию антибиотиков включается изучение трех типов действия: а) антимикробного, б) сенсибилизирующего, в) общетоксического.

3. ИЗУЧЕНИЕ АНТИМИКРОБНОГО ДЕЙСТВИЯ АНТИБИОТИКОВ

Известно, что макроорганизм и его микрофлора представляют единую, сложившуюся в процессе эволюции экологическую систему, причем аутофлора оказывает влияние на самые разнообразные процессы, совершающиеся в организме. Из многочисленных микробиотопов организма важнейшая роль отводится микрофлоре кишечника, которая благодаря многообразию выполняемых ею физиологических функций рассматривается, в настоящее время, как важнейший фактор гомеостаза. В этой связи в качестве тест-системы при изучении повреждающего действия антибиотиков на аутофлору организма предлагается использовать микробиоценоз толстого кишечника.

Исследования антимикробного действия веществ с целью их гигиенического нормирования следует проводить в острых и хроническом экспериментах, используя адекватные производственным условиям пути поступления исследуемых веществ в организм.

3.1. Определение среднеэффективной по антимикробному действию дозы антибиотиков

Показатель характеризует опасность развития острой несмертельной интоксикации. Учитывая тесную корреляционную связь между составом микрофлоры толстого кишечника и относительной массой слепой кишки, для количественного выражения повреждающего действия антибиотиков на микроэкологию кишечника вводится показатель $ЕД_{50\ КМСК}$ — среднеэффективная доза, вызывающая увеличение коэффициента массы слепой кишки у 50% животных.

Определение $ЕД_{50\ КМСК}$ проводят в опытах на белых мышах. Каждую дозу антибиотика в стандартном объеме растворителя (0,5 мл) вводят в желудок группе животных, состоящей не менее чем из 6 особей. Контрольной группе животных вводят 0,5 мл растворителя. Через сутки у животных удаляют на 1 час корм, затем их взвешивают, забивают декапитацией, вскрывают брюшную полость и извлекают слепую кишку, предварительно наложив ли-

гатуры на илеоцекальный угол и границу перехода слепой кишки в ободочную. Слепую кишку взвешивают с содержимым и вычисляют коэффициент массы, как выраженное в процентах отношение массы слепой кишки к массе тела животного *. Далее в каждой опытной группе подсчитывают число животных, показатели которых отклоняются в сторону эффекта от среднего параллельного контроля для данного опыта. Найденное количество животных выражают в процентах к общему числу животных в группе. Количественный анализ зависимости доза — эффект осуществляют методом пробит анализа или иным подходящим методом.

3.2. Определение порога острого антимикробного действия ($Lim_{ac\ am}$)

Показатель характеризует опасность развития острого дисбактериоза кишечника в условиях однократного ингаляционного воздействия.

Установление $Lim_{ac\ am}$ проводят на белых крысах при однократной 4-часовой экспозиции. Каждая группа состоит из 10 — 12 животных. Испытывается не менее 3-х концентраций, разрыв между которыми составляет от 5 до 10 раз.

Микробиологическое обследование животных проводят через 20 часов после затравки и затем через 144 часа (восстановительный период).

Все микробиологические исследования проводят с использованием стерильной посуды, растворов, сред, инструментов.

При исследовании микрофлоры желудочно-кишечного тракта фекалии у животных отбирают всегда в определенное время суток (например, в 10 часов). Учитывая, что в нормальной микрофлоре фекалий преобладают анаэробные микроорганизмы, необходимо предусмотреть максимальное ограничение контакта исследуемого материала с кислородом воздуха. С этой целью свежерегенерированный тиогликолевый буферный раствор разливают по 1 мл в пробирки, которые затем маркируют и взвешивают. Отбор фекалий производят непосредственно в тиогликолевый буфер, после чего пробирки снова взвешивают и по разнице весов определяют массу фекалий. Далее добавляют столько буферного раствора, чтобы с учетом исходно взятого 1 мл буфера разведение фекалий было 1 : 10 (соотношение веса фекалий и всего объема буфера составит при этом 1 : 9). Содержимое тщательно растирают до однородной консистенции и оставляют для отстаивания крупных частиц в течение 20 мин. Дальнейшие десятикратные разведения (от 10^{-2} до 10^{-10}) производят в свежерегенерированном тиогликолевом буфере с использованием новой пипетки для каждого разведения. 0,1 мл приготовленных

---

* В приложении 1 приведены показатели коэффициентов массы слепой кишки у интактных белых мышей.

