

САНИТАРНО-
ГИГИЕНИЧЕСКАЯ
ОЦЕНКА
БИОЛОГИЧЕСКОГО
ОБЪЕКТА И ГОТОВЫХ
ПРОДУКТОВ,
ВКЛЮЧАЮЩИХ ЖИВЫЕ
КЛЕТКИ ПРОДУЦЕНТА

□ Использование биологического объекта в биотехнологических процессах определяет специфику технологии производств, специфику их гигиенической и санитарной оценки.

□ Особенность гигиенической оценки биологических объектов биотехнологических производств заключается в том, что оцениваются не только патогенные, но и непатогенные, сапрофитные штаммы микроорганизмов.

- Гигиеническому нормированию подлежат штаммы микроорганизмов, используемые или предполагаемые к использованию в биотехнологических процессах.
Нормированию также подлежат готовые формы препаратов, действующим началом которых являются живые микроорганизмы или их споры.

Комплексная оценка промышленных штаммов

- Изучение штаммов-продуцентов включает изучение их микробиологических, технологических, санитарно-гигиенических и экологических свойств.
- Схема испытаний штаммов, перспективных для внедрения в производство, представлена на рисунке 1

Схема испытаний новых штаммов

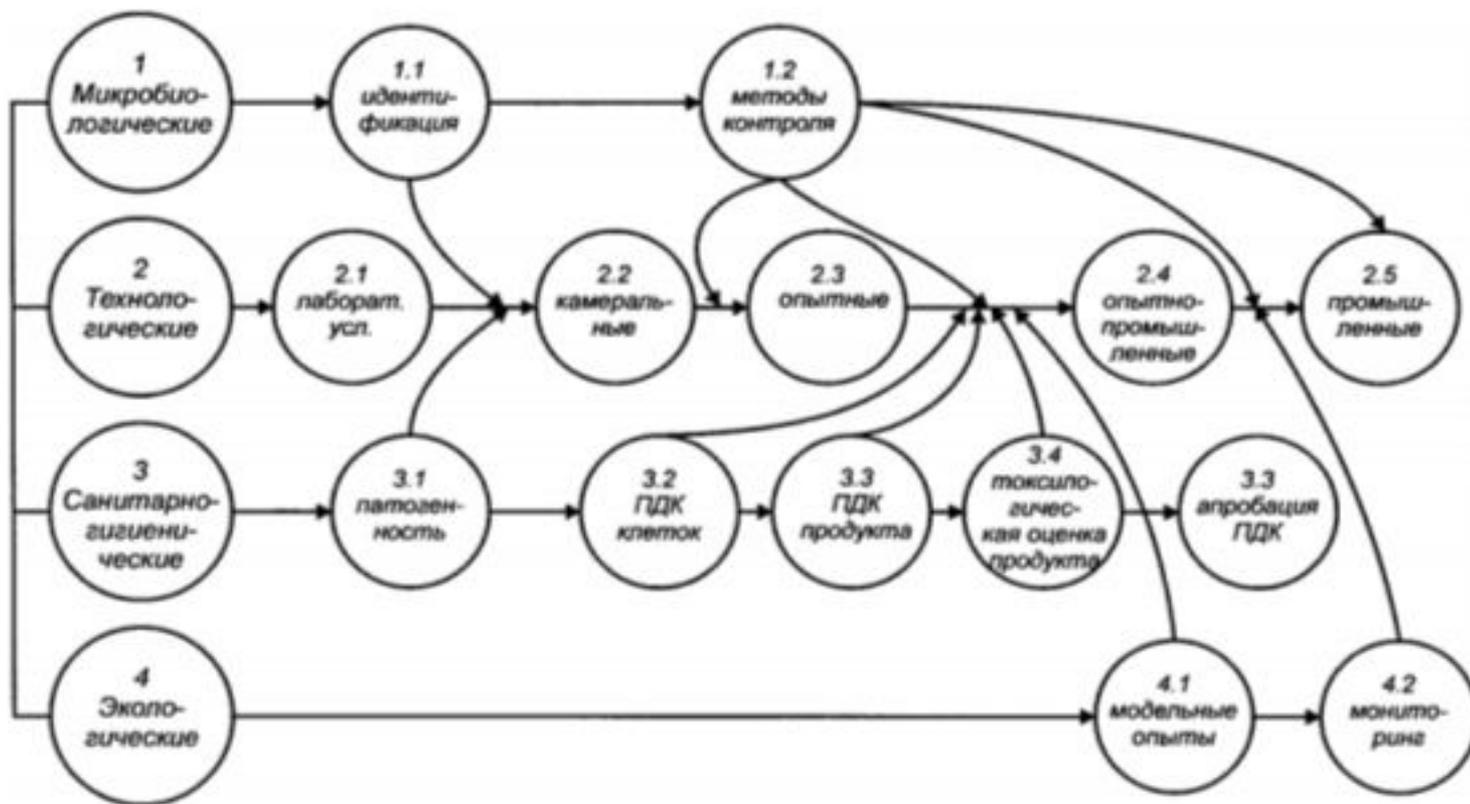


Рис. 5.1. Схема испытаний новых штаммов, перспективных для внедрения в производство

Этапы исследований

- На этапе микробиологических исследований (этап 1) определяется таксономическое положение штамма, разрабатываются методы его идентификации в промышленном процессе и окружающей среде, определяются условия его доминирования в случае незащищенных условий культивирования.
- Изучение технологических свойств штамма (этап 2) направлено на определение его промышленно-ценных свойств.
- При санитарно-гигиенических исследованиях (этап 3) определяется патогенность штамма, его вирулентность, ПДК аэрозоля живых и инактивированных клеток в воздухе рабочей зоны и в атмосферном воздухе.

- Эколого-токсикологические исследования (этап 4) включают определение приживаемости клеток продуцента в экосистемах, изучение их влияния на биоценоз экосистем – определение предельно допустимой экологической нагрузки.

Гигиеническое нормирование микроорганизмов

- Гигиеническое нормирование микроорганизмов – продуцентов и содержащих их готовых форм препаратов в объектах производственной и окружающей среды существенно отличается от обоснования санитарных стандартов химических веществ, в том числе и продуктов микробиологического синтеза.

