

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ  
Заместитель министра –  
Главный государственный  
санитарный врач  
Республики Беларусь

\_\_\_\_\_ И.В. Гаевский  
12.12.2012  
Регистрационный № 011-1112

**КРИТЕРИИ РЕГЛАМЕНТАЦИИ  
И КОМПЛЕКСНОЙ ГИГИЕНИЧЕСКОЙ ОЦЕНКИ  
СМАЗОЧНО-ОХЛАЖДАЮЩИХ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ СОСТАВОВ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУ «Республиканский научно-практический центр гигиены»

АВТОРЫ: д-р мед. наук, доц. Л.В. Половинкин, В.В. Трейлиб, канд. мед. наук Ю.А. Соболев, канд. биол. наук Н.В. Дудчик

Минск 2012

## ГЛАВА 1 НАЗНАЧЕНИЕ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

1. Настоящая инструкция по применению «Критерии регламентации и комплексной гигиенической оценки смазочно-охлаждающих технологических составов» (далее — инструкция) предназначена для специалистов аккредитованных лабораторий учреждений, осуществляющих государственный санитарно-эпидемиологический надзор за безопасностью и безвредностью для человека смазочно-охлаждающих технологических составов (далее — СОТС).

2. Инструкция распространяется на следующие СОТС: смазочно-охлаждающие жидкости на минеральной, полусинтетической и синтетических основах, эмульсолы, технологические смазки (за исключением смазок, применяемых в пищевой промышленности).

3. Критерии регламентации СОТС согласно Приложению и методы комплексной гигиенической оценки СОТС, изложенные в настоящей Инструкции, обеспечат учреждения, осуществляющие государственный санитарно-эпидемиологический надзор за безопасностью и безвредностью для человека СОТС, исходными данными при работе с нормативно-технической документацией, проектировании производств, разработке оздоровительных и профилактических мероприятий, а также выдаче мотивированного гигиенического заключения для осуществления предупредительного и текущего государственного санитарного надзора, включая государственную регистрацию СОТС.

## ГЛАВА 2 ОБЩИЕ ТРЕБОВАНИЯ К ОРГАНИЗАЦИИ И ПРОВЕДЕНИЮ ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ СОТС

1. Исследования предусматривают оценку токсичности и опасности СОТС при воздействии на организм лабораторных животных путями, адекватными реальным условиям трудовой деятельности, с целью научного обоснования мер по обеспечению безопасности и безвредности для человека.

2. Для оценки безопасности СОТС и разработки гигиенических рекомендаций по их применению необходимы информация о физико-химической характеристике СОТС, проекты технических условий и рецептов или другие нормативно-технические документы (паспорт безопасности, сертификат качества и пр.), которые представляются разработчиками соответствующих документов и(или) проектов документов.

3. Отбор образцов СОТС для исследований производится в установленном порядке согласно действующей ТНПА (ГОСТ, ТУ, СТБ и другим) организациями, уполномоченными на данный вид деятельности. При представлении на исследование новых рецептов СОТС (опытные партии), их отбор осуществляется организациями-разработчиками, которые несут ответственность за достоверность представляемой

информации.

Не допускается специальная очистка, стерилизация и консервирование проб, предназначенных для исследования на биостойкость.

4. Объем токсикологических исследований СОТС включает:

- литературно-информационный поиск сведений, отражающих биологические свойства и токсиколого-гигиеническую характеристику веществ, входящих в рецептуру СОТС. При этом акцентируется внимание на общетоксические аспекты действия веществ при различных путях поступления, их гигиенические стандарты содержания в различных средах, возможность индукции отдаленных последствий действия — канцеро-, мутагенеза, сенсибилизации, эмбрио- и гонадотоксичности, тератогенеза и т. д. Литературно-информационный поиск проводят, как правило, до начала экспериментальных работ с ретроспективным анализом как периодической научной литературы, соответствующих справочников и обзоров, так и данных международных и национальных регистров потенциально токсичных химических веществ, паспортов безопасности и т. д.;

- установление параметров острой токсичности и потенциальной опасности острого отравления при внутрижелудочном и ингаляционном (статическая затравка) воздействии на животных (преимущественно белые мыши и крысы);

- определение способности оказывать местное раздражающее действие на слизистые оболочки глаз при однократном воздействии;

- оценку местно-раздражающих и кожно-резорбтивных свойств при однократном и повторном воздействии;

- выявление возможных кумулятивных свойств и получение сведений о преимущественно поражаемых органах и системах организма подопытных животных;

- изучение сенсибилизирующей способности при однократном внутрикожном введении.

5. При отборе животных для эксперимента должен соблюдаться метод случайной выборки. Подопытные животные должны быть одной линии, вида, возраста, пола, весовых характеристик (масса белых мышей — 16–30 г; белых крыс — 180–350 г; морских свинок — 200–400 г; кроликов — 2–3 кг). Максимальная разница в весе тела животных не должна составлять более 10%.

6. В ходе исследований необходимо тщательно следить за проявлением у животных симптомов интоксикации. Выбор животных для токсикологических экспериментов предполагает максимальное сходство моделируемого на них процесса с наблюдаемым у человека. Чтобы с большей степенью достоверности экстраполировать на человека данные, получаемые в эксперименте на животных, исследования желательно проводить на нескольких видах животных (обязательным видом являются белые крысы), в статистически достаточных группах (но не менее 8–10 особей для мелких лабораторных животных и не менее 3–6 — для крупных: кролики, морские свинки). Срок наблюдения за животными после острого воздействия — 14 дней.

