Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
(Роспотребнадзор)

Управление Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Московской области
(Управление Роспотребнадзора по Московской области)

Лобненский территориальный отдел Управления Роспотребнадзора по Московской области
ул. Калинина, д. 4а, г. Лобня, Московская область, 141730
тел./факс 8(495) 577-65-70
e-mail: lobnya@50.rospotrebnadzor.ru
ОКПО 75260339 ОГРН 1055005107387
ИНН/КПП 5029036866/502901001

08.08.2025 № 50-01/13-46193-2025 Л/01-исх

На ____________ ____________

В администрацию
городского округа
Долгопрудный.

Лобненский территориальный отдел Управления Роспотребнадзора по Московской области направляет информацию о внедрении в деятельность нормативного документа МУ 4.2.4071-24 «Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Экспериментальное обоснование ПДК и регламентация биотехнологических штаммов микроорганизмов и и содержащих их микробиологических препаратов в объектах производственной и окружающей среды. Методические указания». Для направления и публикации в СМИ.

Приложение: МУ 4.2.4071-24.

.

Зам. начальника Лобненского территориального отдела

Подлинник электронного документа, подписанного ЭП, хранится в Межведомственной системе электронного документооборота Роспотребнадзора
СВЕДЕНИЯ О СЕРТИФИКАТЕ ЭП
Сертификат: 009F9921BD72E06F620C64589C37B1B7
Владелец: Симагина Ольга Валерьевна
Действителен с 28-01-2025 до 23-04-2026

О.В. Симагина

Исп. Скворцова Т.В.
(495) 577-65-70

"МУ 4.2.4071-24. 4.2. Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Экспериментальное обоснование ПДК и регламентация биотехнологических штаммов микроорганизмов и содержащих их микробиологических препаратов в объектах производственной и окружающей среды. Методические указания" (утв. Роспотребнадзором 27.09.2024)

Содержание

Утверждаю
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный врач
Российской Федерации
А.Ю.ПОПОВОЙ
27 сентября 2024 г.

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПДК И РЕГЛАМЕНТАЦИЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ И СОДЕРЖАЩИХ ИХ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ В ОБЪЕКТАХ ПРОИЗВОДСТВЕННОЙ И ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ
МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
МУ 4.2.4071-24

Дата введения
31 декабря 2024 года

1. Разработаны ФГАОУ ВО "Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова" Минздрава России (Н.И. Шеина, В.В. Королик, Ю.П. Пивоваров, Э.Г. Скрябина, Л.И. Мялина, В.В. Колесникова); ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова

Минздрава России (Е.В. Буданова); ФГБУ НИЦ "Курчатовский институт" (С.П. Синеокий, К.Е. Воюшин).

2. Утверждены руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации А.Ю. Поповой 27 сентября 2024 г.

3. **МУ 4.2.4071-24 введены взамен** Методических указаний по экспериментальному обоснованию ПДК микроорганизмов-продуцентов и содержащих их готовых форм препаратов в объектах производственной и окружающей среды, утвержденных Минздравом СССР 11.06.1991 **N 5789/1-91**; Критериев оценки патогенных свойств штаммов-продуцентов, предлагаемых для использования в промышленности микробиологического синтеза. **Методические рекомендации**, утвержденные Государственным комитетом санитарно-эпидемиологического надзора Российской Федерации (зам. Председателя Госкомитета). М., 1992; Методики оценки воздействия штаммов-продуцентов на объекты окружающей среды. **Методические рекомендации**, утвержденные Государственным комитетом санитарно-эпидемиологического надзора Российской Федерации. М., 1996; **МУК 4.2.1054-01** "Измерение концентраций микроорганизмов продуцентов, бактериальных препаратов и их компонентов в атмосферном воздухе населенных мест", утвержденных Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации, Первым заместителем Министра здравоохранения 06.07.2001.

I. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

1.1. Настоящие методические указания (далее - МУ) описывают этапы санитарно-гигиенической оценки биотехнологических штаммов микроорганизмов и микробиологических препаратов (далее - препараты) на их основе в объектах производственной и окружающей среды.

1.2. Настоящие МУ предназначены для получения сопоставимых материалов выбора оптимального объема исследований и повышения надежности величины гигиенического норматива при обосновании гигиенических регламентов биотехнологических штаммов микроорганизмов и препаратов на их основе в объектах производственной и окружающей среды.

1.3. Первичной санитарно-гигиенической оценке и регламентированию подлежат штаммы микроорганизмов, предназначенные для использования в технологических процессах, а также препараты на их основе, содержащие живые клетки или споры. Для микроорганизмов и препаратов на их основе разрабатывается только предельно допустимая концентрация (далее - ПДК), а не временный гигиенический норматив (ориентировочно безопасный уровень воздействия (далее - ОБУВ), ориентировочный допустимый уровень (ОДУ) с использованием расчетных методов прогноза токсичности и опасности.

1.4. Настоящие МУ предназначены для специалистов Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, деятельность которых связана с разработкой, производством и обращением биотехнологической продукции, а также для лабораторий других организаций, аккредитованных на проведение микробиологических исследований, занимающихся регламентированием биотехнологических штаммов микроорганизмов и содержащих их препаратов в воздухе рабочей зоны, атмосферном воздухе городских и сельских поселений, в воде водоемов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования и почве в установленном порядке <1>.

<1> Федеральный закон от 28.12.2013 N 412-ФЗ "Об аккредитации в национальной системе аккредитации".

II. ДОКУМЕНТЫ И СВЕДЕНИЯ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ НАУЧНОГО ОБОСНОВАНИЯ ГИГИЕНИЧЕСКОГО РЕГЛАМЕНТА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ШТАММА И ПРЕПАРАТА НА ИХ ОСНОВЕ

2.1. Для разработки гигиенического норматива заявителю целесообразно предоставить паспорт и справку о депонировании штамма (штаммов препарата), выданные уполномоченной коллекцией микроорганизмов.

2.2. Для селекционных штаммов микроорганизмов перед проведением токсиколого-гигиенического исследования с целью установления ПДК заявителю рекомендуется предоставить следующие данные:

- способ применения штамма и, при возможности, мощность биотехнологического предприятия;
- наличие факторов устойчивости к антибактериальным препаратам (далее - АБП).

2.3. Для готовых форм препаратов на основе селекционных микроорганизмов рекомендуется представить следующие сведения:

- торговое название и назначение;
- техническая документация (ТУ, ГОСТ) и технический регламент;
- способ получения и применения, мощность предприятия;
- действующее начало, наполнитель, технологические добавки;

- стадия развития и количество живых клеток и спор микроорганизмов на единицу массы готового препарата;

- содержание посторонней микрофлоры;

- агрегатное состояние препарата и дисперсионный состав аэрозоля.