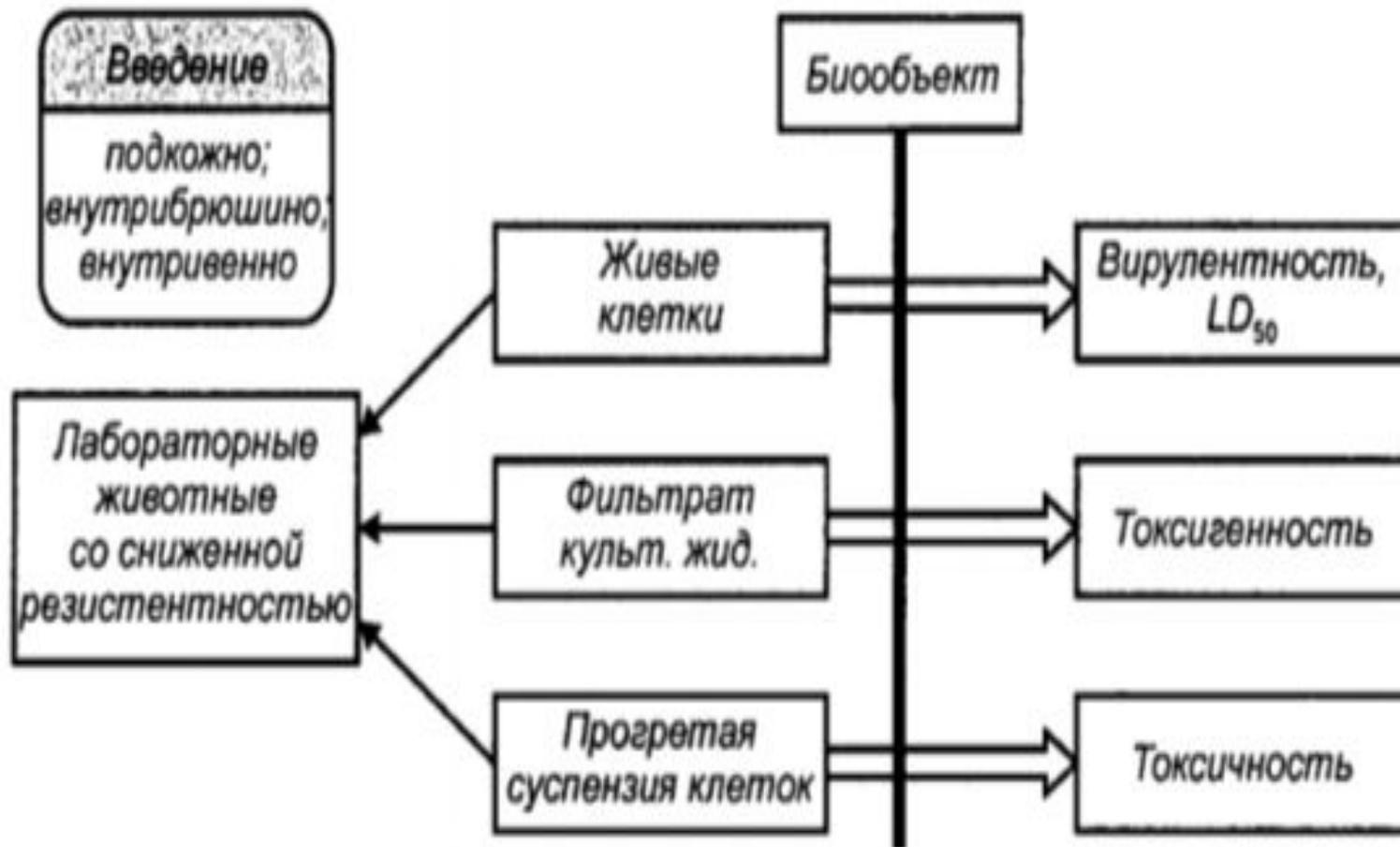
Концепция и принципы определение ПДК

- Концепция определения ПДК химических веществ не в полной мере применима к микробному загрязнению из-за принципиального различия между химическими микробным загрязнением.
- Принципы определения ПДК химических веществ основаны на принципе пороговости. Понятие порога для многих биологических агентов отсутствует.

Определение патогенности штаммов

- В соответствии с Методическими указаниями по экспериментальному обоснованию ПДК микроорганизмов-продуцентов и содержащих их готовых форм препаратов в «объектах производственной и окружающей среды для гигиенической характеристики свойств промышленных штаммов используют этиологические модели (рисунок 2).

Схема гигиенической характеристики штаммов



- В исследованиях используются лабораторные животные молодого возраста: белые мыши (масса тела 16-18г), белые крысы (масса тела 160-180г), морские свинки (масса тела 200-250г), кролики (масса тела 1500-2000г). Формирование однородных опытных и контрольных групп осуществляют из животных одной линии (популяции) с равной массой тела, однотипным поведением, сходным общим их состоянием, содержанием лейкоцитов в крови и состоянием нормальной микрофлоры организма.

- Для определения токсигенности культуры испытывается фильтрат культуральной жидкости при глубинном выращивании штамма.

- Токсичность культуры определяют при введении мышам внутрибрюшной суспензии убитых прогреванием (80°C , 30 мин) клеток в дозах 10^5 — 10^7 клеток или спор на животное.