7. Животные должны быть здоровыми, что подтверждается предварительными наблюдениями за ними в условиях карантина (14 дней). Перед экспериментом

необходимо снять фоновые характеристики по основным показателям (масса тела, состояние нервной системы, общий анализ крови) и отбраковать нестандартных животных. Рацион животных должен содержать все необходимые компоненты для их нормальной жизнедеятельности. Животные при их содержании в виварии должны иметь свободный доступ к воде и пище.

8. Для оценки характера интоксикации СОТС следует использовать комплекс физиологических, биохимических и морфологических показателей, исходя из направленности действия компонентов рецептуры. Рекомендуется применение интегральных тестов, отражающих общее состояние организма (динамику массы и температуры тела, потребления пищи и воды, работоспособности, потребления кислорода, поведенческих реакций, иммунобиологической реактивности и др.). Если механизм действия компонентов известен заранее, целесообразно контролировать и специфические показатели на уровне систем, тканей и субклеточных структур.

9. При оценке токсичности и опасности СОТС в качестве обязательных показателей необходимо определять динамику:

- изменений массы тела;
- функционального состояния нервной, сердечно-сосудистой, дыхательной, иммунной систем;
- состава периферической крови;
- функций печени и почек;
- коэффициентов массы внутренних органов.

10. Преобладающая часть СОТС представляет собой композиционные составы, поэтому их комбинированное действие оценивают по ведущему компоненту.

11. Результаты токсикологических экспериментов подвергаются статистической обработке общепринятыми методами (t-критерий Стьюдента, непараметрические критерии). Оценка результатов основывается, в первую очередь, на данных, полученных на группе наиболее чувствительных животных. Для признания неблагоприятными выявленных изменений, принимается их выход за пределы 1,5–2,0 физиологических колебаний с учетом характера показателя.

12. Содержание животных должно соответствовать требованиям Санитарных правил и норм 2.1.2.12-18-2006 «Устройство, оборудование и содержание экспериментально-биологических клиник (вивариев)», утвержденных постановлением № 131 Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь от 31.10.2006.

### ГЛАВА 3 МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ТОКСИЧНОСТИ И ОПАСНОСТИ СОТС

1. Острая пероральная токсичность ( $LD_{50}$ , мг/кг) СОТС и его рабочего раствора (при наличии смертельных эффектов при воздействии СОТС в нативном виде) определяется на белых крысах или белых мышах. Острые опыты рекомендуется начинать с предварительных экспериментов, задачей которых является

ориентировочное определение уровней смертельных доз. С этой целью на 2–3 белых мышах или белых крысах испытываются дозы, отличающиеся на порядок (например: 10; 100; 1000 мг/кг и т. д.). Наименьшая доза, после введения которой животное погибло, может рассматриваться как ориентировочная среднесмертельная. После нахождения ориентировочной среднесмертельной дозы ставится развернутый опыт на белых крысах и белых мышах. Учитывая возможную индивидуальную чувствительность животных к действию токсического вещества, нужно подобрать шкалу испытываемых доз с таким расчетом, чтобы предварительно найденная ориентировочная среднесмертельная доза занимала в ней по возможности среднее положение. Каждая выбранная доза испытывается на 6–10 животных. Число животных в группе, а также интервал между дозами в значительной степени зависит от используемого в дальнейшем метода статистического расчета.

СОТС вводятся в желудок натошак в нативном виде, а также в виде водных растворов или масляных эмульсий, или крахмальных суспензий (рабочие растворы, применяемые в реальных условиях). При этом различные дозы СОТС следует вводить животным в растворах одинаковой концентрации и оптимальных объемах, составляющих 1–1,5% от массы тела, т. е. 0,2–0,3 мл для белых мышей (допустимый — 1,0 мл); 2,0–3,0 мл для белых крыс (допустимый — 5,0 мл). Кормление животных производится не ранее чем через 3 ч после введения СОТС. В опытах следует избегать введения СОТС или их растворов, обладающих выраженными раздражающими свойствами. Это может привести к ошибкам в трактовке результатов. Такого рода СОТС целесообразно вводить в виде масляных растворов или на 1,0–2,0% крахмальном клейстере.

При отсутствии летальных исходов от воздействия максимально возможных объемов СОТС применяют методический прием – «тест накопления». СОТС вводится в максимально возможной концентрации в объеме, составляющем до 5% массы тела (масляных растворов — до 2%), с интервалом между введениями 1,5–2,0 ч в течение 6–12 ч. При таком дробном введении можно в течение одного дня ввести СОТС в количестве нескольких десятков грамм на килограмм массы животного.

ЛД<sub>50</sub> СОТС при нанесении на неповрежденные кожные покровы определяется на белых крысах или белых мышах путем однократного нанесения на кожу спины после предварительного (за 1 сут до опыта) удаления волосяного покрова (без использования депиляторных средств). СОТС наносят в нативном виде или в разведении в 4–5 дозах. Площадь кожи на спине белых крыс 4×4 см, а белых мышей — 2×2 см. Экспозиция — 4 ч. У животных регистрируют клинические проявления интоксикации и сроки гибели, при вскрытии описывают макроморфологические изменения во внутренних органах.