2.4. Штаммы микроорганизмов, полученные с использованием методологии генетической инженерии (далее - штаммы ГММ) и предназначенные для использования в замкнутых промышленных системах, депонируются заявителем в уполномоченной коллекции <2>.

ИС МЕГАНОРМ: примечание.
В официальном тексте документа, видимо, допущена опечатка: Федеральный закон N 86-ФЗ "О государств
деятельности" принят 05.07.1996, а не 05.06.1996.

<2> Статья 10.1 Федерального закона от 05.06.1996 N 86-ФЗ "О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности" (далее - Федеральный закон от 05.06.1996 N 86-ФЗ); Национальный Биоресурсный Центр Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов ФГБУ НИЦ "Курчатовский институт" (далее - БРЦ ВКПМ).

Государственная регистрация штаммов микроорганизмов, полученных с использованием методологии генетической инженерии, осуществляется в порядке, установленном законодательством Российской Федерации <3>.

ИС МЕГАНОРМ: примечание.
В официальном тексте документа, видимо, допущена опечатка: имеется в виду Федеральный закон N 86-ФЗ

<3> Федеральный закон от 05.06.1996 N 86-ФЗ.

2.5. Для проведения экспертизы биобезопасности с целью оценки возможности применения штамма ГММ в промышленном производстве заявителю рекомендуется представить следующие документы и данные:

- описание внесенного генетического материала, подтверждающее соответствие характеристикам (рекомендуемый перечень характеристик представлен в приложении 1 к настоящим МУ);

- валидированную методику определения штамма ГММ (с указанием нуклеотидных последовательностей, используемых праймеров и режимов проведения полимеразной цепной реакции (далее - ПЦР);

- сведения о штамме-реципиенте;

- сведения, подтверждающие возможность отнесения к линии штамма, разрешенного для использования в промышленности (при наличии);

- оценку риска использования штамма ГММ и рекомендации по уменьшению допустимого риска (см. приложения 1 и 2 к настоящим МУ);

- условия планируемого использования штамма ГММ, включая подробное описание технологического процесса и санитарно-технических мероприятий (мер физической защиты);

- экономическую значимость использования штамма ГММ;

- план мероприятий по предупреждению аварийных ситуаций и ликвидации их последствий.

2.6. Экспертиза биологической безопасности включает анализ соответствия характеристик внесенного генетического материала и выполнение рекомендаций по безопасному конструированию штаммов ГММ, в том числе:

- оценку биобезопасности внесенного генетического материала и проведенных генетических модификаций материала (см. приложение 1 к настоящим МУ);

- оценку биобезопасности штамма-реципиента (см. приложение 2 к настоящим МУ);

- проверку методики определения штамма ГММ (см. приложение 3 к настоящим МУ);

- определение необходимых санитарно-технических мероприятий (мер физической защиты) при промышленном использовании штамма ГММ для обеспечения безопасных уровней воздействия для здоровья работников и их соответствие санитарно-техническим мероприятиям (мерам физической защиты), предлагаемым заявителем.

2.7. Результаты экспертизы биобезопасности целесообразно оформлять в виде заключения, включающего:

- наименование штамма ГММ с указанием его таксономического статуса;

- место депонирования и коллекционный номер штамма ГММ;

- сведения об отнесении к группе общего нормативного регулирования (при наличии);

- выводы экспертизы;

- рекомендации по необходимым мерам обеспечения биобезопасности при промышленном использовании штамма ГММ;

- дату заключения экспертизы;

- фамилии, имена, отчества (при наличии) лиц, проводивших экспертизу, их ученая степень (звание при наличии) и должности.

III. СХЕМА ТОКСИКОЛОГО-ГИГИЕНИЧЕСКОГО ИЗУЧЕНИЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ И СОДЕРЖАЩИХ ИХ ПРЕПАРАТОВ С ЦЕЛЬЮ ИХ РЕГЛАМЕНТАЦИИ В ОБЪЕКТАХ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

3.1. Принципы гигиенического нормирования биотехнологических штаммов микроорганизмов и препаратов на их основе отличаются от таковых, используемых при регламентации вредных химических веществ, в том числе и продуктов микробиологического синтеза (например, аминокислоты, ферменты, АБП, кормовые добавки, белково-витаминные добавки).

В условиях острого эксперимента показателями непатогенных (не вызывающих у человека инфекционных процессов) биотехнологических штаммов микроорганизмов и консорциума штаммов, входящих в состав препаратов, являются вирулентность, токсичность, токсигенность и диссеминация во внутренние органы, а, при необходимости, определение "пороговой" дозы и "ферментов патогенности".

Показателями опасности биотехнологических штаммов микроорганизмов и препаратов на их основе при субхроническом воздействии являются транзиторное бактерионосительство (диссеминация во внутренние органы), специфическое влияние на иммунную систему (иммунотоксичность, аллергенность) и на микробиоту кишечника животных [1].

3.2. Для установления гигиенических нормативов биотехиологических штаммов микроорганизмов предусмотрена процедура проведения токсиколого-гигиенических исследований (табл. 1).

Таблица 1

Детализация процедуры обоснования ПДК биотехнологических штаммов микроорганизмов в объектах окружающей среды (воздух рабочей зоны, атмосферный воздух, вода водоемов, почва)

Этапы	Путь поступления, вид животных	Тесты	Практический результат проведенных тестов
I	Однократное внутрибрюшинное введение; мыши	- вирулентность (LD_{50}); - токсичность; - токсигенность; - диссеминация во внутренние органы; - "пороговая доза" (далее - Lim_{bact}); - "ферменты патогенности"	На основе разработанных критериев (см. главы IV, V) формулируется вывод об отсутствии/наличии патогенных свойств и возможности использования штамма в биотехнологиях
II	2.1. Однократное внесение в конъюнктивальный мешок глаза; однократные и повторные аппликации на кожу; кролики и морские свинки	- тесты по оценке раздражающего действия	Установление наличия или отсутствия раздражающего действия на модельных животных (см. главу VII)
	2.2. Ингаляционный, пероральный в течение 1 месяца, исключая субботу и воскресенье; крысы	- тесты по оценке сенсибилизирующего действия, иммунотоксического и дисбиотического эффектов	Определение пороговой дозы/концентрации (Lim_{subch}) по лимитирующему критерию вредного действия (далее - ЛКВД) в воздухе рабочей зоны и атмосферном воздухе (глава VIII), в воде водоемов (главы XI - XIII) и почве (главы XIV, XV)
	2.3. Внесение микроорганизмов в модельные водоем и почву	- тесты по оценке влияния на процессы самоочищения водоемов и почвы	
III	Научное обоснование ПДК биотехнологических штаммов микроорганизмов в воздухе рабочей зоны, атмосферном воздухе городских и сельских поселений, в воде водоемов		

	и почве. Подача материалов по обоснованию ПДК штаммов микроорганизмов и препаратов на их основе в Роспотребнадзор для утверждения в установленном порядке

Токсиколого-гигиенические исследования предусматривают оценку патогенных свойств биотехнологических штаммов при однократном воздействии и оценку опасности изучаемого микроорганизма при повторном воздействии при поступлении в организм лабораторных животных путями, адекватными реальным условиям трудовой деятельности и обитания человека с целью определения лимитирующего критерия вредности и установления величины ПДК.