- При комплексной токсико-гигиенической оценке биологической активности штаммов и продуктов их жизнедеятельности определяется:
 - токсичность штаммов (острая, подострая, хроническая), т.е. способность при попадании в определенных количествах в живые организмы вызывать их интоксикацию и гибель;
 - канцерогенные свойства – способность индуцировать возникновение злокачественных опухолей;
 - мутагенные свойства – способность вызывать мутации в соматических и половых клетках;

- тератогенные свойства – способность вызывать структурные трансформации или дефекты зародыша или плода;
- гонадотоксические свойства – способность нарушать развитие и функциональную способность половых клеток;
- эмбриотоксические свойства – способность вызывать любой токсический эффект у эмбриона или плода;
- аллергенные свойства – способность изменять иммунологический статус, вызывать сенсibilизацию организма.

- Показателями опасности непатогенных микроорганизмов (не вызывающих инфекционных процессов) является их токсичность, токсигенность, транзиторное микробоносительство (диссеминация во внутренних органах макроорганизма), иммуногенность (специфическое влияние на иммунную систему) и дисбиотическое действие (специфическое влияние на нормальную микрофлору организма).

Обоснование ПДК живых клеток микроорганизмов в воздухе рабочей зоны и в атмосферном воздухе

- Схема проведения исследований по обоснованию ПДК микроорганизмов-продуцентов в воздухе рабочей зоны и атмосферном воздухе предусматривает несколько этапов. На первом этапе выявляются признаки патогенности объекта, определяется вирулентность по величине LD50, токсичность и токсигенность.

- На втором этапе оценивается опасность изучаемого микроорганизма при поступлении в организм лабораторных животных путями, адекватными реальным условиям трудовой деятельности и жизни человека, с целью выбора лимитирующего критерия вредности (иммунотоксического, дисбиотического или подиссеминации микроба во внутренних органах). В результате проведенных исследований обосновывается величина ПДК.

Критерии опасности

- Критериями высокой опасности штамма (1 класс опасности) являются:
 - величина LD50 при введении микроорганизма в желудок мышей менее 10^7 , а при внутрибрюшинном – менее 10^5 клеток на одно животное;
 - выраженная токсичность - величина LD50 при введении убитой нагреванием культуры менее 10^6 клеток на животное;
 - выраженная токсигенность - величина LD50 при внутрибрюшинном введении фильтрата менее 0,5 мл на животное.

- Если гибели животных не наблюдается, то для достоверности оценки степени патогенности штаммов определяется вирулентность и на группе ослабленных животных с использованием экспериментальных нагрузок.

- На основании полученных данных выявляется лимитирующий показатель вредности, который лежит в основе гигиенического нормирования этих штаммов и продуктов.

Сенсибилизация

- Широкие исследования промышленных непатогенных штаммов и продуктов, представляющих биомассу их инаktivированных клеток, показали, что в основе проявлений неблагоприятного их воздействия на макроорганизм лежит возможность сенсибилизации организма.
- Сенсибилизация как состояние повышенной чувствительности развивается у некоторых людей в ответ на повторное введение аллергенов и зависит от характера и свойств аллергена, его количества, пути проникновения и особенностей реактивности макроорганизма.

- Выявление сенсibiliзирующего действия микроорганизмов штаммов-продуцентов проводится с живой культурой. При оценке готовых форм препаратов для сенсibiliзации животных применяется суспензия препаратов (учитывается при этом также эффект наполнителя или добавок, или растворы химических соединений, входящих в препарат), а также используется живая культура (учитывается эффект воздействия штамма-продуцента).

- Сенсibiliзирующее действие определяется воспроизведением аллергии при повторном введении аллерегена.
- Мыши (10-20 особей) сенсibiliзируются интраназально или энтерально взвесью клеток микроорганизмов в концентрации на порядок ниже LD50. Через 5 суток животные опытной группы тестируются путем введения в заднюю лапку 0,05мл взвеси исследуемого микроорганизма в той же концентрации, что и при сенсibiliзации.