разведений наносят капельным методом на соответствующие диагностические среды и подсушивают. На 1 чашку наносят не более 5 разведений (схема нанесения разведений представлена на рисунке). Рекомендуемые микробиологические показатели, питательные среды, используемые разведения и условия культивирования различных микроорганизмов представлены в таблице. Состав и способ приготовления питательных сред изложены в приложении 2.

После инкубации производят определение числа выросших микроорганизмов на средах в тех разведениях, где количество колоний поддается визуальному учету *. Расчет количества колониеобразующих единиц микроорганизмов (КОЕ) в 1 грамме исследуемого материала производят по формуле:

$$X = Lg(N \cdot 10 \cdot 10^n)$$

где X — логарифм числа КОЕ в 1 г фекалий;

N — число колоний, формирующихся на средах при высеве соответствующего разведения фекалий;

10 — постоянный коэффициент при посеве 0,1 мл разведения фекалий;

n — степень разведения фекалий, взятого для посева.

В приложении 3 представлены количественные характеристики содержания некоторых групп микроорганизмов в фекалиях интактных белых крыс.

Параллельно с проведением микробиологических исследований проводят определение содержания действующего агента в биосубстратах (сыворотке крови, фекалиях) с помощью методов, принятых для каждого конкретного вещества, а также измеряют коэффициент массы слепой кишки как показатель клинического проявления дисбактериоза.

3.3. Определение порога хронического антимикробного действия ($Lim_{ch\ am}$)

Показатель характеризует опасность развития дисбактериоза кишечника в условиях хронического ингаляционного воздействия.

Порог хронического антимикробного действия устанавливается в эксперименте на белых крысах путем 4-х часовых ингаляционных воздействий 5 раз в неделю на протяжении 1 месяца. Обычно вещества исследуются в двух концентрациях: на уровне $Lim_{ac\ am}$ и на порядок ниже. Исследования проводятся на одинаковых по количеству (10 — 12 животных) подопытных группах с соответствующим контролем. В период ингаляционной затравки бактериологическое обследование животных проводят в динамике: до затравки (фон),

---

* При необходимости проводят микроскопические и биохимические исследования выделенных культур для подтверждения их принадлежности к исследуемому семейству, роду.