Срок наблюдения за животными в остром опыте должен составлять не менее 14 сут. При наблюдении за подопытными животными необходимо регистрировать их поведение, состояние, внешний вид, наличие аппетита, уровень водопотребления, степень проявления реакции на внешние раздражители. Регистрируются наличие рвоты, слюнотечения, видимые кровоизлияния, частота дыхания, мышечные подергивания, тремор, судороги, парезы, параличи, температура тела, окраска ушей,

конечностей, глаз, развитие наркотического или коматозного состояния и других симптомов интоксикации. Особое внимание обращают на сроки гибели животных. Погибших и выживших животных следует подвергать макроскопическому и/или патоморфологическому исследованию. При этом для вскрытия отбираются только те особи, гибель которых наступила не позже чем за 3–5 ч до патоморфологического исследования.

2. При обработке результатов острого опыта предпочтение нужно отдавать менее трудоемким методам, в первую очередь методу Беренса и Беренса–Шлоссера, для расчета  $LD_{50}$  можно использовать метод пробит-анализа Литчфильда и Уилкоксона (Беленький М.Л., 1963), метод Б.В. Прозоровского (1978).

3. Класс опасности СОТС по результатам острого внутрижелудочного и кожного воздействия определяется по классификации ГОСТ 12.1.007-76 «ССБТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности».

4. Изучение потенциальной опасности острого ингаляционного отравления СОТС в насыщающих концентрациях их паров осуществляют в герметичных емкостях (эксикаторы, камеры), где создаются условия свободного испарения средства в течение суток. Исследования проводятся на белых мышах или белых крысах из расчета потребляемого объема воздуха на одно животное в 1 ч (2 л — на белую мышь и 5–7 л — на белую крысу). Экспозиция — 2 и 4 ч соответственно.

В ходе эксперимента регистрируют клиническую картину отравления и гибель животных при наблюдении в течение 14 дней. После окончания воздействия животных целесообразно обследовать по показателям общетоксических или специфических изменений. Опасность ингаляционного отравления СОТС характеризуется степенью проявления интоксикации и оценивается по соответствующей классификации химических веществ по степени летучести ( $C_{20}$ ) (таблица 1).

Таблица 1 — Классификация химических веществ по степени летучести ( $C_{20}$ )

Класс опасности вещества	Степень опасности и выраженность действия
1 — Чрезвычайно опасное	Насыщающая концентрация вызывает гибель
2 — Высокоопасное	Насыщающая концентрация вызывает отчетливые проявления интоксикации, гибель отсутствует
3 — Умеренно опасное	Насыщающая концентрация вызывает минимальные изменения интегральных показателей при обследовании животных (пороговый уровень)
4 — Малоопасное	Насыщающая концентрация не оказывает токсического действия

5. Определение местно-раздражающего действия СОТС на кожные покровы проводят на белых крысах в нативном виде, а при наличии эффекта и в виде рабочей концентрации. Доза составляет  $20 \text{ мг/см}^2$ . Время экспозиции — 4 ч. После опыта СОТС

смывают водой. Состояние кожи регистрируется визуально ежедневно в течение 14 дней. Отмечают функционально-морфологические нарушения кожи (эритема, отек, трещины, некроз, шелушение, сухость, изъязвления). Объективным методом оценки отека кожи служит измерение толщины кожной складки (мм) при помощи инженерного микрометра.

6. Местно-раздражающее действие СОТС на слизистые глаз проводят на кроликах при однократном воздействии. Один глаз служит для нанесения СОТС, другой — в качестве контроля. СОТС вносят в конъюнктивальный мешок в количестве 50 мкл (1–2 капли) в нативном виде, а при наличии эффекта и в виде рабочей концентрации. Отмечают выраженность гиперемии и отека конъюнктивы, инъекцию сосудов склеры, состояние роговицы и радужной оболочки, количество и качество выделений из глаза.

7. Оценку результатов местно-раздражающего действия СОТС на кожные покровы и слизистые оболочки глаз проводят в баллах согласно инструкции по применению «Методы определения и оценки токсикологических и клинико-лабораторных испытаний показателей безопасности и безвредности для человека товаров народного потребления», утвержденной Главным государственным санитарным врачом Республики Беларусь (№ 004-0612 от 18.07.2012).

8. Изучение местно-раздражающих и кожно-резорбтивных свойств СОТС проводят путем их повторных аппликаций на хвосты белых крыс. Количество животных в группе не менее 6–10 особей.

Животные помещаются в специальные домики (изолированно друг от друга) с отверстиями для хвоста. Хвост погружается в нативное вещество или его раствор в индифферентных растворителях, который не оказывает раздражающего действия в однократных опытах при аппликациях на кожные покровы, на 2/3 длины в пробирку. Необходимо при этом создавать герметичность для исключения возможности ингаляционного воздействия вещества (испарение из пробирки) на подопытных животных. По окончании аппликаций остатки СОТС необходимо удалить теплой водой с мылом или растворителем, избегая грубых приемов и манипуляций, способных вызывать повреждение кожи. Ватным тампоном, смоченным в жидкости, проводится смыв с участка кожи, на котором проводили аппликацию вещества. Манипуляцию повторяют не менее 2 раз; последним — сухим — промокают участок кожи. Хвосты контрольных животных погружают в пробирки с дистиллированной водой или соответствующий растворитель.

Функциональные нарушения кожи характеризуются появлением различной степени выраженности эритемы, отека, трещин, изъязвлений, изменением ее температуры и уменьшением нейтрализующей способности. Оценка в баллах функционального состояния кожи по выраженности эритемы и величине отека и классификация степени раздражающих свойств СОТС представлена выше.

