

Научная сессия
УО «Белорусский государственный
медицинский университет»
25 января 2024 г.



Республиканское унитарное предприятие
Научно-практический
центр гигиены

ОСНОВНЫЕ ПОДХОДЫ К ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЙ ОЦЕНКЕ БИОПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ШТАММА ЭНТОМОПАТОГЕННОГО ГРИБА

Чернышова Е.В.

*к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории промышленной
токсикологии государственного предприятия «НПЦГ»*

соавторы: Шевляков В.В., Филонюк В.А., Баранов С.А.,

Студеничник Т.С.

www.rspch.by
www.certificate.by
promptox@rspch.by

Новый биологический препарат был разработан в научно-исследовательской лаборатории ГНУ «Институт леса НАН Беларуси» на основе энтомопатогенного гриба штамма *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. 20-08 (*B.b.20-08*).

Препарат предназначен для защиты хвойных насаждений (ель, сосна) от стволовых вредителей путем использования в модернизированных феромонных ловушках и путем опрыскивания еловой древесины с целью снижения численности жуков-вредителей (вершинный и шестизубчатый короеды, короед типограф).



Препарат поражает насекомых-вредителей в результате проникновения гиф гриба через их покровы. В результате поражения выделяемыми грибом токсинами наступает гибель насекомых, а также снижение жизнеспособности и плодовитости выживших особей насекомых-вредителей.

Исследования проводятся в соответствии с действующими нормативно-техническими и методическими документами Министерства здравоохранения Республики Беларусь:

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель
Министра здравоохранения – Главный
государственный санитарный врач
Республики Беларусь


И.В. Гаевский
«16» октября 2015 г.
Регистрационный № 009-1015

ОБОСНОВАНИЕ ПРЕДЕЛЬНО ДОПУСТИМЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ И
МЕТОДИК ВЫПОЛНЕНИЯ ИЗМЕРЕНИЙ СОДЕРЖАНИЯ В
ВОЗДУХЕ РАБОЧЕЙ ЗОНЫ МИКРООРГАНИЗМОВ-ПРОДУЦЕНТОВ И
МИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ИХ ОСНОВЕ

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: Республиканское унитарное предпри-
ятие «Научно-практический центр гигиены»

АВТОРЫ: д.м.н., профессор Шевляков В.В., к.м.н., доцент Филонюк
В.А., к.б.н., доцент Дудчик Н.В., к.б.н. Эрм Г.И., Студеничник Т.С.,
Козлова Т.О., к.м.н. Чернышова Е.В., к.м.н. Соболев Ю.А., Буйниц-
кая А.В., Нежвинская О.Е., Янецкая С.А., к.м.н., доцент Сычик Л.М.

Минск, 2015

 **Инструкция 1.1.10-13-56-2005.** Оценка
воздействия вредных химических
соединений на кожные покровы и
обоснование предельно-допустимых
уровней загрязнений кожи : утв. М-вом
здравоохранения Респ. Беларусь
14.11.2005. – Минск, 2005. – 23 с.

 **Инструкция 1.1.10-13-57-2005.**
Постановка исследований по
изучению раздражающих свойств и
обоснованию предельно допустимых
концентраций избирательно
действующих раздражающих веществ
в воздухе рабочей зоны : утв. М-вом
здравоохранения Респ. Беларусь
14.11.2005. – Минск, 2005. – 16 с.

Цель исследований: экспериментальная токсиколого-гигиеническая оценка нового биопрепарата на основе штамма энтомопатогенного гриба и обоснование мер гигиенической безопасности при его опытно-промышленном производстве и применении

Объект исследований:

суспензия биопрепарата с содержанием клеток и спор штамма *V.b.* 20-08 с титром $2,1 \times 10^9$ спор/см³
рабочая концентрация: $1,0 \times 10^9$ спор/см³

Основные показатели вредного (опасного) действия микроорганизмов на организм, определяемые при исследованиях биопрепаратов:

- ✓ патогенность (способность вызывать патологический процесс в макроорганизме с летальным исходом);
- ✓ токсигенность и токсичность (способность продуцировать экзо- и эндотоксины);
- ✓ раздражающее действие;
- ✓ специфическое влияние на иммунную систему (аллергенность)

Исследования I этапа:

- 1) определение степени патогенности по относительной величине Λ_{50} ;
- 2) определение токсигенности и токсичности микроорганизма

Исследования II этапа:

- определение местно-раздражающего действия на кожу;
- выявление местного раздражающего действия на слизистую оболочку глаза;
- выявление сенсibiliзирующей способности

Патогенные и токсические свойства биопрепарата на основе штамма энтомопатогенного гриба в острых опытах

Схема и объем исследований по изучению параметров патогенности и токсичности биопрепарата

Вид и количество животных опыт + контроль	Способ введения, объем	Стандартная/ (средняя фактическая) доза, спор/жив.
Белые крысы – 6 + 6	Интраназально по 0,1 см ³	1×10^8
Белые мыши – 6 + 6	Интраназально по 0,02 см ³	2×10^7
Белые крысы – 6 + 6	Внутрижелудочно по 3,0 см ³ на 180 г массы	3×10^9
Белые мыши – 8 + 8	Внутрибрюшинно по 0,5 см ³ на 20 г массы	$6,06 \times 10^8$

I этап. Патогенные и токсические свойства биопрепарата на основе штамма энтомопатогенного гриба в острых опытах

Оценку патогенности проводили по учету летальности и выраженности клинических признаков интоксикации в течение 5-ти суточного срока наблюдения.