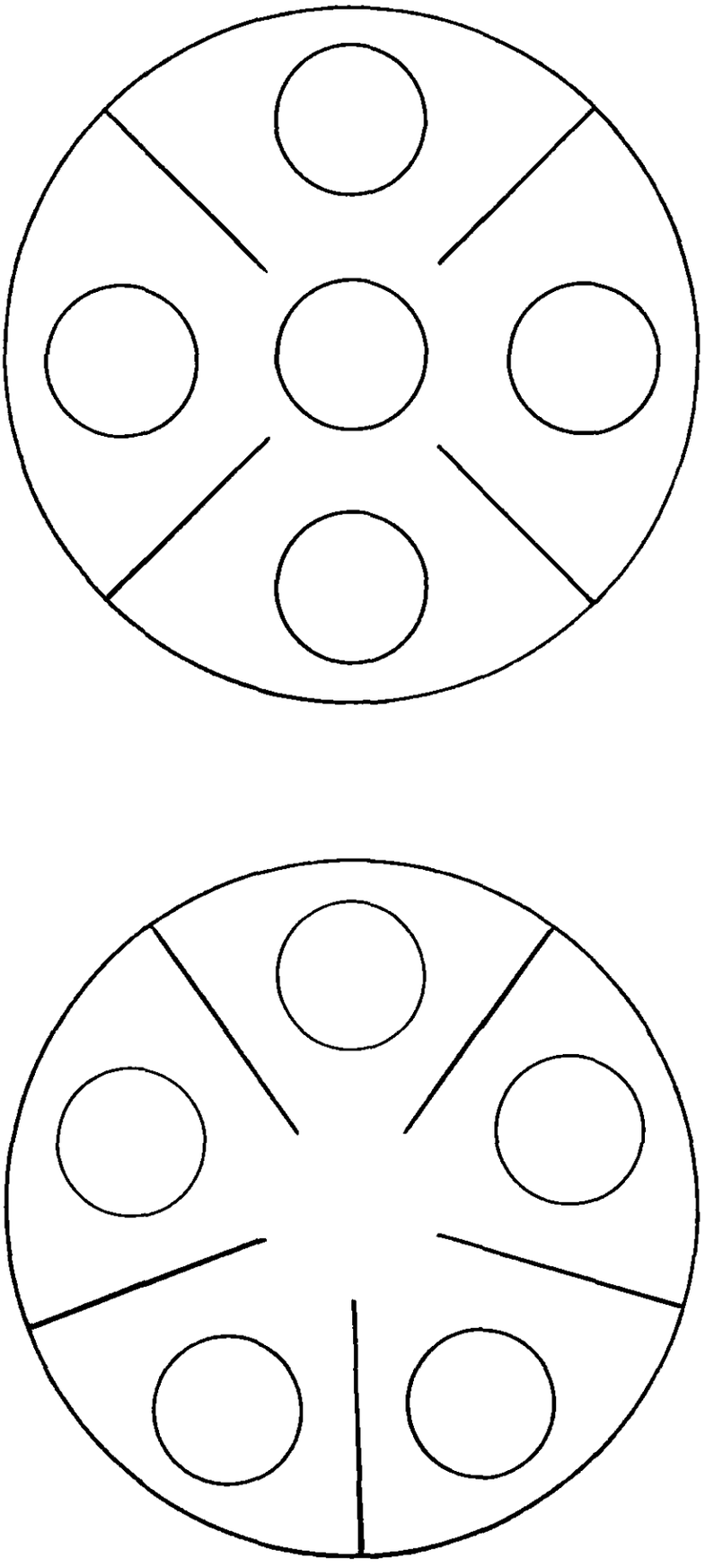

Рис. Схема нанесения разведений на чашку.

Таблица

Рекомендуемые микробиологические показатели, среды и условия культивирования микроорганизмов

Изучаемые группы микроорганизмов	Питательные среды	Разведения фекалий для посева *	Условия культивирования	Количество питательной среды, посуда
1	2	3	4	5
I группа микробиологических показателей				
Анаэробные бактерии	Анаэробный агар	10^{-4}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}	37°, 120 часов, анаэробные,	Чашки Петри ** 20 — 25 мл
Кишечные палочки	Среда Эндо	10^{-2}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}	37°, 20 часов, аэробные	—»—
Стафилококки	Солевой агар	10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}	37°, 48 часов, аэробные	—»—
Фекальные стрептококки	Азидовый агар	10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}	37°, 72 часа, аэробные	—»—
Лактобактерии	Среда для молочно-кислых бактерий	10^{-3}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}	37°, 48 часов, анаэробные	—»—

II группа микробиологических показателей

Антибиотикорезистентные кишечные палочки	Среда Эндо+ изучаемый антибиотик ***	10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}	37°, 20 часов, аэробные	Чашки Петри, 20 — 25 мл
Антибиотикорезистентные стафилококки	Солевой агар+ изучаемый антибиотик ***	10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}	37°, 48 часов, аэробные	—»—
Антибиотикорезистентные фекальные стрептококки	Азидовый агар+ изучаемый антибиотик ***	10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}	37°, 72 часа, аэробные	—»—
Лактозонегативные условно-патогенные грамотрицательные бактерии	Бактоагар Плоскирева	10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}	37°, 20 часов, аэробные	Чашки Петри, 30 — 40 мл
Клостридии	Среда Вильсона-Блера	10^{-2}, 10^{-4}, 10^{-6}	37°, 20 часов, аэробные	Бактериологические пробирки 9 мл

* В конкретных условиях опыта разведения фекалий могут быть изменены

** При использовании чашек Петри диаметром 90 мм количество питательной среды 15 — 20 мл

*** Исследуемый препарат добавляют в питательную среду в концентрации, соответствующей 5 МПК для данной группы микроорганизмов

на 2-ой и 4-ой неделях затравочного периода и через 1 месяц после окончания затравки (восстановительный период). Одновременно с бактериологическим обследованием определяют содержание антибиотика в биосубстратах животных. По окончании затравки и восстановительного периода определяют коэффициент массы слепой кишки.

3.4. Критерии для установления порогов вредного действия антибиотиков на нормальную микрофлору кишечника

Применительно к аспектам промышленной токсикологии реакцию нормальной микрофлоры на воздействие антибиотиков можно разделить на 2 основные категории. 1 категория — кратковременные изменения микрофлоры, не сопровождающиеся нарушением физиологических функций макроорганизма и быстро восстанавливающиеся после прекращения воздействия повреждающего агента. Это так называемые дисбактериальные реакции, являющиеся отражением процесса адаптации биоценоза макроорганизм — микрофлора к изменившимся условиям внешней среды. 2 категория — стойкие количественные и качественные изменения микрофлоры кишечника, сохраняющиеся после окончания воздействия и, как правило, имеющие те или иные клинические проявления — дисбактериоз. Таким образом, реализация повреждающего действия антимикробного агента на нормальную микрофлору происходит при переходе изменений первой категории в изменения второй категории.