3.3. В процедуру проведения исследований по обоснованию гигиенических нормативов готовых форм препаратов, принимая во внимание наличие в них химических соединений в виде добавок и наполнителей, включаются отдельные тесты, используемые при гигиеническом нормировании вредных химических соединений. В этом случае токсиколого-гигиеническая оценка формы препарата включает помимо уже названных показателей, характеризующих специфическое воздействие микроорганизма на организм и объекты окружающей среды, показатели острой токсичности готовой формы препарата и токсикологическую характеристику химических компонентов препарата:

1) патогенные свойства микроорганизмов, являющихся активной субстанцией препарата. Если препарат содержит более 3 штаммов микроорганизмов, проводится изучение патогенных свойств всего консорциума микроорганизмов для исключения возможного аддитивного (суммарного) эффекта;

2) острая пероральная токсичность препарата - средняя смертельная доза (далее - DL_{50}) (мыши, крысы);

3) острая ингаляционная токсичность препарата - средняя смертельная концентрация (CL_{50}) (крысы);

4) раздражающее действие на слизистую оболочку глаз при однократном нанесении и повторном нанесении на кожу (кролики, морские свинки);

5) токсикологическая характеристика других компонентов препаративной формы;

6) токсикологические показатели состояния крыс в субхроническом эксперименте (внешний вид, динамика массы тела, биохимия крови, массовые коэффициенты внутренних органов). В случае, если препарат не содержит химические добавки, а представляет собой смесь штаммов, воды и остатков питательной среды, изучение общего токсического действия является необязательным;

7) сенсибилизирующее и иммунотоксическое действие препарата (мыши, крысы, морские свинки);

8) действие на микробиоту кишечника препарата (крысы).

3.4. Особенности разработки ПДК моно- и многокомпонентных микробиологических препаратов.

Моно- и многокомпонентные препараты постоянного состава подразумевают рецептуры, полученные в результате смешивания одного, двух и более штаммов микроорганизмов и имеющих соответствующие номера ГОСТ или ТУ, которые и определяют свойства данных препаратов на их основе.

Для монопрепарата величина ПДК устанавливается по активному компоненту - биотехнологическому штамму микроорганизма.

При определении ПДК многокомпонентного препарата постоянного состава консорциум штаммов исследуется как единое вещество в соответствии с общими правилами. При этом величина гигиенического норматива устанавливается на сумму всех штаммов при условии использования единой селективной среды либо на приоритетный штамм, содержащийся в большей концентрации в консорциуме или оказывающий вредный специфический эффект. Наряду с величиной ПДК при наличии указывается специфический лимитирующий признак вредности - пометка А (аллерген) и класс опасности. При нормировании штаммов микроорганизмов с одинаковым лимитирующим признаком достаточно оценить эффект смеси на лимитирующий показатель и убедиться в отсутствии действия большего, чем аддитивное.

На консорциум микроорганизмов препарата устанавливается такая величина ПДК, при которой с поступлением смеси в организм не превышаются нормативы ни на один из ее компонентов. Если какой-либо компонент в составе смеси превышает свой норматив при попадании этой смеси в объект окружающей среды, экспериментально установленная величина норматива на смесь корректируется так, чтобы этот компонент в составе смеси не превышал свой норматив.

Не нормируются только те компоненты, в том числе и химические, для которых доказано отсутствие биологической активности на основании представленных литературных или собственных экспериментальных данных.

Контроль содержания смеси (консорциума) микроорганизмов в воздухе ведется по приоритетному (индикаторному) штамму(-ам) или по общему количеству всех штаммов при условии использования единой селективной питательной среды для них. Выбор приоритетного штамма проводится на основе выявления наиболее опасного штамма или штамма, присутствующего в большем количестве [2 - 4].

3.5. Токсиколого-гигиенические исследования с целью обоснования гигиенических нормативов проводят на следующих видах половозрелых животных: белые беспородные мыши (масса 14 - 18 г, но не более 20 г), а также белые беспородные крысы (масса 200 - 220 г), морские свинки светлой масти (масса 250 - 350 г), кролики породы Шиншилла (масса 2,5 - 3,5 кг) в соответствии с методическими документами <4>, а также документами по стандартизации <5>.

<4> МУК 4.2.2602-10 "Система предрегистрационного доклинического изучения безопасности препаратов. Отбор, проверка и хранение производственных штаммов, используемых при производстве пробиотиков", утвержденные руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 21.04.2010; Методические указания по гигиенической оценке микробных средств защиты растений от насекомых и болезней на основе неспорообразующих микроорганизмов, утвержденные Заместителем Главного государственного санитарного врача 22.09.1982 N 2620-82; ОФС 1.7.2.0001.15 "Безопасность пробиотиков в тестах in vivo", утвержденная приказом Минздрава России от 31.10.2018 N 749 (далее - ОФС 1.7.2.0001.15).

<5> ГОСТ 10444.7-86 "Методы выявления ботулинистических токсинов и *Clostridium botulinum*", введенный в действие постановлением Госстандарта СССР от 12.05.1986 N 1214.

При проведении экспериментов следует указать вид, линию или популяцию животных, пол, исходную массу животных, питомник, из которого получены животные, пищевой рацион и условия содержания животных в виварии, сезон года, когда были проведены исследования <6>. Исполнителю исследования рекомендуется представить справку из Этического комитета или Биоэтического комитета организации, выполняющей исследование.

<6> ГОСТ 33044-2014 "Принципы надлежащей лабораторной практики", введенный приказом Росстандарта от 20.11.2014 N 1700-ст; Р 1.2.3156-13 "Оценка токсичности и опасности химических веществ и их смесей для здоровья человека", утвержденное врио руководителя Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главного государственного санитарного врача Российской Федерации 27.12.2013.

IV. САНИТАРНО-ГИГИЕНИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ПАТОГЕННЫХ СВОЙСТВ ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ, ПРЕДЛАГАЕМЫХ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В БИОТЕХНОЛОГИЯХ

4.1. Исследование патогенных свойств биотехнологических микроорганизмов является необходимым этапом для оценки безопасности штаммов и возможности рекомендации их к использованию в биотехнологиях. Исследование включает 3 этапа (табл. 2) [5].