Резорбтивный эффект СОТС проводится после 20-кратных повторных аппликаций (по 5 раз в неделю). Ежедневная экспозиция составляет 4 ч. При этом регистрируют смертельные эффекты, клинические симптомы интоксикации и признаки

раздражения кожи хвостов, проводится оценка (физиологическая, общеклиническая, биохимическая, патоморфологическая и пр.) общего состояния животных.

9. Кумулятивные свойства СОТС изучают методом Ю.С. Кагана и В.В. Станкевича, с помощью которого возможно рассчитать коэффициент кумуляции (по смертельным эффектам) и в динамике проследить изменения, возникающие в органах и системах в ответ на действие интоксиканта. Опыты проводят на белых крысах, которым внутрижелудочно вводят испытуемый СОТС в дозе 0,1 ЛД<sub>50</sub> в течение 1,0–1,5 мес. (по 5 раз в неделю), контрольные животные получают в эквивалентных количествах растворитель. В случае если ЛД<sub>50</sub> не установлена, то в подостром эксперименте следует использовать дозу, кратную 0,1 от максимально введенной в остром опыте.

В ходе эксперимента регистрируют гибель животных, сроки ее наступления, клинические симптомы интоксикации и по летальным эффектам рассчитывают среднесмертельную дозу СОТС при субхроническом воздействии и коэффициент кумуляции по общепринятому методу.

По степени выраженности кумулятивного эффекта — величине коэффициента кумуляции ( $K_{\text{кум.}}$ ) — СОТС классифицируются на четыре группы:

- сверхкумулятивные —  $K_k < 1,0$ ;
- с выраженной кумулятивной активностью —  $1,1 < K_k < 3,0$ ;
- со средней кумулятивной активностью —  $3,1 < K_k < 5,0$ ;
- со слабой кумулятивной активностью —  $K_k > 5,1$ .

Наряду с выявлением кумулятивности СОТС путем использования большого количества и разнообразия изучаемых тестов удается в значительной мере выяснить особенности токсикодинамики СОТС. Выбор тестов в подостром эксперименте производят на основании данных литературы о токсикодинамике компонентов рецептуры СОТС с ориентацией на результаты острого опыта (картина интоксикации, патоморфологические исследования и т. д.).

Анализ кумулятивных свойств СОТС может осуществляться методом «субхронической токсичности» (Lim P. et.al., 1961), который применяют на белых крысах или мышах (по 10–15 особей в группе). Суть метода «субхронической токсичности» заключается в моделировании режима постоянного увеличения в 1,5 раза через каждые 4 дня дозы вводимого в желудок СОТС в течение 24–28 сут. В течение первых 4-х сут эксперимента животным вводят по 0,1 ЛД<sub>50</sub>, в течение 5–8 сут ежедневно — по 0,15 ЛД<sub>50</sub>, на 9–12-е сут — по 0,225 ЛД<sub>50</sub>, на 13–16-е сут — по 0,33 ЛД<sub>50</sub>, на 17–20-е сут — по 0,50 ЛД<sub>50</sub>, на 21–24-е сут — по 0,75 ЛД<sub>50</sub> и на 25–28 сут — по 1,125 ЛД<sub>50</sub>. Введение проводят ежедневно, без выходных, контрольные животные в адекватных объемах получают растворитель.

Недостатком метода P. Lim et.al. является применение массивных доз СОТС и оценка кумулятивного эффекта только с учетом альтернативного показателя — гибели животных без анализа токсикодинамики повторного воздействия и морфофункциональных изменений, происшедших в организме животных.

10. Сенсibiliзирующие свойства СОТС определяют на модели воспроизведения гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) на белых мышах. В опытную и контрольную группы берут по 10–12 беспородных белых мышей. Животных сенсibiliзируют 100 мкл СОТС однократно внутрикожно в основание хвоста туберкулиновым или микрошприцем. Нативный СОТС растворяют в растворе Хэнкса (рН = 7,5) или стерильном физиологическом растворе таким образом, чтобы сенсibiliзирующая доза на 1 животное содержалась в 30 мкл (целесообразно использовать 0,35% рабочую концентрацию). Для водонерастворимых СОТС в качестве растворителей используют диметилсульфоксид, этиловый спирт, ацетон в конечной концентрации не более 20%, а также автоклавированное вазелиновое или растительное масло. Из рабочей концентрации СОТС готовится в соотношении 1:1 смесь с иммуностимулятором — полным адьювантом Фрейнда (далее — ПАФ) при их тщательном совместном эмульгировании (интенсивном перемешивании на магнитной мешалке). Опытным животным вводится по 60 мкл сенсibiliзирующей дозы в ПАФ, контрольным — 60 мкл смеси ПАФ с растворителем (без изучаемого СОТС).

Сенсibiliзацию выявляют на 6-е сут опыта провокационными пробами — по тесту опухания лапы мыши (ТОЛМ) и /или тесту опухания уха (ТОУМ), а также с использованием лабораторных методик аллергодиагностики, из которых наиболее технически проста в постановке и воспроизводима реакция специфического лейколизиса.

При оценке сенсibiliзирующей способности СОТС следует учитывать, что экспериментальная модель воспроизведения сенсibiliзации на мышах недостаточно чувствительна даже при использовании ПАФ, поэтому при сомнительных результатах аллергологического тестирования и затруднении их оценки следует провести исследования на модели внутрикожной сенсibiliзации морских свинок-альбиносов в ухо по методу Алексеевой–Петкевич согласно методическим указаниям № 10-53-97 «Требования к постановке экспериментальных исследований по изучению аллергенных свойств и обоснованию гигиенических регламентов химических аллергенов в воздухе рабочей зоны» (Мн.: МЗ РБ, 1999. — 23 с.) либо путем длительного (20-кратного) эпикутанного воздействия по методу О.Г. Алексеевой и Н.И. Шумской (Изучение сенсibiliзирующих свойств химических веществ в эксперименте // Методы определения токсичности и опасности химических веществ. — М., 1970. — С. 275–281).