Критерии дисбактериоза

— Изменения не менее двух бактериологических показателей I группы статистически значимо ($p \leqslant 0{,}05$) отличаются от параллельного контроля и выходят за пределы физиологических колебаний ($\pm 2\delta$) среднегрупповых значений показателя данной серии контрольных животных.

— Изменения трех и более бактериологических показателей II группы статистически значимо ($p \leqslant 0{,}01$) отличаются от параллельного контроля.

— Изменения любого из бактериологических показателей статистически значимо отличаются от контроля, не выходят за пределы физиологической нормы, однако сохраняются после окончания воздействия (в остром опыте — не менее 144 часов, в хроническом опыте — не менее 1 месяца после окончания воздействия).

Критерии дисбактериальных реакций

— Изменения бактериологических показателей I группы статистически значимо ($p \leqslant 0{,}05$) отличаются от параллельного контроля, однако находятся в пределах физиологической нормы и быстро восстанавливаются после прекращения воздействия.

— Изменения не более двух бактериологических показателей II группы статистически достоверно ($p \leqslant 0{,}01$) отличаются от контроля, но восстанавливаются после прекращения воздействия.

4. ИЗУЧЕНИЕ СЕНСИБИЛИЗИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ АНТИБИОТИКОВ

Оценка сенсибилизирующего действия антибиотиков осуществляется в соответствии с методическими рекомендациями «Постановка исследований по гигиеническому нормированию промышленных аллергенов в воздухе рабочей зоны» (МЗ СССР, № 2121 — 80). Схема токсиколого-аллергологического эксперимента включает:

— выявление сенсибилизирующих свойств и установление минимальной сенсибилизирующей дозы (MSD) при однократном введении препарата в кожу уха морским свинкам;

— определение опасности развития контактного аллергического дерматита при эпикутанном воздействии;

— установление величины порога сенсибилизирующего действия (Lim_{al}) в хроническом эксперименте в условиях ингаляционной затравки по 4 часа 5 раз в неделю в течение 1 месяца.

5. ИЗУЧЕНИЕ ОБЩЕТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ АНТИБИОТИКОВ

Оценка общетоксического действия антибиотиков проводится в соответствии с «Методическими указаниями к постановке исследований для обоснования санитарных стандартов вредных веществ в воздухе рабочей зоны» (М., МЗ СССР, № 2163 — 80). Схема токсикологического эксперимента включает:

— определение верхних параметров острой токсичности;

— определение порога острого общетоксического действия (Lim_{ac});

— определение кумулятивных свойств;

— изучение местного действия на кожу и слизистую оболочку глаз;

— определение порога хронического общетоксического действия (Lim_{ch});

— оценка действия на генеративную функцию.

Определение среднесмертельных доз ($ЛД_{50}$) проводят при введении препаратов в желудок белым мышам массой 18 — 22 г. Поскольку антибиотики, как правило, малотоксичны при введении в желудок, целесообразно определение среднесмертельных доз при однократном введении в брюшную полость с целью накопления данных о сравнительной токсичности. Этот же способ введения следует использовать при изучении половой и видовой чувствительности животных к антибиотикам (возможно применение метода «одной точки»). Признаки интоксикации при однократном введении антибиотиков в зависимости от пути введения развиваются обычно в

течение первых 1 — 2 суток, в связи с чем наблюдение за состоянием животных после однократного введения можно ограничить 1 неделей.

Количественная оценка кумулятивного эффекта может быть проведена путем определения содержания антибиотика в биологических субстратах животного при однократном и повторном введении его в организм. Для прогнозирования материальной кумуляции может быть также использована такая биологическая характеристика, как период полувыведения, т. е. промежуток времени, в течение которого выделяется половина находящегося в биологической системе вещества.

Второй метод определения кумулятивных свойств антибиотиков — биологический метод, использующий в качестве критерия коэффициент кумуляции, т. е. отношение суммарной дозы, вызывающей определенный эффект (например, смертельный) при дробном введении ее в организм, к величине дозы, оказывающей тот же эффект при однократном введении. В этом случае для определения степени кумуляции предпочтителен метод Лима с соавт. (1961).