- Через сутки определяется разница отека двух задних лапок опытных и контрольных групп животных.
- При определении сенсibiliзирующего действия готовой формы препарата для сенсibiliзации животных используется интраназальное или энтеральное введение препарата в концентрации на порядок ниже величины LD50, а также ингаляционное воздействие в концентрациях, выбранных для определения Limac (порога острого действия).
- Тестирование проводится методом повторного введения препарата.

- Для установления порога хронического общетоксического действия (Lim Ch) животные, сенсibilизированные суспензией изучаемого микроорганизма, подвергаются в течение 4 месяцев в специальных камерах ингаляционному воздействию аэрозолем, содержащим клетки этого же микроорганизма. Ежедневная экспозиция при установлении ПДК в воздухе рабочей зоны – 4 часа, а для ПДК в атмосферном воздухе - круглосуточно.

- Порог иммунотоксического действия определяется на основании исследования возможного появления у животных следующих эффектов: сенсibilизации, иммунизации (признак антигенности микроорганизма) и неспецифической иммуномодуляции (стимуляция и иммунодефицит) организма.

- Оценка антигенности микроорганизмов осуществляется на основе определения иммунных антител изучаемого микроба в реакциях агглютинации и фагоцитоза нейтрофилами крови.
- При реакции агглютинации исследуется агглютинация сыворотки крови животных опытной (сенсibilизированной) и контрольной групп при взаимодействии с взвесью живых клеток культуры микроорганизма.

- При реакции фагоцитоза подсчитывается формула крови сенсibilизированных и контрольных животных и определяется доля фагоцитирующих нейтрофилов и индекс активности фагоцитоза (отношение общего числа фагоцитированных клеток микроба и числа фагоцитирующих нейтрофилов).
- Для оценки иммуномодулирующего эффекта определяется в крови и лимфоидных органах содержание лимфоцитов и их популяций, Т- и В-лимфоцитов.

- За пороговую концентрацию микроорганизмов принимается та, которая вызывает сенсibilизацию 30 % животных, увеличение или иммунного ответа организма и достоверное изменение (как увеличение, так и снижение) не специфического иммуномодулирующего действия.

- Определение порога диссеминации микроорганизмов во внутренних органах осуществляется в конце хронического эксперимента и через две недели после его окончания (период восстановления).
- Для этого проводится посев крови и используется метод отпечатков легких, сердца, печени, селезенки и почек на агаризованную селективную среду.

- За пороговую принимается минимальная доза или концентрация, при которой через 2 недели после окончания хронического эксперимента исследуемый микроорганизм высеивается из внутренних органов или в них обнаруживаются патоморфологические изменения.
- Величина ПДК устанавливается исходя из лимитирующего порога хронического действия микроорганизма (иммунотоксического, дисбиотического и диссеминации во внутренних органах). Коэффициент запаса при определении ПДК в воздухе рабочей зоны принимается равным 10, а при определении ПДК в атмосферном воздухе - 100.

- Класс опасности микроорганизмов устанавливается согласно табл.5.1 и ставится пометка «А» (аллерген), если при нормировании лимитирующим признаком является сенсibiliзирующее действие.

Классификация штаммов микроорганизмов по степени опасности

Наименование показателя	Един. измерения	Нормы для класса опасности			
		1-го	2-го	3-го	4-го
Средняя вирулентная доза: при введении в желудок	кл/животное	до 10^7	10^7-10^9	10^9-10^{11}	более 10^{11}
при введении внутрибрюшинно		до 10^5	10^5-10^7	10^7-10^9	более 10^9
Средняя аллергенная доза по сенсибилизирующему эффекту	кл/животное	до 10^2	10^2-10^3	10^3-10^4	более 10^4
Порог аллергенного ингаляционного действия	кл/м ³	до 10^3	10^3-10^4	10^4-10^5	более 10^5
Порог хронического ингаляционного действия	кл/м ³	до $3 \cdot 10^3$	$3 \cdot 10^3-3 \cdot 10^4$	$3 \cdot 10^4-3 \cdot 10^5$	более $3 \cdot 10^5$
ПДК штаммов микробов: в воздухе рабочей зоны;	кл/м ³	до 200	200-2000	2000-20000	более 20000
в атмосферном воздухе	кл/м ³	до 20	20-200	200-1000	до 2000

