МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР
ГЛАВНОЕ САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЕ УПРАВЛЕНИЕ
ИНСТИТУТ ПИТАНИЯ АМН СССР

# МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ ТОКСИЧНОСТИ ЗЕРНА (РЖИ, ПШЕНИЦ С РОЗОВОЙ ОКРАСКОЙ ОБОЛОЧЕК.

МОСКВА - 1985 г.

gost.e-ecolog.ru

Методические рекомендации предназначены для использования учреждениями Государственного санитарного надзора и ведомственными лабораториями, осуществляющими контроль за качеством поступающего зерна.

Разработаны отделом гигиены питания Главного санитарно-эпидемиологического управления СССР ( Л.В.Селивановой,И.П.Луковцевой) и Институтом питания АМН СССР (И.Б.Куваевой, В.П.Богородицкой, Э.В.Болтянской,Е.А.Крояковой.)

"У Т В Е Р Ж Д А Ю"
Заместитель Главного государственного санитарного врача СССР

_____ / _____ /
" " _____ 198 г.
№

Методические указания по определению токсичности зерна (ржи, пшеницы) с розовой окраской оболочек.

Методические указания по определению токсичности зерна предназначаются для контроля безвредности зерна в лабораториях санэпидстанций и ведомственных лабораториях, осуществляющих контроль за качеством зерна.

В условиях повышенной влажности в период созревания хлебных злаков ( при дождливом лете и на поливных землях) возможно поражение зерновых культур,особенно ржи и пшеницы,микроскопическими грибами. Грибы могут также развиться в зерне запоздалой уборки, а также в убранном своевременно, но недостаточно просушенном или хранившемся при высокой влажности. Отдельные представители микроскопических грибов, развиваясь на зерне, образуют продукты жизнедеятельности-микотоксины, ядовитые для человека, вследствие чего зерно приобретает токсические свойства. Особую опасность представляют грибы роде *Fusarium* . Термическая обработка (выпечка хлебов,варка пищи) не разрушает ядовитые вещества,образованные фузариями. Поэтому упот-

ребление в пищу фузариозного зерна и продуктов его переработки может стать причиной заболевания людей (алиментарно-токсическая алейкия, расстройства функции кишечного тракта и др.). Поражение зерна грибами рода *Fusarium* обычно приводит к появлению розовой окраски оболочек отдельных зерен, так как многие представители фузариев при своем росте на зерне образуют наряду с токсинами красно-розовый пигмент. Поэтому розовоокрашенные оболочки зерна рассматриваются как косвенный признак фузариозного поражения. Однако розовую окраску оболочек зерна могут формировать и другие микроскопические грибы помимо фузариев.

Исследования, проведенные в Институте питания АМН СССР, показали, что токсическими свойствами может обладать не только розовоокрашенное зерно с признаками фузариоза, но и зерно без признаков фузариозного поражения, если содержание в испытуемом образце розовоокрашенных зерен превышает 3%.

В связи с этим по решению Минздрава СССР от в государственные ресурсы принимается зерно с содержанием зерен с розовой окраской и признаками фузариоза до 10 процентов. При этом зерно, содержащее до 3% розовоокрашенных, в том числе фузариозных, зерен допускается на продовольственные цели без ограничений. Вопрос об использовании зерна, содержащего от 3% до 10% розовоокрашенных и фузариозных зерен, должен решаться только после лабораторного исследования зерна на токсичность в соответствии с настоящими Методическими указаниями. Зерно, содержащее свыше 10% розовоокрашенных и фузариозных зерен, может быть использовано на фуражные и технические цели в соответствии с заключением ветеринарного надзора.

Поскольку в зерне с розовой окраской оболочек, пораженного микроскопическими грибами, может накапливаться целый ряд токсических грибных метаболитов, природа которых не всегда известна, для выявления

токсичности такого зерна целесообразно использовать биологические методы определения, позволяющие выявить в зерне весь комплекс токсических компонентов, независимо от его химической природы.

Биологические методы исследования токсичности зерна с розовой окраской оболочек включают биопробы с культурами дрожжей *Saccharomyces fragilis*, бактерий Вас. *megaterium* ВКМВ-44 и испытания на растущих крысятах.

