

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель

Министра здравоохранения – Главный
государственный санитарный врач
Республики Беларусь

И.В. Гаевский

«16» *Сентябрь* 2015 г.

Регистрационный № 009-1015

ОБОСНОВАНИЕ ПРЕДЕЛЬНО ДОПУСТИМЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ И
МЕТОДИК ВЫПОЛНЕНИЯ ИЗМЕРЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ В ВОЗДУХЕ
РАБОЧЕЙ ЗОНЫ МИКРООРГАНИЗМОВ-ПРОДУЦЕНТОВ И
СОДЕРЖАЩИХ ИХ МИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ

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

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель
Министра здравоохранения –
Главный государственный
санитарный врач
Республики Беларусь

_____ И.В. Гаевский
16.10.2015
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 предприятие
«Научно-практический центр гигиены»

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф. В.В. Шевляков, канд. мед. наук, доц.
В.А. Филонюк, канд. биол. наук, доц. Н.В. Дудчик, канд. биол. наук Г.И. Эрм,
Т.С. Студеничник, Т.О. Козлова, канд. мед. наук Е.В. Чернышова, канд. мед.
наук Ю.А. Соболев, А.В. Буйницкая, О.Е. Нежвинская, С.А. Янецкая, канд. мед.
наук, доц. Л.М. Сычик

Минск 2015

ГЛАВА I ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

1. В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложены унифицированные методы проведения экспериментального обоснования предельно допустимых концентраций (далее — ПДКврз) и аттестации методик контроля содержания в воздухе рабочей зоны штаммов микроорганизмов-продуцентов (далее — МО) и готовых форм микробных препаратов на их основе (далее — МП), позволяющие получить сопоставимые и достоверные результаты при оптимальном объеме экспериментальных исследований с минимальными материальными затратами.

В Республике Беларусь широко распространено промышленное применение МО (дрожжеподобные и плесневые грибы, бактерии и др.) и МП на их основе в различных отраслях народного хозяйства, в связи с чем возникает проблема гигиенического регламентирования их содержания в объектах производственной среды для обеспечения безопасности для здоровья работников. В соответствии с этим методы, изложенные в настоящей инструкции, могут быть использованы в комплексе медицинских услуг, направленных на медицинскую профилактику неблагоприятного воздействия МО и МП на работников биотехнологических и иных предприятий с использованием технологий микробиологического синтеза.

Настоящая инструкция разработана с учетом принципа гигиенического нормирования — принципа «нулевого риска».

2. Методы, изложенные инструкции, предназначены для специалистов организаций здравоохранения, осуществляющих государственный санитарный надзор, иных учреждений, осуществляющих обоснование гигиенических нормативов и методов контроля в воздухе рабочей зоны производственных штаммов МО и готовых форм биопрепаратов, действующим началом которых являются живые микроорганизмы или их споры.

ГЛАВА 2 ОБЩИЕ УСЛОВИЯ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

3. Исследования по обоснованиям гигиенического регламента, нормированию и методик выполнения измерений в воздухе рабочей зоны МО и (или) МП (далее — исследования) осуществляется при условии представления следующих данных:

- для микроорганизмов:

полное наименование штамма микроорганизма, его таксономическое положение, происхождение, условия культивирования, селективная питательная среда, способ идентификации, назначение и способ применения, предполагаемый объем использования;

- для готовых форм МП:

товарное название, назначение, способы получения и применения, предполагаемый объем производства;

состав: действующее начало, наполнитель, технологические добавки, стадия развития и количество клеток МО на единицу массы готового препарата; содержание посторонней микрофлоры;

метод определения препарата в воздухе (при наличии), агрегатное состояние, для аэрозоля — дисперсный состав.

4. Исследования проводят на следующих видах лабораторных животных: белые мыши (масса тела 16–24 г), белые крысы (масса тела 160–200 г), кролики (масса тела 1500–2000 г), при этом необходимо указать вид, линию (популяцию), питомник, из которого получены животные, пол, исходную массу тела, пищевой рацион, сезон, в котором проводилась каждая серия экспериментов.

Подбор животных и формирование из них опытных и контрольных экспериментальных групп осуществляют из числа визуально здоровых половозрелых животных с ровным, гладким шерстным покровом, без видимых повреждений кожи хвоста и слизистой глаз, с учетом пола и массы тела (разница в массе животных одной и сравниваемых групп не должна превышать 10%), отсутствия различий в поведении, общем состоянии, содержании лейкоцитов в крови и состоянии нормальной микрофлоры кишечника животных.

Условия содержания лабораторных животных должны соответствовать требованиям Санитарных правил и норм 2.1.2.12-18-2006 «Устройство, оборудование и содержание экспериментально-биологических клиник (вивариев)», утвержденных постановлением Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь от 31.10.2006 № 131. Условия обращения, проведения экспериментов и выведения лабораторных животных из опыта должны соответствовать гуманистическим принципам Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в эксперименте (Хельсинки, 1986) и международной концепции трех R (reduction, refinement, replacement) в отношении использования лабораторных животных в экспериментах.

5. При исследованиях определяются следующие показатели вредного (опасного) действия МО на организм:

- патогенность;
- токсигенность и токсичность (способность продуцировать экзо- и эндотоксины);
- транзиторное бациллоносительство (диссеминация во внутренних органах);
- раздражающее действие;
- общетоксическое действие;
- специфическое влияние на иммунную систему (аллергенность, иммунотоксичность);
- специфическое влияние на нормальную микрофлору кишечника микроорганизма (дисбиотическое действие).

При нормировании штаммов МО, относящихся к уже изученному виду микроорганизмов, их исследование проводится по сокращенной схеме,

включающей изучение степени патогенности и уровня вредного воздействия на организм по показателю, являющемуся лимитирующим для соответствующего вида МО.

В схему постановки исследований по обоснованию ПДК готовых форм препаратов, содержащих живые МО, учитывая возможное наличие в них различных химических соединений в виде добавок и наполнителей, могут быть дополнительно включены иные показатели и тесты, используемые при гигиеническом нормировании вредных химических соединений.

б. При исследованиях используют следующие медицинские изделия, оборудование, материалы, реактивы и т. д.:

- автоклав электрический; весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности (по ГОСТ 24104) с пределом взвешивания 200 г; весы аналитические электронные с пределом допускаемой погрешности $\pm 0,0001$ г; стерилизатор сухожаровой с автоматической регулировкой температуры (100–220°C) (по ГОСТ 24437); термостат электрический суховоздушный с автоматическим терморегулятором до 50°C, позволяющий поддерживать заданную температуру с погрешностью $\pm 1^\circ\text{C}$ (ТУ 64-1-1382-72); анализатор потенциометрический с погрешностью измерений pH $\pm 0,1$ (pH-метр) с набором электродов (по ГОСТ 19881); фотоэлектрокалориметр концентрационный воздуха с потребительскими параметрами не хуже, чем у такого типа КФК-2, или спектрофотометр; многоканальный спектрофотометр с потребительскими параметрами не хуже, чем у такого типа «Мультискан»; микроскоп световой биологический с увеличением 900–1000 \times (по ГОСТ 8284); центрифуга лабораторная с частотой оборотов до 400g; пробоотборник воздуха с потребительскими параметрами не хуже, чем у такого типа SAS SUPER100, мешалка магнитная; холодильник бытовой (по ГОСТ 16317); морозильная камера; баня водяная с терморегулятором, позволяющая поддерживать температуру $55 \pm 0,5^\circ\text{C}$ (по ГОСТ 12026) или инактиватор; шейкер (встряхиватель) для планшет и пробирок; дозаторы пипеточные типа ПЛ или вариопипетки на 0,02–0,2; 1,0–5,0 см³; пипетки разной вместимости 2-го класса точности (по ГОСТ 20292); стаканы химические (50–100 см³), цилиндры (по ГОСТ 1770) и колбы (по ГОСТ 25336) разной вместимости (10; 100; 1000 см³); пробирки центрифужные стеклянные (мерные, 10 см³); планшеты иммунологические плоскодонные; чашки Петри 90–100 мм (по ГОСТ 25336); стекла предметные (по ГОСТ 9284); камера для подсчета клеток крови Горяева; шприцы медицинские объемом 1; 5; 10 см³; шприцы туберкулиновые; штативы для пробирок; шпатели стеклянные; стандарт титры для приготовления образцовых буферных растворов для pH-метрии (по ГОСТ 8.135 ГСИ); бумага индикаторная универсальная (ТУ 6-091181-76); бумага фильтровальная лабораторная (по ГОСТ 12026); вата медицинская гигроскопичная (по ГОСТ 5556); марля медицинская (по ГОСТ 9412); ножницы (по ГОСТ 21241); спиртовки лабораторные стеклянные (по ГОСТ 23932Е);