Таблица 2

Схема экспериментального исследования патогенных свойств биотехнологических микроорганизмов

1 этап	2 этап	3 этап
1. Определение DL_{50}; 2. Определение диссеминации штаммов во внутренние органы при однократном внутрибрюшинном введении микроорганизмов; 3. Определение токсигенности и токсичности при внутрибрюшинном введении центрифугатов микробных культур	1. Определение Lim_{bact}; 2. Определение "ферментов патогенности"	На основе проведенных исследований формируется вывод об отсутствии/наличии патогенности штаммов микроорганизмов

Первый этап исследования патогенных свойств штаммов микроорганизмов является основным, поскольку именно на этом этапе решается принципиальный вопрос о наличии или отсутствии патогенности штамма.

При отсутствии убедительных данных выполняют исследования, предусмотренные вторым этапом:

- определение скорости проникновения микроорганизма (Lim_{bact}) в кровь;

- определение "ферментов патогенности" (гиалуронидазной, желатиназной, лецитиназной, декарбоксилазной активности, термолабильного и термостабильного гемолизинов).

"Ферменты патогенности" являются вспомогательными показателями патогенных свойств и могут быть использованы для уточнения пределов действующих концентраций в случае, если DL_{50} составит менее 10^7 КОЕ/жив, или для установления особенностей действия исследуемого биотехнологического штамма бактериальной природы.

На основании результатов первого и второго этапов все штаммы микроорганизмов разделяют на третьем этапе исследований на группы:

- первая группа: непатогенные и рекомендуемые к использованию в биотехнологии;
- вторая группа: находящиеся на грани риска применения;
- третья группа: патогенные и не рекомендуемые к использованию на биотехнологических предприятиях <7>.

<7> Приложение 1 СанПиН 3.3686-21 "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней", утвержденных постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 28.01.2021 N 4 (зарегистрировано Минюстом России 15.02.2021, регистрационный N 62500), с изменениями, внесенными постановлениями Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 11.02.2022 N 5 (зарегистрировано Минюстом России 01.03.2022, регистрационный N 67587); от 25.05.2022 N 16 (зарегистрировано Минюстом России 21.06.2022, регистрационный N 68934) (далее - СанПиН 3.3686-21).

4.2. Критериально значимыми являются следующие числовые значения комплекса показателей, используемых для оценки патогенных свойств:

4.2.1. Штаммы микроорганизмов не являются патогенными (первая группа), определение "ферментов патогенности" не является обязательным этапом работы. Они рекомендуются к использованию в биотехнологии при условии, если:

- отсутствует способность вызывать заболевание или гибель мышей;
- DL_{50} более 10^7 КОЕ/мышь;
- отсутствует диссеминация во внутренние органы мышей после 15-дневного наблюдения;
- токсигенность и токсичность равна 0;
- Lim_{bact} более 10^7 КОЕ/мышь.

4.2.2. Штаммы микроорганизмов являются условно-патогенными (вторая группа) и находятся на грани риска применения; к этой группе следует относить те штаммы, свойства которых соответствуют хотя бы одному из приведенных ниже показателей, а остальные критерии могут соответствовать показателям микроорганизмов 1-ой группы. В этом случае для окончательного решения проводится исследование "ферментов патогенности" для бактерий и бактериальных препаратов.

Критериями для второй группы микроорганизмов являются следующие числовые значения показателей:

- отсутствие способности вызывать заболевания и гибель экспериментальных животных;
- DL_{50} равна или менее 10^7 КОЕ/мышь;
- Lim_{bact} равна или менее 10^7 КОЕ/мышь;
- имеется диссеминация во внутренних органах мышей после 15-дневного наблюдения;
- токсигенность и токсичность равна 2 Dlm/мл;
- "ферменты патогенности" определяются в следующих разведениях: лецитиназа - не выше 1:128; желатиназа - не выше 1:16; гиалуронидаза - не выше 1:32; термолабильный гемолизин - не выше 1:16; термостабильный гемолизин - не выше 1:64;
- имеет место декарбоксилазная активность к 9 аминокислотам без образования наиболее токсичных для человека аминов: кадаверина, путресцина, гистамина, тирамина и триптамина.

4.2.3. Штаммы микроорганизмов являются патогенными (третья группа) и не рекомендуются к использованию на биотехнологических предприятиях, если свойства штамма соответствуют одному или большему числу следующих критериев:

- отмечаются признаки заболевания (вялость или беспокойство, отказ от приема пищи, шерсть взъерошена, диарея) и гибель мышей;
- DL_{50} равна или менее 10^6 КОЕ/мышь;
- определяется диссеминация во внутренние органы в течение 15 дней наблюдения;
- токсигенность и токсичность более 2 Dlm/мл;
- Lim_{bact} равна или менее 10^6 КОЕ/мышь;
- "ферменты патогенности" определяются в следующих разведениях: лецитиназа - не выше 1:128; желатиназа - не выше 1:16; гиалуронидаза - не выше 1:32; термолабильный гемолизин - не выше 1:16; термостабильный гемолизин - не выше 1:32; узкий спектр декарбоксилаз (к 1 - 8 аминокислотам) с образованием одного или нескольких токсичных аминов: гистамина, тирамина, кадаверина, путресцина и триптамина.

В случае, если по всем показателям (DL_{50}, Lim_{bact}, токсигенность, токсичность и диссеминация) штамм относится к патогенным, определение "ферментов патогенности" проводить необязательно.

V. МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ПАТОГЕННЫХ СВОЙСТВ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ

5.1. Определение вирулентности (DL_{50}). Для определения DL_{50} используют взвесь суточной культуры биотехнологического штамма, содержащую от 10^5 до 10^9 микробных клеток или спор (в зависимости от их таксономической принадлежности) в 1,0 мл физиологического раствора (см. приложение 4 к настоящим МУ).

Каждое разведение взвеси микроорганизмов вводят внутрибрюшинно по 1,0 мл не менее чем 6 белым мышам одного пола. В контрольной группе 6 белым мышам вводят внутрибрюшинно по 1,0 мл физиологического раствора той же партии, что использовали для подготовки исследуемого штамма микроорганизмов (смыва с питательной среды и центрифугирования).

Наблюдения за животными проводят в течение 15-ти суток, а при необходимости и более, отмечая клинические проявления заболевания. Учитывают число возможных летальных исходов и определяют LD_{50} по общепринятой методике.

5.2. Определение диссеминации штаммов во внутренних органах экспериментальных животных. Приготовление суспензий биотехнологических штаммов микроорганизмов и заражение экспериментальных животных производят в соответствии с п. 5.1, используя белых мышей.