Штамм дрожжей *Saccharomyces fragilis* 25-Д был рекомендован в качестве чувствительной микромодели для выявления фузариотоксинов ранее (Методические указания по определению токсичности зерновых культур и продуктов их переработки, пораженных грибами рода *Fusarium* секции *Sporotrichiella*. Москва, 1978г.). Этот штамм оказался удобным тест-организмом в работе и избирательно чувствительным к фузариотоксинам, поэтому он включен и в настоящие "Методические указания".

Бактериальная культура Вас. *megaterium* ВКМВ-44 чувствительна к действию ряда микотоксинов, содержащихся в экстрактах токсичного зерна (фузариотоксинам, афлатоксинам, охратоксинам). Использование этой культуры в качестве микромодели для определения токсичности зерна позволяет выявлять контаминацию зерна не только фузариотоксинами, но и микотоксинами широко распространенных микроскопических грибов из рода *Aspergillus*.

Биопробы с дрожжами *Saccharomyces fragilis* 25-Д и бактериями *Bacillus megaterium* ВКМВ-44 позволяют быстро проверить наличие у зерна токсических свойств и выявить розовоокрашенное зерно, загрязненное токсинами фузариев и аспергиллов (трихотоценовыми микотоксинами, афлатоксинами, охратоксинами).

Кроме проверки с дрожжевыми и бактериальными тестами токсичность зерна должна быть дополнительно проверена в опытах на высших животных. В качестве животных, чувствительных к действию всего комплекса токсических компонентов розовоокрашенного зерна, предлагаются

крысята вместо рекомендованных ранее голубей, так как голуби избирательно чувствительны только к фузариотоксинам, а фузариотоксины выявляются с помощью культуры дрожжей.

Определение токсичности розовоокрашенного зерна следует проводить по схеме I.

При необходимости настоящие Методические указания могут быть использованы для определения токсичности и других зерновых культур.

# СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ.

Проба зерна (500 г)

350г смолоть

"А"

100г муки
300мл хлороформа
взболтать
оставить на 24 часа
отфильтровать
в фарфоровую чашку

выпарить хлороформ
в токе воздуха при
комнатной температу-
ре в фарфоровой чашке

проба с йодом

к оставшейся массе
добавить - 0,4 мл
стерильного подсол-
нечного масла

ИССЛЕДОВАНИЕ

на Saccharo-myces fragilis 25-D — на Bac. megaterium

чашка Петри с агаром — чашка Петри с агаром

по 0,1 мл экстракта в каждую лунку

0,1мл стерильного подсолнечного масла

термостат при 35°С — термостат при 28°С

через 24 часа регистрация зон подавления роста дрожжей и бактерий.

"В"

250г муки
800мл хлороформа
взболтать
оставить на 24 часа

отфильтровать в банку с притертой пробкой

выпарить хлороформ в токе воздуха при комнатной температуре в фарфоровой чашке

проба с йодом

к оставшейся массе добавить 50 мл стерильного подсолнечного масла, перенести в колбочку

хранить в холодильнике

Введение 7 крысятам натощак по 0,5мл шприцом перорально в течение 8-дней экстракта из исследуемого зерна*

Ежедневная регистрация физического состояния или гибели животных

Взвешивание выживших животных

Забой ( натощак)

Регистрация макроскопических изменений в легких, печени, желудочно-кишечном тракте (вздутие), в пейеровых бляшках и мезентеральных лимфоузлах

* Контрольные крысята - 7 шт. получают ежедневно per os 0,5 мл экстракта из здорового зерна.

II. ПОСУДА, АППАРАТУРА. РЕАКТИВЫ .

Посуда:

I. чашки Петри (диаметр 90-I00 мм) ГОСТ 25336-82 ;

2. пипетки на I и I0 мл, градуированные ГОСТ 28336-82;

3. микропипетки на 0,I мл градуированные ; ГОСТ I770-64;

4. пробирки ( диаметр I5-I6 мм ) ГОСТ 25336-82;

5. банки стеклянные с притертой пробкой , ёмк.I,0л ;

6. фарфоровые чашки диаметр - I3 мм ;

7. стеклянные палочки ;

8. колбы конические ёмк. 50, I00, 250 и 750 мл ГОСТ 25336-82;