По завершении исследований определяют класс аллергенной активности СОТС согласно классификации, изложенной в методических указаниях «Требования к постановке экспериментальных исследований по изучению аллергенных свойств и обоснованию гигиенических регламентов химических аллергенов в воздухе рабочей зоны и атмосферы» (Мн.: МЗ РБ, 2004. — 24 с.).

При отсутствии раздражающего действия СОТС, доказанного в экспериментах на животных, допускается оценивать раздражающие и сенсibiliзирующие свойства в натуральных исследованиях на волонтерах путем постановки закрытой эпикутанной «лоскутной» пробы с использованием 1–5% растворов СОТС согласно инструкции по

применению «Методы определения и оценки токсикологических и клинико-лабораторных испытаний показателей безопасности и безвредности для человека товаров народного потребления», утвержденной заместителем Министра здравоохранения – Главным государственным санитарным врачом Республики Беларусь 18.07.2012, № 004-0612.

#### ГЛАВА 4 МЕТОДЫ ОЦЕНКИ БИОСТОЙКОСТИ СОТС

1. Изучение биостойкости СОТС проводят методом диффузии в агар или импедансным методом, сущность которых заключается в выдерживании СОТС, инокулированных культурами бактерий в условиях, оптимальных для их развития, с последующей оценкой биостойкости.

*Оборудование, материалы, питательные среды и реактивы:*

Оборудование: НД (ГОСТ, ТУ)

Анализатор электрохимическим (импедансным) принципом детекции	микробиологический с -	
Анализатор потенциометрический с погрешностью измерений $pH \pm 0,1$ (рН-метр)		ГОСТ 19881-74
Аппарат для встряхивания жидкости в колбах или пробирках		ТУ 64-1-2451-78
Баня водяная с терморегулятором, позволяющая поддерживать температуру $(45 \pm 1,0)^\circ C$		ГОСТ 12026-76
Весы лабораторные квадрантные 4-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 500 г		ГОСТ 24104– 88Е
Весы лабораторные 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г		ГОСТ 24104– 88Е
Гигрометр психрометрический, тип ВИТ-1		
Дистиллятор электрический		
Ламинарный шкаф для культуры клеток (класс I)		
Ламинарный шкаф (класс II)		
Лупа с пятикратным увеличением		ГОСТ 25706– 83
Микроскоп световой биологический с увеличением 900–1000 <sup>x</sup>		ГОСТ 8284-78
Облучатель бактерицидный		ТУ РБ 14790891.001-95
Пипетки автоматические дозаторы любого типа объемом 0,02–0,5 мл $\pm 1,0\%$		
Прибор для счета колоний бактерий ПСБ		ТУ 64-1-2041-72
Стерилизаторы паровые медицинские или аналогичные		ГОСТ 19569-89

Стерилизатор сухожаровой с автоматической регулировкой температуры (100–220)°С	ГОСТ 24437-89
Термометр ртутный с диапазоном измерения от 0 до 100°С, цена деления шкалы —1°С	ГОСТ 24498– 90
Термостаты электрические суховоздушные с автоматическим терморегулятором до 50°С, позволяющие поддерживать заданную температуру с погрешностью ±1°С	ТУ 64-1-1382-72
Холодильник бытовой	ГОСТ 16317-87
Часы сигнальные или песочные	
Электроплитка бытовая	ГОСТ 14919-83
Материалы:	
Бумага индикаторная универсальная	ТУ 6-091181-76
Бумага плотная для упаковки посуды	ГОСТ 12026-76
Бумага фильтровальная лабораторная	ГОСТ 12026-76
Вата медицинская гигроскопичная	ГОСТ 5556-81
Воронки стеклянные	ГОСТ 25336-82Е
Картон для предварительной фильтрации марки КФБЖ	ТУ 13-7308000-691-84
Картон для предварительной фильтрации марки КФМП	ТУ 13-7308001-673-84
Колбы плоскодонные конические или круглые разной вместимости	ГОСТ 25336-82
Линейки измерительные	ГОСТ 427-75
Маркеры водостойкие	
Марля медицинская	ГОСТ 9412-93
Наконечники к дозаторам	ГОСТ 21241-89
Ножницы	ГОСТ 21241-89
Оптический стандарт мутности на 5 единиц	
Петли бактериологические	
Пинцеты медицинские	
Пипетки разной вместимости 2 класса точности	ГОСТ 20292-74
Пробирки бактериологические типов П1 и П2	ГОСТ 25336-82
Сверло пробочное № 4 или пробойник диаметром 10 мм	
Скальпель хирургический	ГОСТ21240-89
Спиртовки лабораторные стеклянные	ГОСТ 23932- 90 Е
Стандарт титры для приготовления образцовых буферных растворов для рН-метрии	ГОСТ 8.135-2004 ГСИ
Стекла предметные	ГОСТ 9284-75
Стекла покровные	ГОСТ 6672-75
Ступки фарфоровые	ГОСТ 9147-80