- вода дистиллированная и бидистиллированная (по ГОСТ 6709); ацетон (х.ч.) (по ГОСТ 2603); спирт этиловый ректификат (по ГОСТ 5962); диметилсульфоксид (х.ч.); кислота соляная, раствор с массовой концентрацией

0,1 моль/дм³ (по ГОСТ 3118); натрия гидроокись, раствор с массовой концентрацией 0,1 моль/дм³ (по ГОСТ 4238); раствор физиологический (изотонический, стерильный); среда 199 (стерильная, во флаконах по 500 см³); раствор Хенкса (стерильный, во флаконах по 500 см³); гепарин; L-цистеин; фосфатный буфер (стерильный ФБ с рН 7,2–7,4); тиогликолевый буфер (по ГОСТ 10444.1); желатин медицинский (стерильный, 10%-й раствор в ампулах по 10 см³); тетразолий нитросиний (МТТ – Thiazolyl blue); зимозан (Zymosan А); митогены фитогемагглютенин (ФГА-Р) и конканавалин А (КонА); красители трепановый синий и эозин; краска Романовского–Гимза; растворы и реактивы для окраски по Граму (по ГОСТ 10444.1); 0,3%-й спиртовой раствор красителя нейтрального красного; 3%-й раствор уксусной кислоты, подкрашенной метиленовым синим; 0,83%-й раствор хлористого аммония; сухой бычий сывороточный альбумин (БСА); эритроциты барана (консервированные, во флаконах по 10 см³); масло вазелиновое медицинское (по ГОСТ 3164); масло иммерсионное (по ГОСТ 13739); агар микробиологический в порошке или волокнах (по ГОСТ 17206); агар сухой питательный для культивирования микроорганизмов (ФС 42-188ВС-90); агар Эндо (ФС 42-186ВС-88); солевой агар, желточно-солевой агар, молочно-желточно-солевой агар, среда Байрд–Паркер, среда Вильсона–Блера, кровяной агар, агар с желчью и эскулином, среда Блаурокка, лактобактоагар, среда Сабуро с антибиотиками (по ГОСТ 10444.1); среда Рогоза-Маана и среда МРС (по ГОСТ 10444.11); среда Мак Конки (по ГОСТ 29184); конго-рот-агар; амфолан агар.

Возможно применение оборудования и материалов с аналогичными по назначению техническими и метрологическими характеристиками, а также использование других коммерческих питательных сред и диагностических препаратов аналогичного назначения для исследований, при их применении следует руководствоваться рекомендациями изготовителя.

7. Исследования проводятся в помещениях, оснащенных приточно-вытяжной вентиляцией и водопроводной водой.

Приготовление растворов, подготовка проб к исследованиям и исследования осуществляют при следующих условиях:

- температура окружающего воздуха $20 \pm 5^\circ\text{C}$;
- относительная влажность воздуха не более 80% при $T = 25^\circ\text{C}$;
- атмосферное давление 84,0–106,7 кПа (630–800 мм рт. ст.).

8. Работы с МО и готовыми формами МП, лабораторными животными и агрессивными реактивами должны производиться работниками в соответствии с требованиями охраны труда, в спецодежде (медицинский халат, шапочка) с использованием индивидуальных средств защиты кожи (латексные перчатки), органов дыхания (респиратор с потребительскими параметрами не хуже, чем у такого типа «Лепесток», или марлевая повязка) и зрения (очки).

ГЛАВА 3 СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

9. Схема проведения исследований по обоснованию гигиенических регламентов и ПДК МО и (или) МП в воздухе рабочей зоны включает 2 этапа.

9.1. Исследования I этапа по токсикологической оценке предусматривают определение в острых опытах основных признаков патогенности с целью отбора штаммов для последующей постановки исследований по нормированию или запрещению использования изучаемого микроорганизма в производстве:

- 1) определение степени патогенности по относительной величине ЛД₅₀;
- 2) определение токсигенности и токсичности микроорганизма.

Заключение: запрещение к использованию в производстве или выполнение II этапа исследований.

9.2. Исследования II этапа предусматривают оценку опасности изучаемого МО при поступлении в организм лабораторных животных путями, адекватными реальным условиям трудовой деятельности человека, с целью выбора ведущего критерия вредности и установления порога вредного действия для обоснования ПДК:

9.2.1. Выявление местного раздражающего действия на слизистую оболочку глаза.

9.2.2. Выявление сенсibiliзирующей способности.

9.2.3. Проведение субхронического эксперимента при поступлении МО через органы дыхания в последовательно снижающихся концентрациях для выявления критерия вредности и порога вредного действия по лимитирующему показателю (аллергического, иммунотоксического, дисбиотического или по диссеминации микроорганизма во внутренних органах).

Заключение: рекомендация величины ПДК_{врз}, класса опасности и учета специфического вредного действия на организм.

10. Особенности исследований по обоснованию ПДК_{врз} готовых форм препаратов, содержащих живые микроорганизмы или споры.

10.1. Исследования I этапа (аналогично пункту 9.1) проводят при отсутствии токсикологической оценки МО, являющегося основой готовой формы препарата, или при наличии в составе препарата двух и более МО, или включение дополнительных компонентов.

10.2. На II этапе в дополнение к исследованиям, проводимым для определения опасности микроорганизма (аналогично пункту 9.2), выполняют токсикологические исследования:

10.2.1. Определение местно-раздражающего действия на кожу.

10.2.2. Определение порогов субхронического вредного общетоксического действия.

Заключение: рекомендация величины ПДК_{врз}, класса опасности и учета специфического вредного действия на организм.

ГЛАВА 4 МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ I ЭТАПА

11. Определение степени патогенности по относительной величине ЛД50.

Степень патогенности МО (бактерий, грибов) определяется их вирулентностью, т. е. способностью вызывать патологический процесс в макроорганизме с летальным исходом. Для ее определения используют интегральный показатель — ЛД50, т. е. дозу, которая вызывает гибель 50% животных опытной группы.

Определение относительной величины ЛД50 проводят путем введения стандартной дозы суспензии МО или МП интраназально, внутривентриально и в желудок.

Для испытаний штаммов МО используют их смыв стерильным физиологическим раствором с плотной питательной среды и последующим подсчетом концентрации в КОЕ/см³. Для испытаний МП используют культуральную жидкость с содержанием суспензии содержащихся в них МО с установленной концентрацией в КОЕ/см³.

Образцы препаратов согласно акту отбора образцов должны содержать МО в концентрации не менее $1,0 \times 10^9$ КОЕ/см³.

Гомогенизация суспензии и асептичность являются обязательными условиями подготовки материала для экспериментального заражения. Взвешивание опытных белых крыс производят перед введением с точностью ± 5 г, белых мышей — с точностью $\pm 0,2$ г.

11.1. Патогенность при ингаляционном поступлении МО или МП в организм определяют путем однократного интраназально введения пипеточным дозатором дробно на вдохе животного (6 особей в группе) суспензии препарата в объеме по 0,1 см³ белым крысам (стандартная доза $1,0 \times 10^8$ м.кл./жив.) и по 0,02 см³ белым мышам (стандартная доза $2,0 \times 10^7$ м.кл./жив.). Животным контрольной группы (6 животных) аналогичным образом вводится стерильные питательная среда, используемая для культивирования соответствующего МО, или ее суспензия в физиологическом растворе хлорида натрия (дистиллированной воде) в том же объеме.