9. воронки стеклянные, диаметр - I0 мм ГОСТ 25336-82 ;

I0. пробойник металлический, диаметр 6-7 мм ;

II. микробиологическая петля ;

Аппаратура:

I2. горелка спиртовая или газовая ;

I3. весы торговые со стрелками на 200 г;

I4. весы технические ;

I5. кофемолка или лабораторная мельница ;

I6. оптический стандарт мутности ГИСК им. Тарасевича ;

I7. ареометр АСТ - 2;

I8. бумага фильтровальная лабораторная ГОСТ I2026-76;

I9. шприц медицинский на I мл;

20. иглы для шприца № II с напаянной на конце оливой ;

2I. ножницы ;

22. скальпель глазной ;

23. пинцеты - глазной и анатомический ;

24. холодильник бытовой ;

25. термостат на $28^0 \pm I^0$ С и $35 \pm I^0$С ;

р е а к т и в ы :

26. глюкоза х.ч. ГОСТ 975-75 ;
27. агар микробиологический ГОСТ I7206-7I ;
28. масло растительное подсолнечное ГОСТ II29-73;
29. хлороформ медицинский ГОСТ 20025-74;
30. пикриновая кислота,насыщенный водный раствор ;
3I. спиртовая настойка йода медицинская -5 % ;
32. спирт этиловый ректификованный ГОСТ I8300-72;
33. сусло пивное - технологическая инструкция от I августа I974г.
34. хлористый натрий ГОСТ 4233-77 ;
35. натрий едкий очищенный ГОСТ II078-78 - I0%раствор ;

III. ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ.

I. М я с о - п е п т о н н ы й а г а р с г л ю к о з о й :

мясо-пептонный бульон - I000 мл
агар - 20 г

Стерилизовать в течение 20 мин. при I20°С.

В остуженный до 60°С мясо-пептонный агар ввести 25 мл 40 % стерильного раствора глюкозы,размешать и использовать для постановки опыта с Вас.megaterium , или разлить в стерильные пробирки по 5 мл для приготовления скошенного агара. Пробирки со средой выдержать 24 часа в термостате при 37°С, отбраковать проросшие,остальные хранить в холодильнике не более одного месяца и использовать для пересева культуры Вас. megaterium .

2. К А Р Т О Ф Е Л Ь Н Ы Й а г а р :

картофель тёртый - 200 г
агар - 20 г
вода водопроводная - I000 мл

Картофель варят I час, фильтруют через марлю,доливают водой до первоначального объема,добавляют агар. Стерилизуют 30 минут при

I20°С и разливают по 5 мл в стерильные пробирки для приготовления скошенного агара. Хранят в холодильнике не более одного месяца, используют для пересева культуры Bac. megaterium .

3. С у с л о - а г а р :

| | |
|---|---|
| пивное сусло I4 Ball | - I00 мл |
| вода водопроводная | - I00 мл |
| агар | - 4 г |

В пивном сусле определяют содержание сахара ареометром и разводят водопроводной водой до нужной концентрации ( 7 Ball ). Определяют pH и доводят I0% р-ром NaOH до 5,8-6,0 . Добавляют агар по 2 г на I00мл разведенного сусла. Стерилизуют 30 мин. при II2°С. Перед использованием в опыте с дрожжами расплавить на кипящей водяной бане, охладить до 50° С и разлить в чашки Петри по 20 мл или в стерильные пробирки для приготовления скошенного агара. Хранить пробирки со средой в холодильнике не более одного месяца и использовать для пересева дрожжей Saccharomyces fragilis 25-D .

## IУ. ТЕСТ-ОБЪЕКТЫ.

I. К у л ь т у р а д р о ж ж е й - Saccharomyces fragilis 25-D

Культуру засевают штрихом на скошенный сусло-агар в пробирки микробиологической петлей, обожженной в пламени горелки, инкубируют при 35°С 24 часа. Выросшую односуточную культуру хранят в холодильнике и пересевают на свежие косяки сусло-агара I раз в месяц.

2. К У л ь т у р а б а к т е р и й - Bacillus megaterium - ВКМВ-44.