Наблюдения проводят в течение всего периода, когда микроорганизм высевается из органов, но не более 15-ти суток, вскрывая павших животных по мере их гибели и делая посевы из внутренних органов методом отпечатков. В случае отсутствия летальных исходов на 2 - 3, 5 - 7, 9 - 10 и 15 дни в стерильных условиях умерщвляют по три мыши, зараженные каждым последовательным разведением взвеси микроорганизмов.

При вскрытии определяют наличие внешних морфологических изменений внутренних органов (сердца, легких, печени, почек), затем проводят определение диссеминации методом отпечатков на селективную среду для исследуемого штамма. Инкубируют посевы в термостате при температуре оптимального роста изучаемых микроорганизмов.

При необходимости через 24 - 48 ч проводят идентификацию микроорганизмов путем изучения культурально-морфологических свойств колоний, микроскопии окрашенных или нативных мазков и определения биохимических свойств [6]. Для идентификации возможно также использование современных автоматических биоанализаторов или генетических методов исследования.

5.3. Токсигенность определяют путем внутрибрюшинного введения белым мышам центрифугатов культур, выращенных в лизогенном бульоне (англ. lysogeny broth, LB-бульоне) или мясо-пептонном бульоне (далее - МПБ) с учетом продолжительности роста и развития микроорганизма при оптимальной температуре роста.

Микробную взвесь центрифугируют при 5000 об/мин в течение 30 мин. Надосадочную жидкость переносят в стерильную пробирку и готовят 3 - 4 последовательные двукратные разведения физиологическим раствором. Приготовленные разведения по 0,5 мл вводят внутрибрюшинно трем белым мышам. В контроле трем мышам вводят по 0,5 мл стерильного питательного бульона, следующим трем мышам по 0,5 мл стерильного физиологического раствора.

Учет токсигенности проводят по максимальному разведению, вызывающему гибель животных в течение 7 - 14 суток после введения при наличии живых контрольных мышей. При этом считают, что токсигенность составляет 2 Dlm/мл <8>, если погибшие животные получили чистый декантат; 4 Dlm/мл, если погибли животные, получившие как чистый декантат, так и разведение 1:1; 8 Dlm/мл, если отмечена гибель животных от введения первых трех пар разведений и т.д.

<8> Dlm/мл - минимальная летальная доза, которая вызвала гибель хотя бы одной мыши при наличии живых контрольных мышей.

5.4. При оценке токсичности культуру штамма, выращенную на плотной питательной среде (мясо-пептонный агар (далее - МПА), среда Луриа-Бертани (англ. Luria Bertani Broth, далее - LB-среда)), смывают стерильным физиологическим раствором и полученную взвесь (10^{6-8} КОЕ/мл) нагревают в течение 1 ч при температуре плюс (80 +/- 2) °С.

После нагревания взвесь разрушенных клеток центрифугируют при 5000 об/мин в течение 30 мин. Надосадочную жидкость переносят в стерильную пробирку и готовят 3 последовательные двукратные разведения физиологическим раствором. Приготовленные разведения по 0,5 мл вводят внутрибрюшинно 3 белым мышам. В контрольной группе 3 мышам вводят по 0,5 мл стерильного селективного бульона, следующим 3 мышам - по 0,5 мл стерильного физиологического раствора.

Учет токсичности проводят по максимальному разведению, вызывающему гибель животных в течение 7 - 14 суток после введения при наличии живых контрольных мышей. При этом считают, что токсичность составляет 2 Dlm/мл, если погибшие животные получили чистый декантат; 4 Dlm/мл, если погибли животные, получившие как чистый декантат, так и разведение 1:1, 8 Dlm/мл, если отмечена гибель животных от введения первых трех пар разведений и т.д. <9>.

<9> Раздел 4 ОФС 1.7.2.0001.15.

5.5. Определение скорости проникновения (Lim_{bact}) микроорганизма в кровь. Методика приготовления и введения микробных взвесей и контроль эксперимента осуществляется аналогично определению DL_{50} (см. п. 5.1). Через 30 мин после внутрибрюшинного введения из хвостовой вены отбирают кровь для посева на плотную питательную среду (можно проводить посевы крови путем отрезания кончика хвоста с соблюдением правил асептики). Посевы выращивают при оптимальной температуре и продолжительности культивирования данного вида микроорганизмов, далее при необходимости проводят идентификацию микроорганизмов.

5.6. Методика определения "ферментов патогенности" бактерий и бактериальных препаратов.

ИС МЕГАНОРМ: примечание.
Текст дан в соответствии с официальным текстом документа.

5.6.1. Гиалуронидазную активность определяют по задержке образования сгустка муцина, наблюдаемой при расщеплении гиалуроновой кислоты. Для реакции используют препарат пупочных канатиков (см. приложение 4 к настоящим МУК).

Из центрифугатов суточных культур штаммов, выращенных на селективном бульоне, готовят последовательные двукратные разведения путем добавления к 1,0 мл физиологического раствора равного количества центрифугата с последующим перенесением 1,0 мл смеси в следующую пробирку.

Центрифугирование проводят при 5000 об/мин в течение 30 мин. В каждую пробирку добавляют по 1,0 мл экстракта пупочных канатиков. В контроле к физиологическому раствору и селективному бульону (в разведении 1:1) добавляют равное количество гиалуроновой кислоты (экстракта пупочных канатиков).

Все пробирки инкубируют на водяной бане при температуре плюс (37 + 2) °C в течение 20 мин. Затем после 2-часового охлаждения в холодильнике в каждую пробирку добавляют по 2 - 3 капли 2% раствора уксусной кислоты.

Реакцию учитывают по максимальному разведению, в котором отсутствовало образование облаковидного муцинового сгустка.

5.6.2. Для определения желатиназной активности из центрифугатов суточных культур микроорганизмов, полученных при центрифугировании со скоростью 5000 об/мин в течение 30 мин, готовят 3 - 4 последовательные (двукратные) разведения физиологическим раствором, к которым добавляют по 1,0 мл 10% раствора желатина, однократно расплавленного при температуре плюс (37 +/- 2) °C в течение 16 ч.

В контроле вместо центрифугата используют двукратные разведения стерильного МПБ с физиологическим раствором. Результаты учитывают после охлаждения в холодильнике в течение 1 ч. За титр желатиназы принимают наибольшее разведение, которое вызвало разжижение желатины.

5.6.3. Для определения лецитиназной активности готовят последовательные двукратные разведения центрифугатов суточных культур биотехнологических штаммов с физиологическим раствором. К 1,0 мл неразведенного центрифугата и каждого разведения добавляют по 0,2 мл эмульсии лецитовителлина (см. приложение 4 к настоящим МУ). Пробирки со смесью тщательно встряхивают и инкубируют при температуре плюс (37 + 2) °C в течение 2 ч.