11.2. Патогенность при внутрижелудочном поступлении определяют на белых крысах (6 животных) путем введения зондом в желудок суспензии испытуемого препарата в фактической дозе, рассчитываемой с учетом индивидуальной массы тела животных опытной группы, исходя из стандартной дозы по 3,0 см³ в концентрации $1,0 \times 10^9$ м.кл./см³ на 180 г массы животного. Животным контрольной группы (6 животных) аналогичным образом в том же объеме вводится стерильные питательная среда, используемая для культивирования соответствующего МО, или ее суспензия (для твердых питательных сред) в физиологическом растворе хлорида натрия (дистиллированной воде).

11.3. Патогенность при внутривентриальном введении определяют на белых мышях (8 животных в опытной группе) путем однократного введения шприцом внутривентриально суспензии испытуемого препарата в фактической

дозе, рассчитываемой с учетом индивидуальной массы тела животных опытной группы, исходя из стандартной дозы $5,0 \times 10^8$ м.кл./жив. в объеме по $0,5 \text{ см}^3$ в исходной концентрации $1,0 \times 10^9$ м.кл./ см^3 на 20 г массы животного. Животным контрольной группы (8 животных в группе) аналогичным образом в том же объеме вводится стерильная питательная среда, используемая для культивирования соответствующего МО, или ее суспензия (для твердых питательных сред) в физиологическом растворе хлорида натрия.

Фактические вводимые дозы МО (по вводимому объему суспензии) рассчитывают с учетом индивидуальной массы тела опытных животных.

12. Учет и оценка результатов острых токсикологических опытов.

В течение 5 сут наблюдают за выживаемостью и клиническими проявлениями интоксикации с посуточной регистрацией летальности и клиники интоксикации животных опытной группы. При наличии летальных исходов и (или) проявлений интоксикации у животных контрольной группы соответствующий опыт повторяют.

12.1. При отсутствии в течение 5 сут наблюдения гибели животных после интраназального введения максимальной стандартной дозы испытуемого препарата его оценивают как непатогенный, а при регистрации летальности хотя бы 1 животного опытной группы — относят к высокопатогенным.

12.2. При отсутствии павших животных в опытных группах на внутрижелудочное и внутрибрюшинное введение или регистрации гибели 1 из 6 белых крыс и 1–2 из 8 белых мышей в период наблюдения рассчитывают интегральный показатель степени патогенности по относительной величине *ЛД50* по формуле:

$$ЛД50 > (Д : М) \times 1000, \quad (1),$$

где *ЛД50* — относительная величина среднесмертельной дозы испытуемого препарата в м.кл./кг; *Д* — среднеарифметическая величина фактических введенных доз препарата в количестве микробных клеток на животное, рассчитываемых с учетом стандартной дозы и индивидуальной массы каждого животного в опытной группе; *М* — средняя масса тела животных опытной группы в г; *1000* — коэффициент пересчета на кг массы тела животных.

При регистрации существенной летальности, т. е. при учете в период наблюдения гибели в опытной группе белых крыс 2 и более животных из 6, а в группе белых мышей 3 и более из 8 животных, опыты аналогично повторяют, последовательно снижая стандартную дозу суспензии препарата на порядок (в 10, 100 и более раз при необходимости). Расчет относительной величины *ЛД50* проводят по формуле (1) с учетом фактически введенных доз испытуемого препарата.

12.3. В зависимости от установленной в острых опытах при внутрижелудочном и внутрибрюшинном введениях относительной величины *ЛД50* испытанные образцы МО или МП дифференцируют по классам опасности согласно количественным критериям, приведенным в приложении 1.

При различии в относительных величинах ЛД₅₀ при внутрижелудочном и внутрибрюшинном введениях МО и МП класс опасности устанавливают по наименьшей величине более чувствительного показателя.

Справочно. Как правило, наиболее чувствительным показателем является внутрибрюшинная патогенность, поскольку при поступлении через слизистую оболочку желудочно-кишечного тракта за счет их физико-химических и иммунобиологических «барьерных» факторов вирулентность МО с более низкой инвазивной способностью может быть значительно снижена).

12.4. При установлении в острых опытах при внутрижелудочном и внутрибрюшинном введениях летальности хотя бы одного опытного животного проводят определение токсигенности и токсичности.

13. Определение токсигенности.

Степень патогенности МО определяется также их способностью синтезировать и выделять в окружающую среду токсичные для макроорганизма экзотоксины (токсигенность культуры).

Для определения токсигенности МО их культуру в исходной стандартной концентрации $1,0 \times 10^9$ м.кл./см³ выращивают в жидкой питательной среде длительное время (грибы в течение 2 недель, бактерии — 3–5 дней), готовую форму МП испытывают в нативном виде. Культуральную среду фильтруют через фильтры Зейтца; фильтрат испытывают на животных следующим образом.

Белым мышам опытной группы (не менее 6 особей) шприцом вводят по 0,5 см³ фильтрата подкожно в наружный сегмент бедра задней лапы. Животным контрольной группы (не менее 6 особей) аналогично вводят стерильную питательную среду, используемую при культивировании микроорганизмов, или ее суспензию в физиологическом растворе хлорида натрия. Наблюдают за животными в течение 5 сут.

При регистрации летальности животных опытной группы, отечно-воспалительной реакции и (или) некротического поражения в месте подкожного введения и прилегающих тканях, превышающих по выраженности таковые у животных контрольной группы, препарат оценивают как обладающий высокой токсигенностью.

При наличии летальных исходов и (или) проявлений воспаления, некроза и (или) интоксикации у животных контрольной группы соответствующий опыт повторяют.

Справочно. Как правило, наличие токсигенности (за счет экзотоксинов) характерна в основном для грамположительных патогенных бактерий).

14. Определение токсичности.

При лизисе клеток МО в окружающую среду выделяются содержащиеся внутри клетки эндотоксины (токсичность культуры).

Токсичность определяют на модели внутрибрюшинного введения белым мышам суспензии МО или МП. С этой целью используют суспензию препарата в исходной стандартной концентрации $1,0 \times 10^6$ м.кл./см³, предварительно подвергнутой термообработке путем помещения в водяную баню или инактиватор на 30 мин при 80°C. Взвесь вводят шприцом белым мышам (не

менее 6 в группе) внутрибрюшинно в фактической дозе, рассчитываемой с учетом индивидуальной массы тела опытных животных, исходя из стандартной дозы по $1,0 \text{ см}^3$ в исходной концентрации $1,0 \times 10^6$ м.кл./см³ на 20 г массы животного. Животным контрольной группы (не менее 6 животных в группе) аналогичным образом в том же объеме вводится стерильная питательная среда, используемая для культивирования соответствующего МО, или ее суспензия (для твердых питательных сред) в физиологическом растворе хлорида натрия.

При наличии летальных исходов и (или) проявлений интоксикации у животных контрольной группы соответствующий опыт повторяют.

В течение 2 сут наблюдают за выживаемостью с посуточной регистрацией летальности опытных животных. При отсутствии павших животных в опытной группе или регистрации гибели 1 из 6 белых мышей в период наблюдения рассчитывают интегральный показатель степени токсичности по относительной величине ЛД₅₀ по формуле (1).

При регистрации существенной летальности, т. е. при учете в период наблюдения гибели в опытной группе 2 и более животных из 6, относительная величина ЛД₅₀ трактуется как ниже $5,0 \times 10^7$ м.кл./кг и препарат оценивают как высоко токсичный.

15. Относительные величины интегрального показателя патогенности ЛД₅₀, класс опасности МО (МП) отражаются в технических нормативных правовых актах в форме токсикологического паспорта на изученный штамм микроорганизма-продуцента или заключения по оценке микробного препарата, утвержденных в установленном порядке уполномоченными организациями здравоохранения.

ГЛАВА 5 МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРИ ОБОСНОВАНИИ ПДК

16. Определение местного раздражающего действия на слизистую оболочку глаза.