Культуру засевают штрихом на скошенный картофельный агар в пробирки микробиологической петлёй, обожженной в пламени горелки, и инкубируют при 28°С 24 часа. Выросшую односуточную культуру хранят в холодильнике и пересевают на свежие косяки картофельного агара через каждые две недели.

## УI. ОТБОР ЗЕРНА И ЕГО ПАСПОРТИЗАЦИЯ.

Пробы отбирают от каждой поступающей партии зерна, в соответствии с ГОСТом 3040-55.

Отобранные образцы должны быть паспортизированны. На этикетках указывается:

а) место отбора зерна (область,район,колхоз,совхоз и т.д.);

б) наименование зерновых культур (пшеница,рожь,просо и др.);

в) количество зерна, от которого взята проба (или размер партии);

г) откуда взят образец (снят на корню,из валков,из зернохранилища и т.д.);

д) дата отбора пробы ;

е) вес взятого образца;

ж) фамилия ответственного за отбор проб.

Отобранные образцы направляют на исследование в областную,краевую и республиканскую санитарно-эпидемиологическую станции,и в ведомственные лаборатории,осуществляющие контроль за качеством поступающего зерна.

## УII. ПОДГОТОВКА МАТЕРИАЛА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ.

Из поступившего на исследование образца зерна отбирают среднюю пробу около 500г, подсушивают её при температуре 40-50°С, из них 350 г измельчают на лабораторной мельнице или кофемолке в течение двух минут,делят на две порции по I00 г ("А") и 250 г ("Б"), и помещают в две стеклянные банки с притертыми пробками. Порции заливают хлороформом в количестве: порцию "А" - 300 мл, порцию "Б" - 800 мл, взбалтывают, оставляют на 24 часа. Отфильтровывают через бумажный фильтр порцию "А" в фарфоровую чашку, порцию "Б" в банку с притертой пробкой ёмкостью I л. Выпаривают порции "А" и "Б" каждую отдельно в фарфоровых чашках в токе воздуха при комнатной температуре до исчезновения следов хлороформа, определяемых по реакции с иодом*

* Постановка иодной реакции на остаточный хлороформ в экстракте зерна: на дно пустой фарфоровой чашки наносят стеклянной палочкой каплю выпаренного экстракта и каплю спиртового раствора иода. Появ-

ление розовой окраски свидетельствует о присутствии хлороформа и необходимости дальнейшего выпаривания. Отсутствие порозовений свидетельствует о полном удалении хлороформа из экстракта.

Полученный таким образом сгущенный экстракт порции "А" используют для постановки опытов с культурой дрожжей Saccharomyces fragilis 25-Д и бактерий Bacillus megaterium . Если остаток экстракта затвердел, его слегка разводят добавлением 0,4 мл стерильного подсолнечного масла.

Сгущенный экстракт из порции "Б" разводят 50 мл стерильного подсолнечного масла и получают маслянный экстракт зерна, который хранят в холодильнике в стерильных колбочках емк. 50 мл. и используют для введения экспериментальным крысятам.

В качестве контроля готовят как описано выше для порции " Б" маслянный экстракт доброкачественного зерна нормальной окраски.

## УIII. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТОКСИЧНОСТИ ЗЕРНА ПРИ ПОМОЩИ ЧУВСТВИТЕЛЬНОГО К ФУЗАРИОТОКСИНАМ ШТАММА ДРОЖЖЕЙ Saccharomyces fragilis 25-Д

Для проведения исследования культуру дрожжей из исходной пробирки хранящейся в холодильнике, пересевают штрихом микробиологической петлей, обожженной в пламени горелки,на скошенный сусло-агар в пробирки и инкубируют при температуре 35°С в течение 24 часов.

Затем в пробирку с выросшей односуточной культурой дрожжей наливают IO мл стерильной водопроводной воды и стерильной петлёй взбалтывают дрожжи в воде до получения суспенции. Суспензию переносят стерильной пипеткой на 10 мл в пустую стерильную пробирку и разводят стерильной водой до мутности, соответствующей 5 единицам мутности (0,5 млрд клеток в I мл) стандарта мутности . По 2 мл приготовленной суспензии дрожжевых клеток наливают в заранее приготовленные стерильные чашки Петри (2мл суспензии на I чашку) и заливают расплавленным и охлажденным до 50°С сусло-агаром из расчета 20 мл на чашку и тщательно перемешивают. В застывшей пластинке агара пробочным пробойником

диаметром 6-7 мм,обработанным методом фламбирования,делают лунки по 3 лунки на чашку согласно схеме I. В лунку вносят по 0,Iмл экстракта порции "А" стерильными микропипетками. Для каждого образца закапывают две лунки. В качестве контроля в третью лунку вносят стерильное подсолнечное масло. Чашки ,не перевёртывая вверх дном , ставят в термостат и инкубируют сутки при 35°С.