В контроле вместо центрифугатов суточных культур используют разведения стерильного МПБ. После 2 ч инкубации пробирки осторожно, не встряхивая, переносят в холодильник на 2 ч. Результаты учитывают по образованию белого жирового кольца на поверхности смеси в пробирке.

5.6.4. Определение активности гемолизинов.

5.6.4.1. Определение термолабильного гемолизина. Реакцию ставят с центрифугатами суточных культур штаммов, которые предварительно выдерживают 1,5 ч при температуре плюс 20 °C в темноте разлитыми тонким слоем в чашечках Петри. Затем готовят 3 - 4 последовательные двукратные разведения центрифугатов физиологическим раствором, добавляют в каждую пробирку по 0,2 мл 5%-ой взвеси отмытых эритроцитов (см. приложение 4 к настоящим МУ). В контроле вместо центрифугатов суточных культур используют разведения стерильного МПБ. Пробирки встряхивают и инкубируют при температуре плюс (37 +/- 2) °C в течение 2 ч. Через 2 ч пробирки снова встряхивают и помещают на 4 ч в холодильник для выявления "холодного лизиса".

После этого производят учет результатов, причем за титр термолабильного гемолизина принимают максимальное разведение, которое вызвало гемолиз половины эритроцитов, определяемый визуально по диаметру осадка на дне пробирок и степени окраски надосадочной жидкости.

5.6.4.2. При определении термостабильного гемолизина реакцию ставят с центрифугатами суточных культур штаммов микроорганизмов, выращенных на МПБ. Центрифугаты прогревают на водяной бане при температуре плюс (90 +/- 5 °C) в течение 10 мин и затем готовят ряд последовательных разведений физиологическим раствором с 0,0005 М ацетатом кальция.

В каждую пробирку, содержащую по 1,0 мл соответствующего разведения центрифугата, добавляют по 0,2 мл взвеси отмытых эритроцитов, пробирки встряхивают и инкубируют при температуре плюс (37 +/- 2 °C) в течение 2 ч. В контроле вместо центрифугата суточных культур используют разведения стерильного МПБ. После инкубации пробирки повторно встряхивают и помещают на 4 ч в холодильник.

Результаты оценивают аналогично выше описанному определению термолабильного гемолизина.

5.6.5. Декарбоксилазную активность микроорганизмов определяют путем обнаружения продуктов декарбоксилирования - углекислого газа и аминов.

Образование аминов в реакции декарбоксилирования определяется путем контроля за сдвигом реакции среды в щелочную среду.

Культуру микроорганизмов для определения декарбоксилазной активности выращивают на МПА с добавлением 2% глюкозы и 0,0005% витамина B_6 (можно использовать 0,1 мл 5% ампульного раствора витамина B_6 на 1 литр среды). Через 18 - 20 ч инкубации при температуре плюс (37 + 2 °C) культуру штаммов смывают стерильным физиологическим раствором, по стандарту мутности доводят до 2 млрд. микробных тел в 1 мл. Полученную микробную взвесь по 2 капли добавляют в каждую пробирку с испытуемыми аминокислотами и средой без аминокислот (контрольные пробирки).

Все пробирки, в том числе и контрольные, заливают стерильным вазелиновым маслом и инкубируют в термостате при температуре плюс (37 +/- 2 °C) в течение 2 - 4 суток. Учет результатов производят на 1 - 2-е сутки, а при отрицательной реакции в контрольных пробирках наблюдение продолжают до 4-х суток. За счет ферментации глюкозы происходит снижение pH ниже 6,0, и среда принимает желтую окраску, особенно в контрольных пробирках.

В пробирках, в которых происходит декарбоксилирование аминокислоты с образованием амина, наблюдается фиолетовая окраска среды.

VI. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПАРАМЕТРОВ ОСТРОГО ДЕЙСТВИЯ (DL_{50}, CL_{50}) ГОТОВЫХ ФОРМ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

6.1. DL_{50} препарата определяют на крысах и мышах при однократном введении 2 - 3 доз препарата в желудок (крысам в объеме 5 мл, мышам 1 мл) и выражают в мг/кг и в КОЕ/кг веса животного.

6.2. Интратрахеальный способ введения используют при моделировании ингаляционного воздействия препарата и определении средней смертельной концентрации (далее - CL_{50}). Слегка наркотизированным диэтиловым эфиром крысам вводят интратрахеально под визуальным контролем препарат в объеме 1 - 2 мл в зависимости от массы животного.

Пересчет дозы (Д, мг/кг) в концентрацию (С, мг/м^3) проводят с помощью уравнения Флюри (1):

$$C = \frac{Д \times g}{V \times t}, \quad (1)$$

где: C - концентрация биопрепарата, мг/м^3;

Д - доза биопрепарата, мг/кг;

g - масса тела животного (0,25 кг);

V - объем дыхания крыс (0,000085 м^3/мин, по Трахтенбергу);

t - время экспозиции (240 мин).

В группы по определению DL_{50} и CL_{50} включают по 3 - 4 особи. Продолжительность наблюдения за животными после введения составляет 10 - 15 дней.

VII. ОПРЕДЕЛЕНИЕ РАЗДРАЖАЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ШТАММА МИКРООРГАНИЗМА ИЛИ ПРЕПАРАТА НА ЕГО ОСНОВЕ НА СЛИЗИСТУЮ ОБОЛОЧКУ ГЛАЗА И КОЖУ КРОЛИКА И (ИЛИ) МОРСКОЙ СВИНКИ

7.1. Для проведения эксперимента используют не менее 3-х кроликов. Для изучения раздражающего действия биотехнологических штаммов микроорганизмов и препаратов на их основе можно использовать и (или) морских свинок, которые также являются чувствительной моделью для выявления эффекта.

В конъюнктивальный мешок глаза кролика закапывают 1 каплю взвеси живой культуры микроорганизма, содержащей 10^9 КОЕ/мл, или максимально возможную концентрацию (10 - 25%) суспензии готовой формы биопрепарата. Контролем служит противоположный глаз кролика.

Наблюдения за прозрачностью роговицы и состоянием слизистой оболочки глаза проводят сразу после внесения, через 1 час и в дальнейшем ежедневно и течение 14 дней. Регистрируют появление и выраженность гиперемии и отека слизистой оболочки глаз, инъекцию сосудов склеры и состояние роговицы по балльной системе, предложенной A. Majda и K. Chuscielska <10>. Балльную оценку повреждающего действия слизистой оболочки глаза кролика проводят по наблюдаемым эффектам, приведенным в табл. 3.

<10> Методические указания к постановке исследований по изучению раздражающих свойств и обоснованию предельно допустимых концентраций избирательно действующих раздражающих веществ в воздухе рабочей зоны, утвержденные Заместителем Главного государственного санитарного врача СССР 11.08.1980 N 2196-80.