Для опыта применяют модель с использованием не менее 3 кроликов. В конъюнктивный мешок глаза животного однократно вносят 50 мкл взвеси живой культуры МО, содержащей 10^9 м.кл./см³ или 50% суспензии готовой формы препарата. Учет и оценку ирритативного эффекта проводят в течение 2 сут в соответствии с требованиями Инструкции № 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», утвержденной постановлением Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь от 14.11.2005 № 175.

17. Определение местно-раздражающего действия микробного препарата на кожные покровы.

Через 16 ч после однократных четырехчасовых аппликаций МП на выстриженные участки кожи спины белых крыс (4×4 см), морских свинок (5×5 см) или кроликов (7×8 см) суспензии МП в концентрации

микроорганизмов-продуцентов $1,0 \times 10^9$ м.кл./см³ в дозе по 20 мкл/см² учитывают видимые признаки интоксикации и гибель животных, явления раздражения и воспаления кожных покровов на местах аппликаций — гиперемия, отек, подтверждаемый данными инструментального измерения толщины кожной складки. Учет и оценку местного раздражающего действия на кожу проводят согласно требованиям Инструкции №1.1.10-13-56-2005 «Оценка воздействия вредных химических соединений на кожные покровы и обоснование предельно допустимых уровней загрязнений кожи», утвержденной постановлением Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь от 14.11.2005 № 175.

18. Определение степени сенсibiliзирующей способности и аллергенной опасности.

Исследования проводят с живой культурой микроорганизма-продуцента, аллергены из микроорганизмов используют только при наличии коммерческих препаратов, прошедших государственный контроль, т. е. с гарантированной специфичностью и активностью. При оценке готовых форм препаратов для сенсibiliзации применяют их суспензию, при тестировании используют живую культуру микроорганизма (эффект самого микроорганизма) и суспензию препарата (эффект наполнителя или добавок) или растворы (взвеси) химических соединений, входящих в препарат. Последнее может быть исключено, если данные вещества уже нормированы, в этом случае только пересчитывают их количество в действующей концентрации препарата.

Определение степени сенсibiliзирующей активности и аллергенной опасности проводят путем воспроизведения и выявления аллергии замедленного типа (ГЗТ) при ингаляционном воздействии МО или МП в следующих стандартных условиях эксперимента.

18.1. Воспроизведение гиперчувствительности замедленного типа.

Для эксперимента взвешивают белых крыс одного пола и подбирают инбредные по массе опытную и контрольную группы по 12 животных в каждой.

Ежедневно в течение 5 дней белым крысам опытной группы вводят интраназально суспензию живых микроорганизмов-продуцентов (смыв стерильным физиологическим раствором с плотной питательной среды) или микробный препарат (культуральная жидкость с содержанием суспензии микроорганизма(ов)-продуцента) в фактической дозе, рассчитываемой с учетом индивидуальной массы тела опытных животных, исходя из стандартной дозы по 0,1 см³ в исходной концентрации $1,0 \times 10^9$ м.кл. на 180 г массы животного. Животным контрольной группы аналогичным образом в том же объеме вводится стерильная питательная среда, используемая для культивирования соответствующего МО, или ее суспензия (для твердых питательных сред) в физиологическом растворе хлорида натрия или дистиллированной воде.

18.2. Выявление гиперчувствительности замедленного типа.

Выявление сенсibiliзации по ГЗТ производят постановкой провокационной пробы — внутрикожного теста опухания лапы (ВТОЛ) путем введения в подушечку (под апоневроз) задней лапы каждого животного

опытной и контрольной групп суспензии микроорганизмов в объеме по $0,06 \text{ см}^3$ в концентрации $1,67 \times 10^7$ м.кл./ см^3 (стандартная доза $1,0 \times 10^6$ м.кл./жив., не вызывающая существенного неспецифического воспаления).

Учет ВТОЛ проводят по разнице результатов измерения толщины тестируемой лапы животных обеих групп микрометром до и через 24 ч после введения на месте провокационной пробы с точностью измерения до $0,01 \text{ мм}$. Абсолютный показатель ВТОЛ выражают в величинах 10^{-2} мм у каждого животного. Для оценки степени выраженности сенсибилизации используют интегральный показатель ВТОЛ, который определяют в баллах, согласно приведенной в таблице 1 шкале (приложение 2).

18.3. Оценка степени сенсибилизирующей активности и определение аллергенной опасности.

Степень выраженности сенсибилизирующей активности МО и МП оценивают по следующим критериям: по частоте (%) положительных внутрикожных тест-реакций в баллах у опытных животных и уровням статистической значимости различий среднегрупповых величин интегрального показателя ВТОЛ в опыте и контроле по математическому критерию t Стьюдента и по «жесткому» непараметрическому критерию «Х» Ван дер Вардена, который учитывает различие в опытной и контрольной группах по частоте проявления и величинам интегрального показателя ГЗТ в баллах у отдельных животных.

С учетом данных критериев определяют степень сенсибилизирующей способности и класс аллергенной опасности испытуемых МО или МП в соответствии со шкалой, приведенной в таблице 2.1 приложения 2.

19. Определение дозозависимого биологического действия препарата в субхроническом ингаляционном эксперименте.

19.1. Постановка эксперимента по субхроническому ингаляционному воздействию:

19.1.1. Для исследований ингаляционного воздействия на организм лабораторных животных МО или МП применяют экспериментальную модель интраназального динамического введения белым крысам в течение месяца препарата в последовательно снижающихся 3–4 концентрациях, кратных 100, начиная с максимальной стандартной концентрации ($1,0 \times 10^8$ м.кл. в объеме $0,1 \text{ см}^3/\text{жив.}$).

19.1.2. Формируют рандомизированные по полу и массе группы белых крыс (не менее 12 особей в каждой): 1 — контрольная (введение культивационной питательной среды препарата), 2 — 1-я опытная (максимальная стандартная концентрация); 3 — 2-я опытная (концентрация на уровне $1,0 \times 10^7$ м.кл./ м^3); 4 — 3-я опытная (концентрация на уровне $1,0 \times 10^5$ м.кл./ м^3) и т. д.

Ежедневно в течение 1 мес. (5 раз в неделю) опытными белыми крысами пипеточным дозатором вводят дробно на вдохе животного интраназально в объеме по $0,1 \text{ см}^3$ суспензию МП (культуральная жидкость с содержанием суспензии МО или смеси МО) в расчетной рабочей концентрации микробных клеток, рассчитываемой еженедельно, исходя из заданных концентраций

препарата в воздухе и средней массы животных в опытных группах по формуле:

$$D = C \times V, \quad (2)$$

где D — однократная доза (содержание микробных клеток в $0,1 \text{ см}^3$); C — заданные концентрации препарата (количество клеток в 1 м^3 воздуха); V — величина объема вдыхаемого воздуха ($\text{см}^3/\text{г}/\text{мин}$), определяемая как произведение коэффициента $0,000156$ (показатель легочной вентиляции для крыс — $0,65 \text{ см}^3 \times$ на время ингаляции — 240 мин и переведенный в единицы м^3 воздуха) на среднюю массу тела животных за текущую неделю.

19.1.3. По средней массе животных соответствующих опытных групп за период эксперимента рассчитывают фактическую концентрацию препарата в м.кл./ м^3 воздуха, которой подвергались животные в каждой опытной группе по формуле:

$$C = D / V, \quad (3)$$

где C — фактическая концентрация препарата (количество клеток в 1 м^3 воздуха); D — однократная доза микробных клеток в $0,1 \text{ см}^3$, V — фактическая величина объема вдыхаемого воздуха (коэффициента $0,000156 \times$ на среднюю массу тела животных).

19.2. Определение общетоксического действия.

Для выявления общетоксического действия МО при длительном ингаляционном поступлении в организм лабораторных животных используют общепринятые в практике токсикологического нормирования методы и приемы определения интегральных, биохимических и специфических морфофункциональных показателей, информативно характеризующих состояние организма в целом и его отдельных систем и органов (нервная, сердечно-сосудистая, дыхания, иммунная, кроветворная, гепатобилиарная, мочевыделительная и другие системы).

Вместе с тем для оценки токсических и специфических эффектов на ингаляционное воздействие непатогенных штаммов живых МО целесообразно определять наиболее характерные и чувствительные морфофункциональные показатели организма.