В контроле стерильные зоны отсутствуют. При наличии стерильных зон в контроле опыт повторяют со свежей культурой.

При наличии в экстрактах зерна фузариотоксинов вокруг лунок с экстрактами образуются зоны подавления роста дрожжей-стерильные зоны. В случае образования стерильных зон шириной Iмм зерно оценивается как токсичное. Содержание трихотеценовых микотоксинов, в частности Т-2 токсина в таком зерне достигает - 0,45мг/кг зерна и более чем превышает предполагаемый предельно допустимый уровень Т-2 токсина в пищевых продуктах.

Если стерильные зоны не образуются, то даётся заключение,что зерно не содержит фузариотоксинов трихотеценовой природы.

Далее зерно исследуют в опытах с Bacillus megaterium и на крысятах.

## IX. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНТАМИНАЦИИ ЗЕРНА МИКОТОКСИНАМИ ПРИ ПОМОЩИ ЧУВСТВИТЕЛЬНОГО ШТАММА БАКТЕРИЙ BACillus megaterium ВКМВ-44.

Для проведения анализа культуру бактерий Вас.megaterium ВКМВ-44 на картофельном агаре из пробирки, хранящейся в холодильнике, пересевают штрихом микробиологической петлёй,обожженной в пламени горелки, на скошенный МПА с I% глюкозы или картофельный агар* и инкубируют при температуре 28°С 24 часа. Готовят суспензию клеток из выро-

---

* Картофельный агар обеспечивает лучший рост культуры, чем МПА с I% глюкозы.

шей односуточной культуры бактерий в стерильном физиологическом растворе NaCl(0,85%)по эталону мутности № 5, что соответствует 5единицам мутности стандарта мутности.

В расплавленный и охлажденный до 50°С МПА с I% глюкозы или картофельный агар вносят приготовленную клеточную суспензию в количестве I5 мл на I00 мл агара и разливают в приготовленные чашки Петри из расчета 20 мл на чашку. В застывшей пластинке агара пробочным пробойником диаметром 6-7мм, обработанным методом фламбирования, делают лунки по 3 лунки на чашку согласно схемеI. В две лунки вносят по 0,Iмл экстракта порции "А" стерильными микропипетками на 0,Iмл. В третью лунку в качестве контроля вносят стерильное подсолнечное масло. Чашки, не перевёртывая вверх дном, ставят в термостат и инкубируют сутки при 28°С.

В контроле стерильные зоны вокруг лунок не образуются. В случае появления стерильных зон вокруг лунок в контроле опыт повторяют со свежей культурой бактерий.

При появлении вокруг лунок с экстрактами из испытуемого зерна стерильных зон шириной свыше Iмм зерно оценивается как токсичное.

Если стерильные зоны вокруг лунок не образуются, дается заключение,что зерно не содержит микотоксины грибов рода *Aspergillus* .

Зерно затем исследуют в опытах с крысятами.

## X. БИОЛОГИЧЕСКАЯ ПРОБА НА КРЫСЯТАХ.

Используют молодых крысят линии Вистар, самцов весом 50-70г в количестве 6-7 животных на каждую пробу зерна.

Животных осматривают, отбраковывают больных, взвешивают, метят пикриновой кислотой,в соответствии с меткой записывают номер животного, помещают по 3 штуки в клетку. Клетки маркируют-"опыт","контроль", ставят дату начала опыта.