Таблица 3

Оценка раздражающего действия биотехнологического штамма микроорганизма и препарата на его основе при внесении

в конъюнктивальный мешок глаза кролика

1. Гиперемия конъюнктивы и роговицы	баллы	2. Отек век	баллы	3. Выделения	баллы
Сосуды инъецированы	1	Слабые отеки	1	Минимальное количество выделений в углу глазной щели	1
Отдельные сосуды трудно различить	2	Выраженный отек с частичным выворачиванием век	2	Выделения увлажняют веки	2
Диффузное глубокое покраснение	3	В результате отека глаз закрыт наполовину	3	Выделения увлажняют веки и шерсть, прилегающую к векам	3
Примечание: критерии оценки наблюдаемых эффектов по сумме баллов: <= 3 баллов - слабо выраженное раздражающее действие; 4 - 6 баллов - выраженное раздражающее действие; 7 - 9 баллов - резко выраженное раздражающее действие.					

7.2. Местное раздражающее действие на кожу изучают при однократной и повторных эпикутанных аппликациях взвеси микроорганизма в концентрации 10^7 КОЕ/мл или 10 - 25% нативного препарата на депилированную кожу спины кроликов площадью 7 x 8 см на 4 часа. Повторные аппликации проводят ежедневно в течение двух недель (5 раз в неделю) с последующим наблюдением в восстановительном периоде в течение 14 дней. Контролем служит контралатеральный депилированный участок кожи спины этого же кролика, на который наносится физиологический раствор в случае аппликации взвеси микроорганизма или дистиллированная вода в случае нанесения препарата. Экспериментальная группа включает 3 особи.

В ходе эксперимента оценивают состояние экспериментального участка кожи (табл. 4) и общее состояние животных (поведение, двигательная и пищевая активность, динамика массы тела).

Таблица 4

Оценка функционального состояния кожи и критерии оценки выраженности раздражающего действия при аппликации на кожу бока кролика

Интенсивность эритемы на коже	Интенсивность отека по толщине кожной складки, мм	Оценка наблюдаемого эффекта, баллы
Отсутствие эритемы	Отсутствие (0)	1
Слабая эритема (розовый фон)	Слабый (до 0,5)	2
Умеренно выраженная эритема (розово-красный фон)	Умеренный (0,5 - 1,0)	3
Выраженная эритема (красный фон)	Выраженный (1,1 - 2,0)	4
Резко выраженная эритема (ярко красный фон)	Резко выраженный (более 2,0)	5
Примечание: критерии оценки наблюдаемых эффектов по сумме баллов: 0 - отсутствие раздражающего действия; 0,2 - 2,0 - слабораздражающее действие; 2,1 - 4,0 - умеренное раздражающее действие; 4,1 - 6,0 - выраженное раздражающее действие; 6,1 - 8,0 - резко выраженное раздражающее действие.		

VIII. ПОСТАНОВКА СУБХРОНИЧЕСКОГО ЭКСПЕРИМЕНТА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛИМИТИРУЮЩЕГО КРИТЕРИЯ ВРЕДНОГО ДЕЙСТВИЯ (ЛКВД) МИКРООРГАНИЗМОВ ИЛИ ПРЕПАРАТА НА ИХ ОСНОВЕ И РАЗРАБОТКА ПДК В ВОЗДУХЕ РАБОЧЕЙ ЗОНЫ И АТМОСФЕРНОМ

ВОЗДУХЕ ГОРОДСКИХ И СЕЛЬСКИХ ПОСЕЛЕНИЙ

8.1. Разработка ПДК биотехнологических микроорганизмов и препаратов на их основе проводится в модельном эксперименте на беспородных крысах и мышах при интраназальном или ингаляционном воздействии.

При проведении субхронического эксперимента биотехнологические микроорганизмы или препараты вводят крысам интраназально в виде суспензии в физиологическом растворе с последующим пересчетом вводимой дозы на расчетно-поглощенную концентрацию клеток во вдыхаемом воздухе.

Поскольку максимальная величина ПДК в воздухе рабочей зоны (далее - $ПДК_{рз}$) ограничивается концентрацией 5 х 10^4 КОЕ/$м^3$, то при проведении эксперимента испытывается эта концентрация, на порядок выше и на порядок ниже.

Взвесь живой культуры микроорганизмов в физиологическом растворе интраназально вводят ежедневно в течение 1 месяца мышам в объеме 7 - 50 мкл и 50 - 250 мкл для крыс.

8.2. Определение расчетно-поглощенной концентрации микроорганизмов в воздухе из дозы, введенной животному, осуществляют по формуле (2):

$$К = \frac{П \times 1000}{С \times Т}, \quad (2)$$

где: К - концентрация штаммов в воздухе, КОЕ/$м^3$;

П - количество типичных колоний, выросших на чашке Петри;

1000 - коэффициент пересчета $дм^3$ в $м^3$ воздуха;

С - скорость аспирации воздуха, $дм^3$/мин;

Т - время аспирации, мин.

Величина объема вдыхаемого воздуха (V) определяется как произведение легочной вентиляции для данного вида животных (крысы - 0,65, мыши - 1,24 $см^3$/г/мин) на массу тела животного и время ингаляции (продолжительность экспозиции для крыс - 4 ч, для мышей - 2 ч).

8.3. Интраназальное введение осуществляют 1 раз в сутки в одно и то же время. При наличии специальных камер для создания микробных аэрозолей проводят ингаляционное воздействие. При этом ежедневная ингаляционная экспозиция при установлении $ПДК_{рз}$ составляет 4 часа в течение 1 месяца, для установления ПДК в атмосферном воздухе (далее - $ПДК_{ав}$) - круглосуточно в течение 1 месяца.

IX. МЕТОДЫ ОЦЕНКИ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ И ПРЕПАРАТОВ НА ИХ ОСНОВЕ ПРИ ПОВТОРНОМ ВОЗДЕЙСТВИИ

9.1. Методы оценки иммунотоксического действия биотехнологических штаммов, препаратов на их основе и определение порога этого действия.

Иммунотоксическое действие может проявляться сенсибилизацией, иммунизацией и неспецифической иммуномодуляцией <11> [7, 8].

<11> МУ 1.1.578-96 "Требования к постановке экспериментальных исследований по обоснованию предельно допустимых концентраций промышленных химических аллергенов в воздухе рабочей зоны и атмосферы", утвержденные Первым заместителем Председателя Госкомсанэпиднадзора России, Заместителем Главного государственного санитарного врача Российской Федерации 21.10.1996.

Примечание: допускается использовать другие стандартизованные современные информативные методы изучения иммунотоксического действия биотехнологических штаммов микроорганизмов.