Среди интегральных наиболее информативны показатели динамики массы тела животных (по разнице средней массы белых крыс в контрольной и опытных группах до и после воздействия) и относительные коэффициенты внутренних органов (печень, сердце, легкие, почки, селезенка, надпочечники), тогда как общие показатели оценки функционального состояния ЦНС (по суммационно-пороговому показателю, поведенческим тестам) и сердечно-сосудистой системы (по частоте сердечных сокращения, ЭКГ) мало чувствительны.

В оценке состояния легочной системы животных рационально определение сурфактанта легких и функциональной способности альвеолярных

макрофагов.

Для оценки функционального состояния гепатобилиарной системы информативны нагрузочные пробы, определение активности ферментов лактатдегидрогеназы в сыворотке крови и сукцинатдегидрогеназы в гомогенате печени животных, продуктов азотистого обмена (особенно клиренс содержания мочевины и креатинина в сыворотке крови и моче).

Характерны дозозависимые закономерности изменения основных показателей системы перекисного окисления липидов и белков, антиоксидантной защиты. С этой целью рационально определение в гемолизате крови животных активности ферментов глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, глутатионпероксидазы, супероксиддисмутазы, содержание глутатион восстановленного, в сыворотке крови — флуоресценции битирозина и триптофанилов белков.

В оценке влияния на кроветворную систему определяют показатели ее «красного» роста.

19.3. Определение иммунотоксического действия.

Наиболее характерным влиянием на организм животных антигенных субстанций микроорганизмов является иммунотоксическое действие, которое может проявляться аллергизацией, иммунизацией (проявление антигенности МО) и иммуномодуляцией (стимуляция или иммунодефицит) организма, для оценки которых используют широкий комплекс доступных гематологических, иммунологических и аллергологических методов, указанных в Методических указаниях № 11-11-10 РБ 02 «Требования к постановке токсиколого-аллергологических исследований при гигиеническом нормировании белоксодержащих аэрозолей в воздухе рабочей зоны», утвержденных Главным государственным санитарным врачом Республики Беларусь от 29.11.2002.

19.3.1. Оценку специфического аллергического действия осуществляют выявлением механизмов всех четырех типов аллергических реакций, используя комплекс методов аллергодиагностики *in vivo* и *in vitro*.

Для прямого выявления формирования в организме немедленного анафилактического и клеточно-опосредованного типов аллергических реакций применяют провокационный внутрикожный тест опухания лапы (ВТОЛ) с определением активной кожной анафилаксии и гиперчувствительности замедленного типа путем измерения и оценки опухоли лапы соответственно через 1 и 24 ч после провокационной пробы (аналогично п. 18.2).

Для лабораторной аллергодиагностики используют специфические иммунологические реакции клеток крови на соответствующий микробный аллерген:

- выявление механизмов немедленной Ig E-опосредованной гиперчувствительности осуществляют реакцией прямой дегрануляции тучных клеток;

- для диагностики ГЗТ — метод оценки бласттрансформации Т-лимфоцитов при их стимуляции аллергеном и регистрации специфического возрастания активности митохондриальных ферментов в лимфоцитах в МТТ-тесте;

- механизмы цитотоксического типа аллергических реакций оценивают по реакции специфического лизиса (повреждения) лейкоцитов, гемагглютинации, дополненным определением комплементарной активности сыворотки крови, и другим подобным методикам;

- формирование механизмов иммунокомплексного типа аллергического процесса косвенно оценивают по содержанию в сыворотке крови циркулирующих иммунокомплексов.

Для лабораторного определения развития смешанных механизмов 2–4 типов аллергических процессов наиболее информативно применение реакции специфического НСТ-теста гранулоцитов крови при их стимуляции аллергеном.

19.3.2. Для оценки антигенных и иммуномодулирующих свойств МО у опытных животных определяют микрометодами качественно-количественные показатели, отражающие состояние разных звеньев системы иммунитета:

- для оценки Т-клеточного звена определяют содержание лимфоцитов и Т-лимфоцитов в крови, функциональную активность Т-лимфоцитов в реакции бласттрансформации по МТТ-тесту с применением основных Т-митогенов фитогемагглютинаина и конканавалина А;

- состояние фагоцитарно-клеточного звена оценивают по содержанию в крови клеточных элементов «белого» ростка кроветворения, определению иммунных антител в реакциях агглютинации, фагоцитарной функции нейтрофилов или функциональной способности гранулоцитов крови генерировать активные формы кислорода при неспецифической стимуляции опсонизированным зимозаном, определяемой НСТ-тестом;

- состояние гуморального звена оценивают по содержанию В-лимфоцитов, концентрации в сыворотке крови иммуноглобулинов основных классов в ИФА;

- состояние иммунологической резистентности оценивают по содержанию в сыворотке крови лизоцима, активности комплемента и его отдельных компонентов, интегральному показателю антибактериальной защиты сыворотки крови и другим показателям.

19.4. Оценка дисбиотического действия.

В качестве тест-системы при экспериментальном изучении дисбиотического действия МО и МП на их основе на аутофлору организма используют микробиоценоз толстого кишечника.

Бактериологическое исследование фекалий животных опытных и контрольных групп проводят в динамике: до затравки (фон), на 4-й неделе сразу после затравочного периода и при необходимости через 1 мес. после окончания затравки (восстановительный период).

Бактериологические исследования по определению дисбиотического действия МО и МП (микробиологические показатели, состав и способ приготовления питательных сред и реактивов, используемые разведения посевного материала, условия культивирования различных микроорганизмов, способ расчета количества колониеобразующих единиц микроорганизмов и критерии оценки) выполняют согласно требованиям Инструкции по

применению «Методы экспериментального определения дисбиотического действия микроорганизмов-продуцентов и биотехнологических препаратов на их основе» от 03.09.2014 № 008-0914.

19.5. Определение диссеминирующего действия.

Диссеминацию микроорганизма-продуцента во внутренних органах определяют путем посева крови и отпечатков легких, сердца, печени, селезенки и почек от не менее 6 опытных и 6 контрольных животных на агаризованную селективную питательную среду с последующим микроскопированием выросших характерных колоний и идентифицированием микроорганизма. Исследования проводят в конце эксперимента и при необходимости через 2 недели после его окончания.

20. Учет и оценка результатов эксперимента.

20.1. Выраженность общетоксического и иммунотоксического эффектов определяют, вычисляя достоверность различия среднегрупповых величин изученных морфофункциональных показателей опытных и контрольных животных.

20.2. При оценке показателей аллергического действия учитывают и число опытных животных с проявлением эффекта (с положительными провокационными кожными пробами, выход индивидуального показателя лабораторной аллергодиагностики за пределы $\pm 1\sigma$ от контрольного уровня).

20.3. Дисбиотическое действие оценивают как:

- умеренно выраженное — если показатели количественного состава микрофлоры кишечника животных опытной группы после воздействия в 2 и более группах микроорганизмов отличаются от контроля, но после восстановительного периода различия исчезают;

- сильное действие — если показатели количественного состава микрофлоры кишечника животных опытной группы отличаются от такового у контрольных хотя бы по одной из изученных групп микроорганизмов, но изменения не исчезают после восстановительного периода.

20.4. Диссеминирующее действие оценивают как:

- умеренно выраженное — если сразу после субхронического воздействия из крови и внутренних органов опытных животных высевались исследуемые штаммы микроорганизмов при отсутствии их в контроле;

- сильное действие — если из крови и внутренних органов опытных животных высевались исследуемые штаммы микроорганизмов даже через 2 недели после окончания субхронического эксперимента (период восстановления).

25. Определение пороговой и недействующей концентраций препарата, лимитирующих показателей ведущего механизма вредного действия.

25.1. За пороговую принимают ту минимальную концентрацию исследованного штамма МО или МП, на которую установлены:

- достоверные изменения у животных опытных групп по отношению к контролю не более 2 наиболее чувствительных показателей общетоксического или иммунотоксического действия;

- проявления аллергического эффекта у 30% и более животных опытных групп (даже при статистической тенденции различий среднегрупповых показателей в опыте и контроле);

- умеренно выраженное дисбиотическое действие;

- умеренно выраженное диссеминирующее действие.