Ежедневно крысятам вводят в пищевод через рот по 0,5 мл "масля-

ного экстракта" исследуемой пробы зерна. Для введения используют медицинский шприц, расчитанный на дозу объёмом 1мл, и иглу для шприца №II, на конец которой напаивается олива. Экстракт вводят ежедневно один раз в сутки утром натощак, для чего с вечера убирают из клетки обычный виварный корм,оставляя воду для питья. После введения экстракта ставят в клетку виварный корм. Длительность опыта с введением "масляного экстракта" зерна 8 суток. В качестве контроля используют 6-7 крысят того же возраста и веса, которым вводят в течение опыта ежедневно натощак по 0,5 мл "масляного экстракта", приготовленного из доброкачественного зерна нормальной окраски.

Ежедневно следят за общим состоянием животных,отмечают вялость, расстройства пищеварения, рвоту,тремор,взъерошенность шерсти как симптомы возможного токсического действия испытуемых образцов зерна.

Признаком острой токсичности служит гибель животных в течение опытного периода.

При отсутствии острого токсического действия экстрактов зерна доброкачественность последнего оценивается на основе комплекса признаков, включающих клинические симптомы; весовые характеристики животных и состояние их органов.

Для получения перечисленных сведений по окончании опыта контрольных и опытных животных натощак взвешивают, забивают методом декапитации,вскрывают и исследуют визуально состояние органов, сначала у контрольных животных,затем у опытных.Отклонения регистрируются по сравнению с контрольными животными.Отмечают светлую окраску или желтизну,зернистую консистенцию печени,воспаление легких, вздутость кишечника,увеличение пейеровых бляшек в тонкой кишке и увеличение размеров мезентерального брыжеечного лимфоузла,гиперемированные кровеносные сосуды в нем. Печень взвешивают.

При визуально обьаруживаемых отклонениях в печени морфологические

исследования подтвердили наличие жировой и белковой дистрофии и другие нарушения микроструктуры органа; при визуально обнаруживаемых отклонениях в лимфоузле морфологические исследования подтвердили наличие кровоизлияний в этом органе, обеднение клеточного состава в фолликулярных центрах и другие нарушения микроструктуры; при визуальном осмотре пейеровых бляшек в тонкой кишке при токсическом действии выявляются увеличенные или уменьшенные размеры по сравнению с контролем, резкогиперимированные сосуды и изменения морфологической структуры органа; визуально обнаруживаемые изменения в кишечнике также подтверждались морфологическими исследованиями, свидетельствующими о нарушении микроструктуры крипт,эпителия, субэпителиальных слоев с выраженной их инфильтрацией круглоклеточными элементами; кроме того у этих животных выявлены морфологическими методами нарушения в структуре тимуса, селезёнке и почек. Морфологические исследования полностью подтвердили правомочность суждения о наличии токсического действия по визуально выявляемым признакам патологических отклонений в органах забитых животных.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЙ РЕГИСТРИРУЮТСЯ В ЖУРНАЛЕ ПО ФОРМЕ № I.

I. На основе полученных данных учитывают количество погибших животных и их %; если гибели животных не отмечалось, то записывают- 0

2. На основе взвешивания животных рассчитывают прирост массы тела в г и в % к исходному весу:

а) прирост массы в г = масса конечная - масса начальная;

б) относительный прирост массы тела в % $= \frac{\text{конечная масса-начальная масса} \times 100}{\text{начальная масса}}$

(пример: нач. масса 50г, конечная - 65г

прирост в % $= \frac{(65-50) \times 100}{50} = 30\%$) (М)

Рассчитывают среднее арифметическое значение массы тела и прироста массы у всех животных за опытный период.

к стр.14

ФОРМА №I. ФОРМА РЕГИСТРАЦИИ РЕЗУЛЬТАТОВ ИСПЫТАНИЙ ЗЕРНА НА ТОКСИЧНОСТЬ НА КРЫСЯТАХ

| № крысят-ного | Масса тела: начальная (г) | Масса тела: конечная (г) | Масса тела: прирост в г | Масса тела: прирост в % | Гибель животных | Клинические симптомы: вялость, поносы, взъерошенность свежевыделения из носа и т.д. | Визуально выявляемые изменения в органах после забоя. Легкие (пневмония-жая) | Печень (желтизна, зернистость) | Желудок (вздутие); тонкий и толстый к-к (вздутость, гиперемия сосудов) | Лейеровы бляшки в тонкой к-ке >нормы и гиперемия сосудов | Мезентериальный брыжеечный илеоцекальный узел > нормы, гиперемия сосудов | Масса печени (в г) | Относительная масса печени на 100г массы тела |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| I | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | | | | | | | | | | | | | |
| 4 | | | | | | | | | | | | | |
| 5 | | | | | | | | | | | | | |
| 6 | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | | | | | | | | | | | | | |
| Средне-е М | | | | | Всего погибших и % погибших | | Количество крысят с этими признаками | | | | | Средние по группе | |