Установление порога острого общетоксического действия проводят на белых крысах. Условия проведения затравки аналогичны описанным для установления $Lim_{ac\ am}$. В качестве критериев общетоксического действия используются интегральные показатели и показатели, характеризующие состояние отдельных органов и систем. Выбор последних определяется имеющимися в литературе данными по лекарственной токсикологии и фармакологии исследуемого препарата. Учитывая присущее многим антибиотикам иммуномодулирующее действие, целесообразно использование тестов, позволяющих оценить состояние неспецифических защитных факторов (барьерные свойства кожи, клеточные и гуморальные факторы).

При установлении Lim_{ac} обследование животных проводится либо непосредственно после окончания затравки, либо на следующие сутки в зависимости от характеристики используемых тест-показателей.

Порог хронического общетоксического действия (Lim_{ch}) определяется в тех случаях, когда выявлена высокая абсолютная токсичность изучаемого соединения (1 и 2 классы опасности по величине $ЛД_{50}$) и узкая зона специфического антимикробного эффекта (Z_{am}). Последняя служит мерой избирательности действия исследуемого антибиотика и определяется как отношение $ЛД_{50}$ к $ЕД_{50\ кмск}$ или Lim_{ac} к $Lim_{ac\ am}$. В том случае, когда величина зоны антимикробного действия определяет не менее, чем 50-кратный разрыв между $ЛД_{50}$ и $ЕД_{50\ кмск}$ и не менее, чем 5-кратный разрыв между Lim_{ac} и $Lim_{ac\ am}$, определением порога общетоксического действия в хроническом эксперименте можно пренебречь.

При необходимости оценки действия антибиотиков на генеративную фунцию исследования проводятся в соответствии с методическими рекомендациями «Методы экспериментального исследования по установлению порогов действия промышленных ядов на генеративную функцию с целью гигиенического нормирования»

(М., МЗ СССР, № 1744 — 77). Учитывая специфические проявления биологического действия антибиотиков (аллергенный и антимикробный эффект), рекомендуется исследовать возможность внутриутробной сенсибилизации и повреждения микроэкологического статуса потомства.

6. ОБОСНОВАНИЕ ВЕЛИЧИНЫ ПДК

При установлении ПДК антибиотика в воздухе рабочей зоны необходимо исходить из лимитирующего порога вредного действия в хроническом эксперименте, придерживаясь следующих положений.

— Если лимитирующим показателем является дисбиотическое действие, то ПДК устанавливается по порогу антимикробного действия. При переходе от пороговой концентрации к ПДК коэффициент запаса выбирается с учетом значений $Lim_{ac\ am}$, $Lim_{ch\ am}$ и увеличивается с увеличением зоны хронического антимикробного действия. В обычных случаях коэффициент запаса лежит в интервале от 5 до 10.

— Если лимитирующим является порог аллергенного действия, то ПДК устанавливается в соответствии с принципами, изложенными в методических рекомендациях «Постановка исследований по гигиеническому нормированию промышленных аллергенов в воздухе рабочей зоны» (МЗ СССР, № 2121 — 80).

— Если пороги аллергенного и антимикробного действия выше порога общетоксического действия, то ПДК должна устанавливаться по токсическому эффекту. Обоснование коэффициента запаса в этом случае осуществляется в соответствии с положениями, рекомендуемыми в «Методических указаниях к постановке исследований для обоснования санитарных стандартов вредных веществ в воздухе рабочей зоны» (М., МЗ СССР, № 2163 — 80).

Показатели коэффициентов массы слепой кишки, характеризующие «норму» у беспородных белых мышей

Масса животных, г	Объем выборки	M	σ	C_v, %	m	Границы довер. интервала		M±2δ
						нижний	верхний	
18 — 22	100	1,91	0,38	19,9	0,04	1,84	1,99	1,15 — 2,67
18	15	2,10	0,37	17,6	0,16	1,66	2,55	1,36 — 2,84
19	15	1,95	0,26	13,3	0,08	1,76	2,14	1,43 — 2,47
20	20	1,94	0,31	16,0	0,07	1,80	2,09	1,32 — 2,56
21	35	1,99	0,38	19,1	0,08	1,86	2,11	1,23 — 2,75
22	15	1,91	0,45	23,6	0,12	1,65	2,17	1,01 — 2,81

ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ

1. Среды для учета количества аэробных грамотрицательных бактерий.