25.2. За недействующую принимают концентрацию исследованного штамма МО или МП, при воздействии которой у опытных животных не установлены существенные сдвиги по отношению к контролю всех изученных морфофункциональных показателей организма.

25.3. Критерием (лимитирующим показателем) ведущего вредного действия на организм МО или МП являются закономерные по выраженности в зависимости от воздействующих концентраций однонаправленные сдвиги изученных показателей общетоксического, иммунотоксического, аллергического, дисбиотического или диссеминирующего действия и выявляемые еще у животных при воздействии пороговой концентрации МО или МП.

26. Обоснование ПДК МО и (или) МП в воздухе рабочей зоны.

26.1. Величину ПДК_{врз} МО или МП определяют, исходя из установленной в экспериментах на лабораторных животных величины пороговой концентрации субхронического ингаляционного действия на организм по лимитирующим показателям вредного действия или величины недействующей концентрации.

При этом для экстраполяции экспериментальных данных на организм человека вводят коэффициент запаса с учетом критерия ведущего вредного действия:

- к величине пороговой концентрации, установленной по лимитирующим показателям критерия ведущего общетоксического, аллергического, иммунотоксического, дисбиотического или диссеминирующего вредного действия, вводят снижающий коэффициент запаса, равный 10;

- уровень установленной недействующей концентрации принимают за величину ПДК_{врз} без введения коэффициента запаса.

Если установленные уровни пороговой или недействующей концентраций представляют дробную величину, то величину ПДК_{врз} с учетом коэффициента запаса рассчитывают, применяя правила округления (например, если установлена пороговая концентрация на уровне $4,5 \times 10^4$ м.кл./м³ и выше, то величина ПДК_{врз} препарата с учетом коэффициента запаса 10 и округления составит 5000 м.кл./м³).

26.2. Величину ПДК_{врз} комбинированных микробных препаратов на основе 2 и более штаммов микроорганизмов-продуцентов можно устанавливать по сумме составляющих его микроорганизмов или по характерному микроорганизму, количественно преобладающему (не менее чем на порядок) в смеси.

26.3. Обоснование класса опасности нормированных МО и МП.

МО, разрешенные уполномоченными организациями здравоохранения в качестве промышленных штаммов, относят к непатогенным или условно

патогенным — к III и IV классам опасности по ГОСТ 12.1.007-76, что соответствует 2-й группе риска по классификации Всемирной организации здравоохранения (умеренно индивидуальный риск и ограниченный риск для населения в целом). Исходя из этого МО и (или) МП, ПДКврз которых не превышает или равна 5000 м.кл./м³, относят к III классу опасности, более 5000 м.кл./м³ — к IV классу опасности.

26.4. Особые отметки к ПДКврз.

В графе «Особенности действия на организм» ПДКврз специальным символом «А» выделяют МО и (или) МП, вызывающие в экспериментах аллергические эффекты у опытных животных при ингаляционном воздействии в пороговых (лимитирующим показателем вредного действия является сенсibilизирующее действие) концентрациях, а, следовательно, обладающих потенциальным аллергическим действием на организм человека.

ГЛАВА 6

АЛГОРИТМ РАЗРАБОТКИ МЕТОДИКИ ВЫПОЛНЕНИЯ ИЗМЕРЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ-ПРОДУЦЕНТОВ И МИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ В ВОЗДУХЕ РАБОЧЕЙ ЗОНЫ, ДЛЯ КОТОРЫХ ОБОСНОВАНА ПДКврз

27. В основе разработки методики выполнения измерения (МВИ) содержания в воздухе нормированных МО или МП используют известные принципы отбора проб воздуха, загрязненного микроорганизмами, культивирования в оптимальных для конкретных штаммов МО условиях на селективной питательной среде с последующим подсчетом выросших на среде характерных (типичных) колоний, микроскопической идентификации штаммов бактерий в колониях, расчета количества МО в отобранном объеме воздуха и перерасчетом на 1 м³ воздуха.

28. Подготовка к выполнению измерений.

28.1. Приготовление агаризованной питательной среды.

Используют селективную среду, оптимальную для роста и развития конкретного штамма МО. Навески компонентов в необходимых количествах, согласно прописи, растворяют в 1 дм³ дистиллированной воды при перемешивании, после растворения добавляют агар микробиологический в указанном количестве, нагревают до 50–60 °С и растворяют при перемешивании. Устанавливают рН среды 7,0–7,2. Стерилизация автоклавированием при 121 °С в течение 20 мин.

28.2. Подготовка контактных чашек с селективной питательной средой.

Селективную среду расплавляют, остужают до 45–50 °С, тщательно перемешивают. В асептических условиях вблизи пламени спиртовки разливают по 20 см³ в контактные стерильные чашки Петри и оставляют их на горизонтальной поверхности лабораторного стола до застывания питательной среды. Чашки с застывшей средой помещают в термостат на сутки при температуре 30±2 °С, после чего проросшие чашки бракуют, стерильные используют для контроля воздуха.

28.3. Идентификация и приготовление рабочих разведений культуры.

Для приготовления рабочих разведений микробного препарата используют фосфатный буферный раствор с 0,1%-м пептоном, рН 7,0, с применением стандарта мутности на 10 ед. Подтверждение содержания клеток в рабочей культуре проводят путем ее высева на селективную агаризованную среду с оценкой после инкубации типичных для изучаемого МО культурально-морфологических и биохимических свойств и подсчетом колоний. Для оптимизации параметров отбора проб и определения рабочих характеристик детектора (контактные чашки Петри с соответствующей питательной средой) обычно используют рабочие разведения 10^3 и 10^5 КОЕ/см³ МО или МП.

29. Моделирование и оптимизация условий количественного определения концентрации микроорганизма-продуцента.

29.1. С целью определения оптимальных параметров количественного определения концентрации нормированного МО или МП проводят модельный эксперимент. Создание мелкодисперсного жидкого микробного аэрозоля проводят путем поэтапного последовательного распыления с помощью небулайзера (ингалятора, пульверизатора) рабочего разведения препарата в камеру (закрытая с отводами емкость, объемом не менее 30 дм³, например, затравочная или ингаляционная камера, эксикатор) таким образом, чтобы рабочие концентрации МО в камере находились в диапазоне от единичных клеток до 10^4 .

29.2. Условия отбора проб воздуха.

На каждом этапе модельного эксперименты проводят отбор проб воздуха в диапазоне объемов 10–30 дм³ при помощи аспиратора-пробоотборника на поверхность плотной питательной селективной среды.

Перед каждым отбором воздуха аспиратор протирают спиртом, устанавливают подготовленную чашку Петри со средой, прибор закрывают, не допуская соприкосновения снимаемой с чашки крышки прибора со средой. Отбор проб проводят в двух повторностях.

После отбора пробы воздуха аспиратор открывают, быстро снимают чашку Петри и закрывают крышкой от данной чашки. На дне чашки Петри маркером отмечают необходимые данные: точку контроля, дату отбора пробы и ее объем. Каждая проба воздуха рабочей зоны отбирается в двух повторностях.

Чашки Петри с селективной средой после отбора проб воздуха могут храниться в холодильнике при температуре $4 \pm 2^\circ\text{C}$ не более 2 ч.

29.3. Учет результатов измерений концентраций МО.

После отбора проб воздуха из камеры чашки Петри с селективной средой помещают в термостат и инкубируют в требуемых для конкретного МО температурно-временных условиях, после чего оценивают культурально-морфологические особенности выросших колоний и подсчитывают типичные колонии.

Подсчет колоний осуществляют на двух параллельных чашках Петри, содержащих не более 250 колоний. При получении результата подсчета более 250 колоний хотя бы на одной чашке Петри повторяют измерения в соответствии с п. 29.2, соответственно уменьшая объем отобранной пробы

воздуха. Подсчитывают все видимые типичные колонии. При необходимости можно использовать лупу с 2-кратным увеличением.