3 . Подсчитывают средние весовые показатели массы печени и высчитывают относительную массу по следующей формуле:

$$\text{Мотн.} = \frac{\text{масса органа} \times 100}{\text{конечная масса тела}}$$

пример: вес крысенка перед забоем 70г
вес печени 3,5г

$$\text{Мотн.печени} = \frac{3,5 \times 100}{70} = 5,0\text{г}$$

4. Подсчитывают количество животных, у которых были обнаружены клинические симптомы заболевания и при вскрытии визуально обнаружены изменения в вышеперечисленных органах.
По форме I заполняются и результаты обследования контрольных животных.

5. Затем составляют суммарную таблицу по форме №2,где приводят полученные данные для всех исследованных опытных образцов зерна с розовой окраской оболочек и образцов контрольного зерна нормальной окраски.

6. Оценивают токсичность зерна по данным формы №2. При токсичности зерна наблюдаются изменения одновременно по ряду признаков.
Зерно оценивается по 4-х балловой системе:

I) резкотоксичное - при гибели одного или более экспериментальных животных - (++++ или 4+);

2) токсичное - при наличии клинических признаков токсичности и отклонений в макроскопических характеристиках одного органа у I00% опытных животных или при поражении двух,трех, и более органов более чем у 50% опытных животных,что может сопровождаться потерей веса животными или резким снижением прироста массы тела и/или изменением относительной массы печени по сравнению с контролем (например: шерстный покров взерошен,все животные малоподвижны; прирост массы тела снижен в опыте - I7%, в контроле-30%; печень с желтизной и зернистостью - у 5 крысят; пневмония - у 4; лимфоузлы больше нормы - у4 крысят; кишечник вздут - у 5крысят) -(+++или3+)

к стр.I5. Ф О Р М А № 2 . СРАВНЕНИЕ ХАРАКТЕРИСТИК ОПЫТНЫХ И КОНТРОЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ, ПОЛУЧЕННЫХ ПРИ ИСПЫТАНИИ ТОКСИЧНОСТИ ЗЕРНА НА КРЫСЯТАХ.

ДАТА ОПЫТА:

| № образца зерна | Характеристика образца (%розово окрашенных зерен и откуда получен. | Количество погибших животных в % | Средний прирост массы тела выживших животных в %. | К-во животных (в%) с клиническими симптомами. | К-во животных (в%) с макроскопическими изменениями органов. | | | | | Средняя относительная масса печени выживших животных на 100г массы тела |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | легкие пневмония | печень (зернистость, желтизна, увеличена. | кишечник вздутие | брыж. лимфоузлы увеличены. | пейеровы бляшки - увеличены | |
| I. | | | | | | | | | | |
| 2. | | | | | | | | | | |
| 3. | | | | | | | | | | |
| и т.д. | | | | | | | | | | |

3) слаботоксичное - клинических проявлений нет,прирост массы близок к контролю,но при вскрытии обнаруживаются визуально у 2-3х из 7 животных I или 2 признака патологических отклонений (пневмония и желтизна печени;или вздутый кишечник и увеличенные лимфоузлы с гиперимированными сосудами и увеличенные пейеровы бляшки и т.д.) - (++ или +).

При сопоставлении контрольных и опытных животных при взятии в опыт полноценных животных, изменения в печени,кишечнике,лимфоузлах,а также свежая пневмония в контрольной группе животных не должны обнаруживаться более чем у одного животного. Если пневмония обнаружена у половины контрольных животных,то этот признак не может рассматриваться как свидетельство токсического действия исследуемого зерна при оценке показателей у опытных животных.