в атмосферном воздухе	кл/м ³	до 50	50-500	500-1000	до 5000
-----------------------	-------------------	-------	--------	----------	---------

Классы макроорганизмов

- Микроорганизмы-продуценты и готовые продукты на их основе, отнесенные к 1 классу опасности не разрешаются к использованию в производстве.
- 1-й класс – чрезвычайно опасные микроорганизмы, обладают выраженным общетоксическими аллергенным действием;
- 2-й класс - высокоопасные, могут оказывать сильное аллергенное и общетоксическое действие;
- 3-й класс - умеренные, обладают слабым общетоксическими аллергенным действием;
- 4-й класс - малоопасные, практически не обладают аллергенными общетоксическим действием.

- Наиболее широкие санитарно-гигиенические исследования проведены с дрожжами р. *Candida*, которые использовались в крупнотоннажных производствах кормового белка из различных видов сырья (углеводороды, гидролизаты растительного сырья, этанол и др.). Среди 80 видов дрожжей р. *Candida* штаммы варьируют по степени патогенности от безвредных до вирулентных.

- Для человека патогенными являются *Candida albicans*. Отдельные патогенные штаммы выявлены также среди *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. pseudotropicalis*. Дрожжи р. *Candida* широко распространены в природе. Являясь сапрофитной микрофлорой, дрожжи обитают на кожных покровах, на слизистой оболочке рта, в верхних дыхательных путях, половых органах, в кишечнике и т.д. Присутствие дрожжевых клеток в воздухе рабочей зоны может приводить к носительству среди персонала и аллергизации к ним.

- По данным гигиенических обследований конца XX века, частота обнаружения дрожжей р. *Candida* на слизистых оболочках у людей разного возраста (18-30 лет), не связанных с биотехнологическим производством, составляла 53 %, что свидетельствует о роли этого рода дрожжей в «естественной» сенсibilизации населения.

- Санитарно-гигиенические обследования крупнотоннажных производств, использующих в качестве продуцентов непатогенные штаммы дрожжей р. *Candida*, показали, что промышленные штаммы могут вызывать сенсibilизацию организма. Среди рабочих выявлялись такие заболевания, как катаральные фарингиты, хронические бронхиты, пневмонии, в отдельных случаях – кандидозные ангины.

- На основании санитарно-гигиенических исследований промышленных углеводород окисляющих штаммов дрожжей р.Candida определена ПДК клеток в воздухе рабочей зоны, которая не должна превышать 5-10 кл/м воздуха.

- Бактерии метилотрофы *Methylococcus capsulatus* и *Acetobacter methylicus*, используемые в качестве продуцентов при культивировании на природном газе и метаноле, отнесены к 4-му классу опасности (средневирулентная доза при внутрибрюшинном введении – более 10^9 кл/кг). ПДК в воздухе рабочей зоны установлена на уровне $2 \cdot 10^4$ кл/м³.

Вывод

- Поскольку отдельные патогенные штаммы выявляются среди непатогенных дрожжей одного и того же вида, теоретически возможным является спонтанное вытеснение промышленного непатогенного штамма другим вирулентным штаммом. Большое значение для обеспечения безопасных условий труда персонала имеет проведение регулярного микробиологического контроля технологического процесса с целью обеспечения доминирования производственных штаммов-продуцентов в этих процессах.



*Спасибо
за
внимание*