Расчет концентрации клеток (и спор) микроорганизма(ов)-продуцента(ов) производят по формуле:

$$\bar{X} = N \times 1000 / V, \quad (4)$$

где X — концентрация микробных клеток и спор в отобранной пробе воздуха в КОЕ/м³; N — количество колоний, выросших на чашке; 1000 — коэффициент пересчета на 1 м³ воздуха; V — объем отобранной пробы воздуха, дм³.

За окончательный результат измерения концентрации (X) микробных клеток и спор в пробе воздухе принимают среднее арифметическое значение двух результатов параллельных измерений, рассчитанных по формуле (4),

$$\bar{X} = X1 + X2 / 2, \quad (5)$$

где $X1$ — результат первого параллельного измерения; $X2$ — результат второго параллельного измерения.

Результат измерений округляют до двух значащих цифр. Для этого, если третья цифра меньше 5, предшествующую цифру не изменяют; если третья цифра больше или равна 5, предшествующую цифру увеличивают на единицу. Результат измерения выражают числом между 1,0 и 9,9, умноженным на 10 в соответствующей степени.

Если одна из величин $X1$ или $X2$ оказывается меньше предела измерения методики, то вычисления по формуле (5) не производят, а дают одностороннюю оценку концентрации клеток и спор МО в пробе воздуха в виде $X < 10$ КОЕ/м³.

29.4. Обработка результатов модельного эксперимента.

Определяют характер и количественную закономерность динамики возрастания концентрации МО в фиксированном объеме камеры при распылении каждого рабочего разведения препарата на последовательных этапах модельного эксперимента и при отборе проб воздуха определенного объема (чаще всего 10, 20, 30 дм³, приложение 3), рассчитывая коэффициенты корреляции и уравнения регрессии с определением коэффициента аппроксимации.

30. Разработка метода определения содержания микробного препарата в воздухе рабочей зоны.

На основании результатов модельного эксперимента разрабатывают метод определения содержания микробного препарата в воздухе рабочей зоны, включающего разделы: область применения, сущность метода, нормативные ссылки, средства измерений, испытательное и вспомогательное оборудование, реактивы и материалы, требования безопасности и требования к квалификации оператора, условия выполнения измерений, подготовка к выполнению

измерений, проведение измерений, обработка результатов измерений, оформление результатов испытаний.

31. Метрологическая аттестация метода определения содержания микробного препарата в воздухе рабочей зоны

31.1. Метрологическую аттестацию разработанного метода выполняют в соответствии с требованиями ТНПА (ISO/TS 19036:2009. Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Руководство по оценке неопределенности измерения для количественных определений; СТБ ИСО 5725-2. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений; СТБ ИСО 5725-3. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 3. Промежуточные показатели прецизионности стандартного метода измерений; СТБ ИСО 5725-6-2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике; СТБ ISO 7218-2010. Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных Общие требования к выполнению микробиологических исследований).

31.2. Оценивают следующие характеристики разработанного метода:

- показатели прецизионности (Sr , $Sl(O, r, rl(O)$);
- неопределенность подсчета;
- пропорциональность (линейность);
- чувствительность;
- селективность;
- частоту ложноположительных и ложноотрицательных значений;
- эффективность.

31.3. Результаты операционных характеристик метода отражают в отчете о метрологической аттестации метода и разрабатывают методику выполнения измерения концентрации в воздухе рабочей зоны МО или МП, для его утверждения в установленном порядке.

Приложение 1
к Инструкции по применению
«Обоснование предельно допустимых
концентраций и методик выполнения
измерения содержания в воздухе
рабочей зоны микроорганизмов-
продуцентов и содержащих их
микробных препаратов»

ОБЯЗАТЕЛЬНОЕ

Классификация опасности микроорганизмов-продуцентов и
микробных препаратов по степени патогенности в острых опытах

Интегральный показатель степени патогенности	Класс опасности (по степени патогенности)			
	I	II	III	IV
Среднесмертельная доза при внутрижелудочном введении белым крысам (относительная величина ЛД ₅₀), м.кл./кг	$5,5 \times 10^7$ и менее		$5,6 \times 10^7 -$ $5,0 \times 10^9$	$5,1 \times 10^9$ и более
Среднесмертельная доза при внутрибрюшинном введении белым мышам (относительная величина ЛД ₅₀), м.кл./кг	$5,0 \times 10^6$ и менее		$5,1 \times 10^6 -$ $5,0 \times 10^9$	$5,1 \times 10^9$ и более

Примечание — I класс — чрезвычайно опасные (1 и 2-я группы патогенных микроорганизмов); II класс — высокоопасные (3 и 4-я группы микроорганизмов-возбудителей инфекционных заболеваний); III класс — умеренно опасные микроорганизмы; IV класс — малоопасные микроорганизмы.

Приложение 2
к Инструкции по применению
«Обоснование предельно допустимых
концентраций и методик выполнения
измерения содержания в воздухе
рабочей зоны микроорганизмов-
продуцентов и содержащих их
микробных препаратов»

ОБЯЗАТЕЛЬНОЕ

Таблица 2.1 — Шкала перевода абсолютных величин ВТОЛ в интегральный показатель

Абсолютная величина ВТОЛ в 10^{-2} мм	Интегральный показатель ВТОЛ, баллы
до 10,0	0
11,0–20,0	1
21,0–30,0	2
31,0–40,0	3
41,0–50,0	4
Более 50,0	5

Таблица 2.2 — Классификация микроорганизмов-продуцентов и микробных препаратов по сенсibiliзирующей активности и аллергенной опасности

Критерии	Классы сенсibiliзирующей активности (сила аллергена/степень опасности)			
	1 сильные (чрезвычайно опасные)	2 выраженные (опасные)	3 умеренные (умеренно опасные)	4 слабые (малоопасные)
H1)	75 и более	более 50	50 и более	25 и более
Pt	<0,01–0,001	<0,05–0,01	<0,05	>0,05
Px	<0,01	<0,05	>0,05	>0,05

Примечание — H1) — выявляемость сенсibiliзации по частоте положительного теста ВТОЛ в баллах у животных опытной группы, %; Pt — уровень значимости достоверных различий среднегрупповых величин интегрального показателя ВТОЛ в опытной и контрольной группах по критерию t Стьюдента; Px — то же по критерию «X».

Приложение 3
к Инструкции по применению
«Обоснование предельно допустимых
концентраций и методик выполнения
измерения содержания в воздухе
рабочей зоны микроорганизмов-
продуцентов и содержащих их
микробных препаратов»

СПРАВОЧНОЕ

Пример проведения и обработки результатов модельного эксперимента
для разработки методики выполнения измерения концентрации МО
в воздухе рабочей зоны

Экспериментальными исследованиями обоснован гигиенический норматив содержания в воздухе рабочей зоны (ПДК) микробного препарата «Бетапротектин» (далее — МПБ) на уровне 1000 м.кл. штамма бактерий *Bacillus subtilis* М-22 (далее — *B.s.*) в м³, III класс опасности с отметкой «аллерген», который утвержден постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 20.09.2012 № 140.

Для обоснования методики выполнения измерения содержания в воздухе рабочей зоны МПБ по микроорганизму-продуценту *B.s.* проведен модельный эксперимент путем создания мелкодисперсного жидкого аэрозоля поэтапным последовательным впрыскиванием (в течение 10 мин) рабочего разведения МПБ (10^5 КОЕ/см³) в затравочную камеру объемом 250 дм³. На каждом этапе создания аэрозоля в затравочной камере проводили отбор проб воздуха в двух повторностях в диапазоне объемов 10–20–30 дм³ на поверхность селективной плотной питательной агаризованной среды. После отбора проб воздуха чашки Петри с селективной средой помещали в термостат при $t = 30 \pm 0,5^\circ\text{C}$. После инкубирования в течение 48 ± 2 ч подсчитывали типичные колонии и оценивали культурально-морфологические особенности и биохимические свойства *B.s.*

Определена динамика роста МО *B.s.* на последовательных этапах модельного эксперимента в фиксированном объеме затравочной камеры в зависимости от объема отобранных проб воздуха (таблица 3.1). Установлены следующие закономерные зависимости (рисунки 3.1 и 3.2):

- при отборе проб воздуха объемом 10 дм³ зависимость носила экспоненциальный характер и выражалась формулой:

$$y = 8,18e0,7048x \quad (3.1)$$

с коэффициентом аппроксимации $R^2 = 0,9844$.