1.1. Среда Эндо для учета кишечных палочек. Среду готовят из сухого агара Эндо Дагестанского НИИ питательных сред по прилагаемой прописи. Готовую среду разливают в чашки Петри, чашки ставят на горизонтальную поверхность, дают среде застыть и подсушивают в условиях, исключающих обсеменение среды*. Чашки с застывшей средой не оставлять на свету. Среда Эндо должна быть бесцветной, порозовевшая среда для диагностических целей непригодна. Типичные кишечные палочки формируют темно-красные с металлическим блеском колонии (лактозоположительные).

1.2. Среда Плоскирева для учета лактозонегативных условно-патогенных бактерий. Среду готовят из сухого бактоагара Плоскирева Дагестанского НИИ питательных сред по прилагаемой прописи.

Условно-патогенные грамотрицательные бактерии (протеи, серрации, гафнии, некоторые виды энтеробактеров, ацинетобактер, псевдомонады и другие микроорганизмы) формируют колонии бесцветные, желтоватые или под цвет среды. Клебсиеллы образуют влажные, слизистые, выпуклые колонии бледно-розового цвета. Те кишечные палочки, рост которых не ингибируется на этой среде, растут в виде мелких, розовых колоний, которые в данном исследовании не учитываются.

2. Среда для учета стафилококков (солевой агар).

Солевой агар готовится из сухого солевого агара Ставропольского НИИ вакцин и сывороток по прилагаемой прописи.

Стафилококки формируют белые или желтоватые разных оттенков колонии размером 0,5 — 1,5 мм, непрозрачные, выпуклые, с четкими краями. На средах с высоким содержанием хлорида натрия, кроме стафилококков, растут многие виды рода Bacillus, формируя крупные слизистые колонии.

3. Среда для учета молочно-кислых бактерий

Содержание в граммах на 1 литр воды:

Триптон или гидролизат казеина Олайнского завода	10,0

---

* Условия розлива и подсушивания чашек аналогичны и для других сред. Следует иметь в виду, что чрезмерное подсушивание чашек со средами нежелательно не только из-за потери необходимой влаги, но часто и увеличения концентрации ингибирующих веществ.

Дрожжевой экстракт	5,0
Калий фосфорно-кислый двузамещенный	2,0
Аммоний лимоннокислый двузамещенный	2,0
Глюкоза	20,0
Твин-80	1,0 мл
Натрий уксуснокислый	5,0
Магний сернокислый	0,58
Марганец хлористый	0,14
Железо сернокислое	0,04
Агар-агар	15,0

Ингредиенты добавляют к воде, доводят до кипения при помешивании, устанавливают pH 6,7. Стерилизуют при 112° 30 мин.

Колонии лактобактерий полиморфные, плоские или выпуклые, белого или бело-палевого цвета, поверхность зернистая или гладкая. На среде могут расти дрожжеподобные грибы в виде выпуклых плотных колоний белого цвета, а также фекальные стрептококки в виде мелких белых колоний.

4. Среда для фекальных стрептококков (азидовый агар)

Содержание в граммах на 1 литр воды:	
Пептон	10,0
Дрожжевой экстракт	10,0
Глюкоза	7,5
Хлористый натрий	7,5
Азид натрия	0,2
Агар-агар	15,0

Ингредиенты добавляют к воде, нагревают до кипения при помешивании, устанавливают pH 9,0 и стерилизуют при 112 °С 30 мин.

Рост фекальных стрептококков в виде мелких (0,5 мм) колоний, белых с голубоватым оттенком, малопрозрачных.

На азидовом агаре могут также расти отдельные виды лактобактерий в виде очень плоских, неправильной формы, серо-бежевого цвета колоний.

5. Среда для клостридий (железо-сульфитный агар Вильсона-Блера). Среда состоит из двух частей, которые смешиваются непосредственно перед проведением анализа.

Первая часть — 3% мясо-пептонный агар с 1% глюкозы, pH 7,4. Компоненты второй части среды не стерилизуют, а готовят стерильно. Отдельно готовят 20% раствор сернистого натрия (сульфита натрия) (хранить не более двух недель) и 8% раствор хлорного железа (хранить до 1 года).

Перед проведением анализа рассчитывают необходимое количество пробирок (по 3 пробирки на 1 анализ фекалий). Расплав-

ленный агар отливают мерно из расчета не менее 10 мл на 1 пробирку (30 мл на 1 анализ). На 100 мл расплавленной, регенерированной в кипящей водяной бане в течение 30 минут агаризованной среды добавляют 10 мл раствора сульфита натрия и 1 мл раствора хлорного железа и после перемешивания готовую среду Вильсона-Блера (9 мл) добавляют к 1 мл соответствующего разведения фекалий в заранее подготовленные пробирки. Содержимое пробирок тщательно перемешивают вращением между ладонями или легким покачиванием. Клостридии растут в виде черных колоний.