Цилиндры на 100–250 см <sup>3</sup>	ГОСТ 1770-74
Флаконы стеклянные градуированные вместимостью 100; 200; 500 см <sup>3</sup>	ГОСТ 10782-85
Штативы для пробирок	
Шпатели стеклянные	
Чашки Петри 90–100 мм	ГОСТ 25336-82
Питательные среды и реактивы:	
Агар микробиологический в порошке или волокнах	ГОСТ 17206-96
Агар сухой питательный для культивирования микроорганизмов	ФС 42-188ВС-90
Бульон мясопептонный	ГОСТ 10444.1-84
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709-72
Глюкоза	ГОСТ 6038-79
Кислота соляная, раствор с массовой концентрацией 0,1 моль/дм <sup>3</sup>	ГОСТ 3118-77
Натрия гидроокись, раствор с массовой концентрацией 0,1 моль/дм <sup>3</sup>	ГОСТ 4238-77
Натрий хлористый	ГОСТ 4233-77
Основа бактериологическая питательных сред сухая (типа Бактофок-МК)	ФС 42-3407-97
Пептон сухой ферментативный	ГОСТ 13805-76
Питательная среда № 1 (для культивирования аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов), сухая	ВФС 42-1801-88
Спирт этиловый ректификованный	ГОСТ 5962-67
Спирт этиловый ректификованный технический	ГОСТ 18300-87
Агар микробиологический	ГОСТ 17206-96

Тест-микроорганизмы:

<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов

Допускается 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 в соответствии с инструкцией.

Допускается использование вышеуказанных тест-микроорганизмов с другими номерами штаммов.

2. Подготовку и стерилизацию посуды для микробиологического анализа производят согласно требованиям СТБ ГОСТ Р 51446-2001 «Продукты пищевые. Общие правила микробиологических исследований».

3. Приготовление растворов, реактивов и питательных сред.

При выполнении анализа предпочтительно использовать стандартизированные сухие питательные среды промышленного производства. Промышленные сухие питательные среды готовят в соответствии с указаниями изготовителя на этикетке.

3.1. При взвешивании компонентов сред и реактивов допускается погрешность 0,1%.

3.2. Для приготовления растворов реактивов и питательных сред используют дистиллированную воду, если нет специальных указаний, и реактивы квалификации «х.ч.» или «ч.д.а.». Питательные среды готовят в посуде из инертного материала.

3.3. Необходимое значение водородного показателя рН (далее — рН) растворов и питательных сред устанавливают с помощью раствора гидроксида натрия массовой концентрации 0,1 моль/дм<sup>3</sup> или раствора кислоты соляной объемной долей 0,1 моль/дм<sup>3</sup>, рН растворов и питательных сред определяют с помощью рН-метра. Ориентировочное определение рН растворов и питательных сред допускается проводить с помощью индикаторной бумаги. Учитывая возможное изменение рН питательных сред после кипячения и стерилизации, окончательный контроль рН проводят в готовой среде при температуре 25°C с использованием индикаторной бумаги.

3.4. Приготовление раствора.

Изотонический 0,85% раствор хлористого натрия (физиологический раствор). В 1 л дистиллированной воды растворяют 8,5 г хлористого натрия, устанавливают рН с расчетом, чтобы после стерилизации рН он составлял (7,0±0,1). Разливают во флаконы. Стерилизуют при температуре (121±1)°С в течение 15 мин. Хранят при комнатной температуре не более 14 сут.

3.5. Приготовление питательных сред.

Мясопептонный агар с глюкозой: в колбу с 1 дм<sup>3</sup> мясопептонного бульона вносят 10,0 г пептона, 5,0 г натрия хлорида, 1,0 г глюкозы. Все ингредиенты растворяют, прибавляют 13,0 г агара микробиологического, нагревают смесь на электроплитке до полного растворения агара при перемешивании, фильтруют в горячем виде через воронку с ватно-марлевым или бумажным фильтром, устанавливают рН (7,3±0,1), разливают во флаконы и стерилизуют при температуре (121±1)°С в течение 20 мин; хранят при температуре (5±3)°С не более 1 мес. Вместо МПБ можно использовать перевар Хоттингера с концентрацией аминного азота не менее 100 мг/дм<sup>3</sup>.

Питательный агар «МК» с глюкозой: в колбе с 1 дм<sup>3</sup> воды дистиллированной растворяют 20,0 г Бактофока-МК, 5,0 г натрия хлорида, 1,0 г глюкозы, прибавляют

13,0 г агара микробиологического, нагревают смесь на электроплитке до полного растворения агара при перемешивании, фильтруют в горячем виде через воронку с ватно-марлевым или бумажным фильтром, устанавливают рН ( $7,3 \pm 0,1$ ), разливают во флаконы и стерилизуют при температуре ( $121 \pm 1$ )°С в течение 20 мин; хранят при температуре ( $5 \pm 3$ )°С не более 1 мес. Допускается использовать агар сухой питательный для культивирования микроорганизмов или питательную среду № 1 сухую.

Полужидкий питательный агар: в колбе с 1 дм<sup>3</sup> воды дистиллированной растворяют 15,0 г сухого питательного бульона и 3,0 г агара микробиологического, нагревают смесь на электроплитке до полного растворения агара при перемешивании, фильтруют в горячем виде через воронку с ватно-марлевым или бумажным фильтром, устанавливают рН ( $7,3 \pm 0,1$ ), разливают во флаконы и стерилизуют при температуре ( $121 \pm 1$ )°С в течение 20 мин; хранят при температуре ( $5 \pm 3$ )°С не более 1 мес.