Таблица 3.1 — Параметры измерений концентрации МПБ в модельном эксперименте

Этап	Объем пробы воздуха, дм ³						Примечание
	10		20		30		
	КОЕ*						
	чашка	м ³	чашка	м ³	чашка	м ³	
1	1	100	3	150	15	159	Колонии типичной формы
2	12	1200	27	1350	40	1332	Колонии типичной формы
3	20	2000	53	2650	69	2298	Колонии типичной формы
4	47	4700	90	4500	115	3829	Незначительная интерференция колоний типичной формы
5	70	7000	142	7100	300	9990	Значительная интерференция колоний типичной формы
6	100	10000	153	9800	Более 300	—	Значительная интерференция колоний типичной формы

Примечание — *Представлены средние арифметические двух параллельных измерений.

- при отборе проб воздуха объемом 20 дм³ зависимость была линейной и выражалась формулой:

$$y = 33,9x - 38,5 \quad (3.2)$$

с коэффициентом аппроксимации $R^2 = 0,9701$;

- при отборе проб воздуха объемом 30 дм³ зависимость также была линейной и выражалась формулой:

$$y = 17,3x - 21,9 \quad (3.3)$$

с коэффициентом аппроксимации $R^2 = 0,9489$.

На следующем этапе выполняли оценку категориальных характеристик, связанных со специфичностью и селективностью разрабатываемого метода.

Показатели специфичности и селективности определялись в соответствии с ISO/TR 13843-2000 «Качество воды. Руководство по валидации

микробиологических методов», раздел 9.2 «Категорийные характеристики, связанные со специфичностью и селективностью».

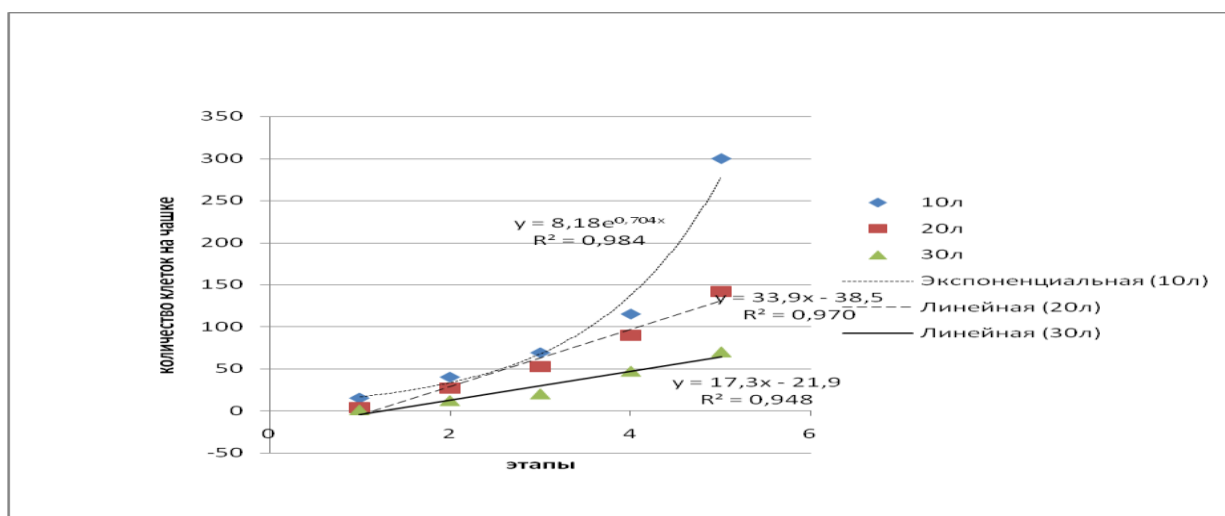


Рисунок 3.1 — Динамика роста микроорганизма-продуцента *V.s.* на последовательных этапах модельного эксперимента (КОЕ/чашку)

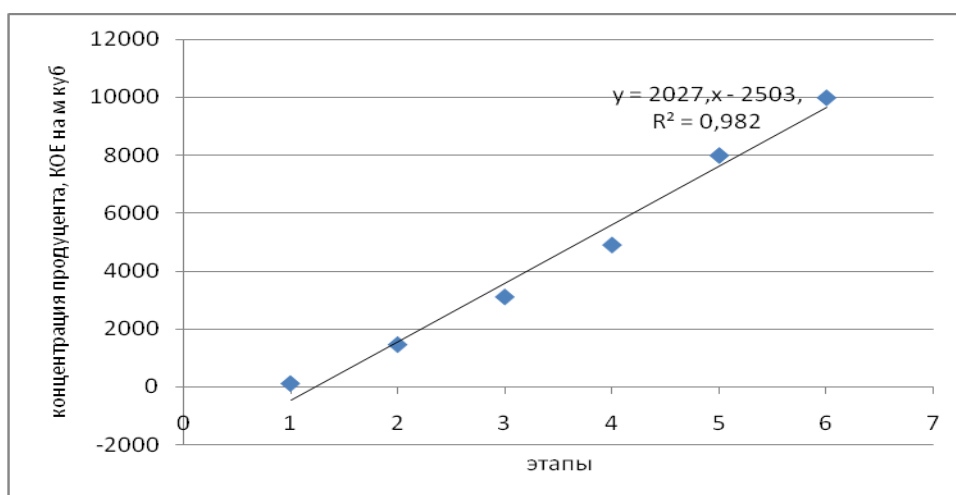


Рисунок 3.2 — Динамика концентрации микроорганизма-продуцента *V.s.* (средние значения) на последовательных этапах модельного эксперимента

Категорийные характеристики, связанные со специфичностью и селективностью методики, оценивали при подсчете колоний, типичных по морфокультуральным признакам. Эту категорию оценивали как предположительно положительные на основании первого впечатления ПП — а, также как предварительно отрицательные (ПО) — в.

Затем проводилось изучение с использованием микроскопирования и определения тинкториальных свойств с окраской по Граму. Эту категорию оценивали как истинно положительные (с) и истинно отрицательные результаты (d).

Затем определяли чувствительность, специфичность, частоту ложноположительных и ложноотрицательных результатов.

Результаты категорийных характеристик (таблица 3.2) отражались в отчете о метрологической аттестации разработанного метода, на основании

чего разрабатывалась методика выполнения измерения концентрации штамма бактерий *Bacillus subtilis* M-22 — продуцента микробного препарата «Бетапротектин» в воздухе рабочей зоны, представляемых на экспертизу и согласование в Белорусский государственный институт метрологии.

Таблица 3.2 — Сопоставление исходных данных для оценки категориальных характеристик, связанных со специфичностью и селективностью метода определения содержания в воздухе МПБ

Этапы	Положительные	Отрицательные	a+b	c+d	a+c	b+d	n
I этап	21(a)	1(в)	22	22	41	3	44
II этап	20 (с)	2 (d)	–	–	–	–	
Чувствительность	0,95						
Специфичность	0,09						
Частота ложноположительных результатов	0,49						
Частота ложноотрицательных результатов	0,33						
Селективность	-0,093						
Эффективность	0,52						
Верхний предел линейности	Не более 300 колоний на чашку						

Экспериментальные исследования позволили установить необходимые требования по отбору проб воздуха на микробную обсемененность, определить прямые концентрационные зависимости, высокую чувствительность и валидность определения концентрации МПБ по количеству штамма бактерий *Bacillus subtilis* M-22 в воздухе.

Нижний предел измерения составляет 10 КОЕ/м³, верхний уровень измерения концентрации не ограничен и регулируется объемом отобранной пробы воздуха и верхним пределом линейности для разработанного метода, который составляет не более 300 колоний на чашку. Высокий коэффициент аппроксимации ($R^2 = 0,982$) свидетельствует о высокой достоверности полученных результатов количественного определения концентрации МПБ в воздухе рабочей зоны и достаточной чувствительности метода выполнения измерений.