6. Среды для учета анаэробных микроорганизмов.

6.1. Вариант 1.

Содержание в граммах на 1 литр воды:	
Триптон (гидролизат казеина Олайненского завода)	5,0
Пептон Олайненского завода или чешский	5,0
Дрожжевой экстракт	5,0
L — аргинин	1,0
Сернокислый аммоний	0,4
Крахмал растворимый	1,6
Глюкоза	2,5
Тиогликолевая кислота	0,4
Цистеин солянокислый	0,38
Углекислый натрий	0,7
Агар-агар	15,0

Ингредиенты добавляют к воде, нагревают при помешивании, устанавливают pH 7,0 и стерилизуют при 112 °С 30 мин. Перед употреблением к расплавленной и остуженной до 45 °С среде добавляют 5% лизированной попеременным замораживанием и оттаиванием цитратной крови и 1 мл 0,05% спиртового раствора викасола (витамин К).

6.2. Вариант 2.

Содержание в граммах на 1 литр воды:	
Пептон Олайненского завода (или чешский)	15,0
Дрожжевой экстракт	5,0
Д(+) глюкоза	10,0
Натрий хлористый	5,0
Тиогликолевая кислота	0,4
L-цистин	0,4
(или LD-цистин)	0,8
Викасол 0,1% раствор в абсолютном спирте	10,0 мл
Гемин 0.2% раствор в 1 N NaOH	2,5 мл

Азид натрия	0,08
Агар-агар	15,0

Ингредиенты смешивают (цистин и азид натрия перед внесением в среду растворяют в минимальных количествах (1 — 2 мл) соответственно 1 N NaOH или воды), нагревают до кипения при помешивании. Устанавливают pH 7,0 — 7,2 и стерилизуют при 121 °С 15 мин. Сразу после стерилизации среду охлаждают до 45 °С и добавляют к ней 5% крови (цитратной донорской или дефибринированной кроличьей).

Среды для анаэробных микроорганизмов готовят по любому из вариантов заранее (за 1 — 3 суток до исследования), разливают в чашки Петри, подсушивают в стерильных условиях, помещают в микроанаэростаты донышком вверх и хранят до исследования в анаэробных условиях. Последние создают трехкратным замещением специальной газовой смесью, не содержащей O_2, например, (N_2 — 85%, CO_2 — 5%, H_2 — 10%), либо применением системы Gas Pack *. Непосредственно перед посевом материала чашки со средой извлекают из анаэростата. После нанесения разведения фекалий на поверхность среды каплю распределяют бактериологической петлей по соответствующему сектору чашки, накрывают ее крышкой ** и помещают в микроанаэростат донышком вниз. Для обеспечения эвакуации водяных паров и газов, образующихся в результате метаболизма микробов, используют один из следующих приемов:

— применение специального штатива, обеспечивающего наличие зазора между чашками;

— использование прокладок между чашками, например, предметных стекол;

— расположение чашек «елочкой» (см. рисунок).

Для поглощения влаги в микроанаэростат помещают свежевысушенную стерильную фильтровальную бумагу в количестве 10 — 12 кв. дм. Для связывания остаточного кислорода в микроанаэростат с газовой смесью, содержащей водород, рекомендуется помещать палладиевый катализатор.

При учете анаэробных микробов подсчитывают количество колоний каждого типа. Для подтверждения принадлежности выросших микроорганизмов к анаэробам, по 1 колонии каждого типа отсевают на чашки с той же средой и с кровяным агаром и культивируют при 37 °С в течение 48 часов в аэробных условиях. Микроорганизмы,

---

* В случае использования для создания анаэробных условий аэрофильных бактерий (например, Serratia marcescens) по методу «часовых стекол» чашки Петри заливают анаэробным агаром в день опыта, подсушивают в термостате при 37 °С в условиях, исключающих обсеменение, или в окружении горелок. Охлаждение среды ведет к увеличению растворения в ней кислорода. Штамм микроорганизма можно получить из ГИСК им. Тарасевича.