## XI. РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РОЗОВООКРАШЕННОГО ЗЕРНА ПОСЛЕ ПРОВЕРКИ ЕГО ТОКСИЧНОСТИ.

I. При наличии стерильных зон с дрожжами и/или Bacillus megaterium и при гибели опытных крысят (+4) зерно оценивается как резкотоксичное и не может быть использовано на пищевые цели.

2. При отсутствии стерильных зон с дрожжами и/или Bacillus megaterium но при гибели опытных крысят зерно также оценивается как резкотоксичное и не может быть использовано на пищевые цели.

3. При наличии стерильных зон с дрожжами и/или Bacillus megaterium токсическом действии на опытных крысят (3+),но без гибели животных,зерно оценивается как токсичное и не может быть использовано на пищевые цели.

4. При наличии стерильных зон с дрожжами и/или Bacillus megaterium и отсутствии токсического действия на опытных крысят зерно оценивается как слаботоксичное и может быть использовано на пищевые цели с подсортировкой доброкачественным зерном нормальной окраски до содержания розовоокрашенных зерен не выше 3%.

5. Если у зерна установлены слабые токсические свойства на животных (2+),но гибели экспериментальных животных не наблюдалось и не было выявлено стерильных зон с дрожжами и Bacillus megaterium ,зерно может быть использовано на пищевые цели с подсортировкой доброкачественным зерном нормальней окраски до содержания розовоокрашенных зерен не выше 3%.

6. Если у зерна не установлены токсические свойства в опытах на животных и не было выявлено стерильных зон с дрожжами и Bacillus megaterium,зерно с содержанием от 3до 5% розовоокрашенных и фузариозных зерен может быть использовано на продовольственные цели без ограничений.

В очень редких случаях зерно,содержащее свыше 5% зерен с розовоокрашенными оболочками,в опытах по применяемой схеме не обнаруживает токсических свойств. Однако ,хлеб является продуктом

ежедневного массового употребления и поэтому особенно нуждается в контроле за его безопасностью. Так как проверка зерна на токсичность в условиях длительного хронического эксперимента не проводится учреждениями санитарного надзора, зерно с содержанием зерен с розовоокрашенными оболочками от 5 до I0% даже при отсутствии выраженной токсичности может быть использовано на пищевые цели только с подсортировкой доброкачественным зерном до содержания розовоокрашенных зерен не выше 3%.

С введением в действие настоящих Методических указаний отменяется действие "Методических указаний по определению токсичности зерновых культур и продуктов их переработки, пораженных грибами рода Фузариум секции *Sporotrichiella* ", утвержденных Заместителем Главного Государственного санитарного врача СССР 23 марта I978г за № I829-78.

---

По вопросам практического внедрения биологических методов определения токсичности зерна следует обращаться в Институт питания АМН СССР (Москва, I09240, Устьинский проезд, дом 2/I4, телефон 227-88-6 297-74-43).

Культуру дрожжей *Saccharomyces fragilis* 25-Д можно получить в Институте питания АМН СССР по указанному выше адресу.

Культуру *Bacillus megaterium* ВКМВ-44 можно выписать из Всесоюзной коллекции микроорганизмов по адресу I42292, г. Пущино, Московской области, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР, телефон 23I-30-87, а также в Институте питания АМН СССР.

ОТРЫВНОЙ ЛИСТ

учета использования методов профилактики,диагностики и лечения

Направить в Отдел гигиены питания Главного санитарно-эпидемиологического управления при МЗ СССР (Москва,Рахмановский пер.3) или в Институт питания АМН СССР(г.Москва,Устьинский проезд ,дом2/I4).

I. Временные методические рекомендации по определению токсичности зерна (ржи,пшеницы) с розовой окраской оболочек.

2. Утверждены Заместителем Главного государственного санитарного врача СССР

Следующие пункты заполняются в учреждении, где использованы рекомендации.

3.....
(кем и когда получены)

4. Количество учреждений,внедривших методы,предложенные данным документом.....
.....

5. Формы внедрения (семинары,[illegible] специалистов,обобщения и пр.) и результаты [illegible] метода (число наблюдений за год и эффективность по [illegible] весу положительных результатов) [illegible].....
.....

6. Замечания и предложения [illegible].....
.....

Подпись.....
Должность,Ф.И.О.лица,заполнившего отрывной лист.

gost.e-ecolog.ru