4. Тест-микроорганизмы для изучения биостойкости СОТС. Требования к тест-микроорганизмам.

4.1. При изучении биостойкости СОТС в качестве тест-микроорганизмов используют:

*Escherichia coli* (АТСС 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (АТСС 15442) — для оценки биостойкости в отношении грамотрицательных бактерий; *Staphylococcus aureus* (АТСС 25923) — для оценки биостойкости в отношении грамположительных бактерий.

*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus* культивируют в термостате на мясопептонном агаре при температуре ( $35 \pm 2$ )°С в течение 18–24 ч.

Музейные культуры указанных выше микроорганизмов хранят при температуре ( $5 \pm 3$ )°С в ампулах (после лиофильной сушки) или на плотных питательных средах (посев уколом) под слоем стерильного вазелинового масла (толщина слоя 1,5–3 мм), периодичность пересевов — 12 мес.; рабочие культуры — на скошенном агаре, пересев не реже 1 раза в 6 мес.

Тест-микроорганизмы должны иметь типичные культурально-морфологические, ферментативные и биохимические свойства, присущие данному виду микроорганизмов.

4.2. Приготовление суспензии тест-микроорганизмов.

Рабочую суспензию готовят из культур тест-штаммов микроорганизмов. Для приготовления бактериальной взвеси культуры с помощью бактериологической петли переносят в отдельные пробирки, содержащие 10 мл физиологического раствора и доводят концентрацию клеток тест-штамма в инокуляте до  $10^7$  КОЕ/мл, используя стандарт мутности на 5 ед. Подтверждение содержания клеток в рабочей культуре проводят путем высева на среду МПА. Приготовленные суспензии *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus* с плотностью  $10^7$  КОЕ/мл тщательно встряхивают, сливают в равных объемах (1–2 мл) в стерильную пробирку и получают рабочую смесь тест-культур для проведения тестирования. Срок хранения суспензии смеси бактериальных культур не более 3 ч.

5. Изучение биостойкости СОТС методом диффузии в агар.

5.1. При проведении теста исследуемые СОТС вносят в лунки агаризированной

питательной среды, содержащей рабочую концентрацию тест-штамма. При диффузии СОТС в агар композиция может ингибировать рост тест-штаммов, давая зону задержки роста (ингибирования).

#### 5.2. Подготовка чашек Петри для проведения теста.

Питательные среды (мясопептонный агар с глюкозой или питательный агар «МК» с глюкозой) во флаконах вместимостью 500 мл, содержащих 200–300 мл среды, помещают в водяную баню и нагревают до полного растворения. Расплавленную среду охлаждают до 45–50°C и вносят 2 мл суспензии рабочей культуры на 100 мл питательной среды, осторожно перемешивая питательную среду вращательными движениями. Питательную среду после заражения разливают по 15–20 мл в чашки Петри, чтобы после застывания ее толщина составляла 4 мм, и устанавливают на строго горизонтальном столе. После застывания питательной среды стерильным пробочным сверлом вырезают лунки, вырезанные блоки асептически удаляют скальпелем. Подготовленные чашки Петри со средой хранят в холодильнике в течение 2 дней.

#### 5.3. Проведение теста.

В лунки, подготовленные для исследования (чашки Петри), вносят по 0,1 мл испытуемого СОТС и выдерживают 1 ч при комнатной температуре. Чашки Петри помещают в термостат крышками кверху и инкубируют при температуре 30±1°C в течение 48 ч.

#### 5.4. Оценка результатов.

Результаты оценивают визуально по величине зоны ингибирования. Величину зоны задержки роста микроорганизмов (до границы роста микроорганизмов) измеряют в миллиметрах. Оценку биостойкости СОТС проводят по трехбалльной шкале (таблица 2).

Таблица 2 — Шкала оценки биостойкости СОТС в баллах

Диаметр зоны ингибирования, мм	Балл	Характеристика балла	Степень биостойкости
Более 15	0	При осмотре невооруженным глазом наблюдаются большие четко выраженные зоны отсутствия роста микроорганизмов вокруг лунок, содержащих СОТС	Полная бактериостойкость
5–15	1	При осмотре невооруженным глазом заметны зоны отсутствия роста микроорганизмов	Удовлетворительная бактериостойкость
Менее 5	2	При осмотре невооруженным глазом не наблюдается зоны отсутствия роста микроорганизмов	Небактериостойкость

## 6. Оценка биостойкости СОТС на импедиметрическом анализаторе.

6.1. Рост тест-микроорганизмов на начальных этапах развития в стационарной культуре является следствием прямой зависимости численной характеристики популяции и зависит от особенностей ее начального роста. Для оценки биологического действия СОТС определяют продолжительность лаг-фазы роста тест-штамма микроорганизма в опыте (в присутствии СОТС) и контроле (без добавления СОТС).

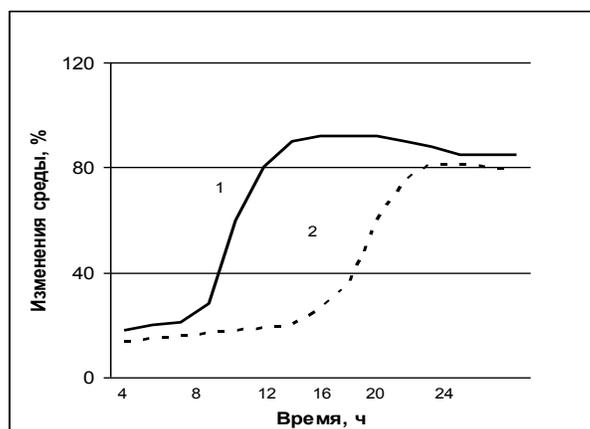
6.2. Приготовленные среды (полужидкий питательный агар) разливают в измерительные ячейки (пробирки) по 7,5–10 мл, инокулируют 0,1–0,5 мл суспензии рабочей культуры.