** В случае использования пластиковых чашек в крышке у бортика делают 2 — 3 отверстия.

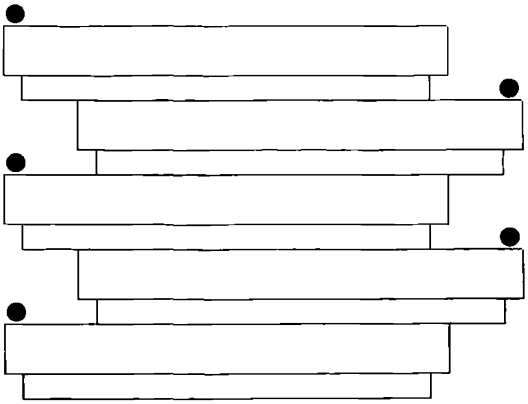

Рис. Схема расположения чашек в микроанаэростате.
«●» — место расположения отверстий в крышках чашек.

давшие рост в аэробных условиях, не учитываются в общем количестве анаэробов.

7. Среда для учета аэробных микроорганизмов (кровяной агар).

Мясопептонный агар 1,5%, pH 7,2 — 7,4 расплавляют, охлаждают до 45°, добавляют 3% цитратной крови человека (без консервантов) или дефибринированной крови животных (кролика, барана).

8. Тиогликолевый буфер.

Калий фосфорно-кислый однозамещенный	4,5 г
Натрий фосфорно-кислый двузамещенный	6,0 г
Тиогликолевая кислота	0,4 мл
Агар-агар	1,0 г
Дистиллированная вода	1000,0 мл

Ингредиенты добавляют к воде, нагревают до кипения при помешивании, устанавливают pH 6,8 и стерилизуют при 120 °С 15 мин. Регенерацию тиогликолевого буфера осуществляют путем прогревания в кипящей водяной бане в течение 20 минут.

Количественное содержание некоторых групп микроорганизмов в фекалиях интактных белых крыс

Микроорганизмы	Объем выборки	Частота встречаемости микроорганизма (%)	M±m (lg КОЕ/г)	σ
Анаэробные бактерии	220	100	9,22±0,06	0,92
Кишечные палочки	220	100	6,13±0,07	1,08
Стафилококки	143	100	4,21±0,08	0,90
Фекальные стрептококки	150	100	5,35±0,13	1,65
Лактозонегативные условно-патогенные грамотрицательные бактерии	173	19	3,49±0,15	0,83
Лактобактерии	219	100	8,66±0,07	1,04
Клостридин	129	9	2,81±0,26	0,87

ТЕРМИНЫ И УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ

$ЕД_{50\ кмск}$ — доза, вызывающая изменение микрофлоры кишечника (определяемое по увеличению коэффициента массы слепой кишки) у 50% животных.

$ЛД_{50}$ — доза, вызывающая гибель 50% подопытных животных при введении в желудок или в брюшную полость.

$Lim_{ac\ am}$ — порог острого антимикробного действия — минимальная концентрация, оказывающая повреждающее действие на нормальную микрофлору в условиях однократного воздействия.

$Lim_{ch\ am}$ — порог хронического антимикробного действия — минимальная концентрация, оказывающая повреждающее действие на нормальную микрофлору в хроническом эксперименте по 4 часа 5 раз в неделю на протяжении 1 месяца.

MSD — минимальная сенсибилизирующая доза — доза, вызывающая развитие сенсибилизации у отдельных животных (у 1 — 2 морских свинок) при однократном внутрикожном введении 0,02 мл растворов веществ в наружную поверхность уха.

Lim_{al} — порог сенсибилизирующего действия — минимальная концентрация, вызывающая развитие сенсибилизации у отдельных животных (у 1 — 2 морских свинок из 8 — 10) в хроническом эксперименте по 4 часа 5 раз в неделю в течение 1 месяца.

Lim_{ac} — порог острого общетоксического действия — минимальная концентрация, вызывающая изменения биологических функций на уровне целостного организма или органотропные эффекты, которые выходят за пределы физиологических приспособительных реакций в условиях однократного воздействия.

Lim_{ch} — порог хронического общетоксического действия — минимальная концентрация, вызывающая вредное действие на уровне целостного организма или отдельных его органов и систем

в хроническом эксперименте по 4 часа 5 раз в неделю на протяжении 4 месяцев.

Z_{am} — зона специфического антимикробного действия — отношение $ЛД_{50}$ к $ЕД_{50\ кмск}$ или порога общетоксического действия (острого или хронического) к соответствующему порогу антимикробного действия.

$Z_{ch\ am}$ — зона хронического антимикробного действия — отношение порога острого антимикробного действия к порогу хронического антимикробного действия.

gost.e-ecolog.ru