Интегральный показатель патогенности (ИПП) рассчитывали по относительной величине LD_{50} по формуле:

$$\text{ИПП} = (D : M) \times 1000$$

ИПП – относительная величина среднесмертельной дозы испытуемого препарата в спорах/кг;

D – среднеарифметическая величина фактических введенных доз препарата в количестве спор на животное, рассчитываемых с учетом стандартной дозы и индивидуальной массы каждого животного в опытной группе;

M – средняя масса тела животных опытной группы в г;

1000 – коэффициент пересчета на кг массы тела животного

Для определения класса опасности препарата использовали критерии классификации опасности микроорганизмов-продуцентов и микробных препаратов по степени патогенности в острых опытах по ИПП испытуемого препарата в сп./кг.

I этап. Патогенные и токсические свойства биопрепарата на основе штамма энтомопатогенного гриба в острых опытах

Параметры патогенности и токсичности биопрепарата:

Вид животных	Способ введения, объем	Доза, спор/жив.	Критерии эффектов в опытной группе		Оценка действия, ИПП ($\Delta\Delta_{50}$)
			гибель	клиника	
Белые крысы	Интраназально по 0,1 см ³	1×10^8	0/6	Отсутствие	Отсутствие
Белые мыши	Интраназально по 0,02 см ³	2×10^7	0/6	Отсутствие	Отсутствие
Белые крысы	В/желудочно по 3,0 см ³ на 180 г массы	3×10^9	0/6	Отсутствие	$1,66 \times 10^{10}$ спор/кг
Белые мыши	В/брюшинно по 0,5 см ³ на 20 г массы	$6,06 \times 10^8$	0/8	Отсутствие	$2,50 \times 10^{10}$ спор/кг

I этап. Патогенные и токсические свойства биопрепарата на основе штамма энтомопатогенного гриба в острых опытах

Из Классификации опасности микроорганизмов-продуцентов и микробных препаратов по степени патогенности в острых опытах:

Интегральный показатель степени патогенности	Класс опасности (по степени патогенности)
	IV-й класс – малоопасные
Среднесмертельная доза при внутрижелудочном введении белым крысам (относительная величина $\Lambda\Delta_{50}$), спор/кг	$5,1 \times 10^9$ и более
Среднесмертельная доза при внутрибрюшинном введении белым мышам (относительная величина $\Lambda\Delta_{50}$), спор/кг	$5,1 \times 10^9$ и более

ВЫВОД: биопрепарат в унифицированных условиях экспериментального моделирования при ингаляционном, внутрижелудочном и внутрибрюшинном путях поступления в организм лабораторных животных разных видов в стандартных дозах и концентрациях не вызывал гибели животных и клинических симптомов интоксикации. Установленные параметры интегрального показателя патогенности ($\Lambda\Delta_{50}$) биопрепарата при **внутрижелудочном** введении белым крысам ($1,66 \times 10^{10}$ спор/кг) и при **внутрибрюшинном** введении белым мышам ($2,5 \times 10^{10}$ спор/кг) определили его отнесение к **IV классу опасности микробных препаратов (малоопасный)**

II этап. Раздражающее действие на организм биопрепарата на основе штамма энтомопатогенного гриба

Схема и объем исследований по определению местно-раздражающего действия на кожу и выявлению местного раздражающего действия на слизистый оболочки

При однократных четырехчасовых аппликациях биопрепарата на участки кожи спины белых крыс не выявлено видимых признаков интоксикации и гибели животных на протяжении всего периода наблюдений. Явления раздражения и воспаления кожных покровов на местах аппликаций биопрепарата (гиперемия, сухость, отек) не обнаружены значимые различия изменения толщины кожной складки с контролем



Отсутствие раздражающего действия на кожу

Инстилляции 50 мкл нативного препарата (5×10^7 спор) в нижний конъюнктивальный свод глаз кроликов сразу после внесения вызывала у животных кратковременное рефлекторное слезотечение, проходящее спустя 3-5 минут наблюдения. В последующий период наблюдения изменений со стороны конъюнктивы и других структур глаза не отмечено



Препарат не обладает раздражающим действием

II этап. Сенсibiliзирующая активность и аллергенная опасность биопрепарата на основе штамма энтомопатогенного гриба



* достоверные различия с контролем при $p < 0,001$ по критерию t

Показатели выявления гиперчувствительности замедленного типа на биопрепарат у белых крыс после подострого интраназального воздействия препаратом в дозе 1×10^9 спор на 180 г массы животного



* достоверные различия с контролем при $p < 0,001$ по критерию U и по критерию X при $p < 0,01$

1 класс аллергенной опасности

Критерии	Классы сенсibiliзирующей активности			
	1 сильные (чрезвычайно опасные)	2 выраженные (опасные)	3 умеренные (умеренно опасные)	4 слабые (малоопасные)
N	75 и >	> 50	50 и >	25 и >
Pt	<0,01-0,001	<0,05-0,01	<0,05	>0,05
Px	<0,01	<0,05	>0,05	>0,05

N – выявляемость сенсibiliзации по частоте положительного теста ВТОЛ в баллах у животных опытной группы в %; – уровень значимости достоверных различий среднegrupповых величин интегрального показателя ВТОЛ в опытной и контрольной группах по критерию t Стьюдента; Px – то же по критерию «X»