6.3. Изучаемые пробы СОТС стерильной пипеткой вносят в приготовленные культуральные среды, тщательно перемешивают внесенные композиции по всему объему среды. В контрольные среды вместо изучаемого СОТС вносят дистиллированную воду.

6.4. Измерительные ячейки (пробирки) помещают в термоинкубатор и выдерживают при температуре 30°C в течение 4–18 ч. Исследования проводят не менее чем в трех повторностях для каждой пробы СОТС.

### 6.5. Оценка результатов.

Для оценки тест-штамма выбирают параметр детекции таким образом, чтобы кривая роста тест-культур на соответствующей питательной среде имела характерный вид: стабильную базовую линию, выраженную фазу быстрого роста культуры и значительные изменения электрохимических показателей среды (рисунок).



1 — в контроле (без внесения СОТС); 2 — в опыте (с внесением СОТС)

### Рисунок — Типичный график роста тест-культур

Оценку результатов проводят на основании времени детекции роста тест-штамма в течение 2–10 ч, при этом осуществляется постоянная регистрация изменений электрохимических показателей среды культивирования.

Оценка биостойкости СОТС основывается на сравнении параметров детекции  $IDT$  (Impedance Detection Time) в контроле ( $DT_1$ ) и опыте ( $DT_n$ ) по формуле:

$$A = \frac{DT_n}{DT_1},$$

где  $A$  — показатель биостойкости;

$DT_1$  — значение времени детекции в контроле (без исследуемой СОТС);

$DT_n$  — значение времени детекции в опыте (с исследуемой СОТС).

Для расчета показателя  $A$  берутся средние арифметические значения  $DT_1$  и  $DT_n$  (не менее чем из 3 повторностей).

По значению  $A$  судят о биостойкости исследуемого СОТС:

- при  $A = 1$  — проба не обладает бактериостойкостью;
- при  $A = 1,1-1,4$  — степень бактериостойкости пробы удовлетворительная;
- при  $A = 1,5$  и более — полная бактериостойкость пробы.

## ГЛАВА 5

### РЕКОМЕНДУЕМЫЕ МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ОТДАЛЕННЫХ (СПЕЦИФИЧЕСКИХ) ЭФФЕКТОВ СОТС НА АЛЬТЕРНАТИВНЫХ ТЕСТ-ОБЪЕКТАХ

1. Оценка специфических эффектов (мутагенный, генотоксический, канцерогенный и др.) вновь разрабатываемых рецептур СОТС проводится альтернативными методами на различных тест-объектах, использование которых позволяет провести исследования в более короткие сроки и без существенных материальных затрат по сравнению с классическими методами в опытах на экспериментальных животных.

2. Технология постановки и интерпретация альтернативных методов, а также используемые тест-модели изложены в следующих документах:

- инструкция по применению «Технология оценки токсичности потенциально опасных химических веществ с использованием альтернативных тест-моделей», утвержденная заместителем Министра здравоохранения – Главным государственным санитарным врачом Республики Беларусь 30.12.2008, № 132-1108;

- инструкция № 2.1.7.11-12-42-2004 «Определение токсичности отходов, содержащих органические вещества», утвержденная заместителем Министра здравоохранения – Главным государственным санитарным врачом Республики Беларусь 31.12.2004;

- инструкция по применению «Применение системы маркеров токсического воздействия ксенобиотиков на клетки про- и эукариот для гигиенической оценки опасности загрязнения объектов среды обитания человека», утвержденная заместителем Министра здравоохранения – Главным государственным санитарным врачом Республики Беларусь 24.12.2010 № 104-1110;

- МУК «Методы первичного выявления генетической активности загрязнителей среды с помощью бактериальных тест-систем». — М., 1985. — 34 с.

3. Для оценки специфических эффектов СОТС допускается использование других общепринятых альтернативных методов исследования.

### **Критерии безопасности и безвредности СОТС для человека**

- СОТС по параметрам острой токсичности должны относиться к 3, 4 классам опасности по ГОСТ 12.1.007-76 (при введении в желудок и нанесении на кожу) и к 3, 4 классам по классификации химических веществ по степени летучести при ингаляции в насыщающих концентрациях паров;

- СОТС не должны обладать выраженным местно-раздражающим действием на кожные покровы и слизистые глаз, резорбтивным и аллергенным эффектами (3, 4 классы);

- кумулятивные свойства СОТС должны быть слабо выраженными ( $K_{\text{кумулят.}} > 5$ );

- в рецептуре СОТС не должны содержаться компоненты, относящиеся к 1 классу опасности (за исключением нитрита натрия — до 0,02%) и обладающие, по данным литературы, отдаленными эффектами (мутагенный, генотоксический, гонадотропный, эмбриотоксический, канцерогенный и пр.);

- СОТС должны быть биостойкими (до 1 балла по шкале оценки бактериостойкости);

- при производстве и применении СОТС не должны выделять в воздух рабочей зоны химических веществ в количествах, превышающих их гигиенические нормативы (ПДК, ОБУВ) для воздуха рабочей зоны.