9.1.1. Для оценки опасности развития сенсибилизации при повторном воздействии микроорганизмов тестирование животных осуществляют живой культурой (5 х 10^7 КОЕ/мл). При оценке сенсибилизирующих свойств препаратов кроме этого применяют их суспензию и растворы (взвеси) отдельных химических соединений.

С микроорганизмами, с химическими веществами, входящими в препарат и обладающими аллергенными свойствами, выполняют определение гиперчувствительности замедленного типа (далее - ГЗТ) и гиперчувствительности немедленного типа (далее - ГНТ).

Возможное сенсибилизирующее действие штаммов оценивают с помощью реакций ГЗТ на мышах, ГНТ - на крысах.

Для выявления состояния ГЗТ у опытных (сенсибилизированных) и контрольных (введение физиологического раствора) мышей тестирование проводят на 5-й день после проведения сенсибилизации путем введения разрешающей дозы антигена в полный адъювант Фрейнда (далее - ПАФ) (1:1) в объеме 10 мкл под апоневроз задней лапки. Разрешающая доза антигена, смешанная с ПАФ в соотношении 1:1, не должна вызывать у контрольных животных местной воспалительной реакции.

На следующие сутки, измеряя толщину каждой из задних лапок, определяют выраженность отека по разнице между толщиной задних лапок каждого животного, вычисляют среднегрупповые показатели отека у мышей опытной и контрольной групп и проводят статистическую обработку полученных результатов.

9.1.2. Определение реагиновой ГНТ проводят в реакции дегрануляции тучных клеток перитонеальной жидкости крыс *in vitro*.

Опытным и контрольным животным внутрибрюшинно вводят по 5,0 мл среды 199. По средней линии живота делают надрез и собирают перитонеальную жидкость в пробирку, затем пробы центифугируют при 1000 об/мин в течение 5,0 +/- 1 мин и осадок ресуспендируют в среде 199, доводя концентрацию клеток до 2 х 10^6 кл/мл. Затем 0,05 мл осажденных тучных клеток наносят на предметное стекло, предварительно окрашенное 0,03% раствором нейтрал-рот.

На каждое предметное стекло вносят по 0,05 мл взвеси живой культуры в разрешающей дозе (10^7 КОЕ/мл) и помещают препараты в термостат при температуре плюс (37 +/- 2 °С) на (15 +/- 2) мин, предварительно поместив их в эксикатор с повышенным содержанием углекислого газа. Затем через 15 мин препараты помещают в холодильник на 30 мин для прекращения процесса дегрануляции. После этого под микроскопом подсчитывают число дегранулированных (сенсибилизированных) клеток на 100 тучных клеток.

Показатель дегрануляции вычисляют путем деления процента поврежденных клеток у подопытных животных на процент таковых контрольной группы животных. При величине показателя дегрануляции выше 1,5, эффект действующего фактора рассматривается как сенсибилизирующий.

9.1.3. Для оценки иммунного статуса экспериментальных животных подсчитывают формулу крови (относительное содержание лимфоцитов, нейтрофилов, эозинофилов, моноцитов), предварительно проведя окраску мазков крови по Романовскому-Гимза, определяют содержание основных популяций Т- и В-лимфоцитов, а также вычисляют массовые коэффициенты лимфоидных органов (тимус, селезенка).

Для исследований кровь забирают у крыс путем декапитации, мазки крови готовят по стандартным методикам, лимфоциты (мононуклеарные клетки (МНК) выделяют в градиенте плотности фиккол верографина (Р = 1,089) по методу Boyum (1968).

При определении Т-лимфоцитов в планшетах 0,1 мл взвеси мононуклеарных клеток в концентрации 2 х 10^6 кл/мл смешивают с 0,1 мл 0,5% взвеси отмытых эритроцитов барана. Потом полученные пробы инкубируют при температуре плюс (37 +/- 2 °С) в течение (10 +/- 2) мин и центрифугируют в течение 2 мин при 1000 об/мин.

Затем выдерживают в холодильнике 1,0 ч при температуре плюс 4 °С, добавляют 0,05 мл 3% раствора глютарового альдегида для фиксации розеток, инкубируют при комнатной температуре 20 мин и снова центрифугируют 2 мин при 1000 об/мин. Надосадочную жидкость сливают и добавляют 0,1 мл среды 199.

Из полученного осадка готовят мазки и окрашивают метилгрюн-пиронином. Под микроскопом подсчитывают 200 лимфоцитов, вычисляя процент Т-лимфоцитов, образовавших розетки не менее чем с тремя эритроцитами.

Определение В-лимфоцитов проводится так же, как и Т-лимфоцитов. Однако вместо эритроцитов в реакцию вводят 0,1 мл 0,1% взвеси зимозан-комплемента (зимозан, инкубированный в течение 30 мин при температуре плюс (37 +/- 2 °С) с сывороткой морской свинки, разведенной 1:5 и дважды отмытый от последней в физиологическом растворе).

Подсчитывают количество лимфоцитов, фиксирующих 3 и более зерен зимозана, которое и отражает количество В-лимфоцитов.

Иммуномодулирующий эффект изучают также на крысах, иммунизированных эритроцитами барана, которые вводят внутрибрюшинно в объеме 0,5 мл и концентрации 5 х 10^8 кл/мл.

На 11-й день иммунизации оценивают иммунный ответ по титру антител гемолизинов и гемагглютининов к эритроцитам барана в сыворотке крови экспериментальных животных.

Кровь забирают путем декапитации животных и готовят сыворотку. Уровень антител определяют в реакциях гемолизиса и гемагглютинации в ряде последовательных кратных разведений сыворотки (1:2 до 1:256).

За титр исследованной сыворотки принимают ее наибольшее разведение, при которой наблюдается лизис или агглютинация эритроцитов барана. Титр антител выражают величиной $\log_2 T$, где Т - титр исследуемой сыворотки.

Для определения титра специфических антител в сыворотке крови подопытных животных проводили реакцию агглютинации со специфическим антигеном. Сначала готовят сыворотки крови опытных и контрольных животных.

Реакцию выполняют в планшетах по 10 штук пробирок 10 х 75 мм для каждой сыворотки. В 1-ю пробирку каждого ряда наливают 0,95 мл, а в остальные по 0,5 мл физиологического раствора. Затем в 1-ую пробирку добавляют 0,05 мл испытуемой сыворотки крови, перемешивают и переносят 0,5 мл во 2-ую и т.д. до последней пробирки, из которой лишние 0,5 мл выливают. После получения 2-кратного разведения сывороток (от 1:20 до 1:10250) в каждую пробирку добавляют по 0,5 мл взвеси живой культуры микроорганизма, содержащей 10^9 кл/мл, перемешивают содержимое встряхиванием, термостатируют 1 ч при температуре плюс 37 °С и центрифугируют в течение 10 мин при 1000 об/мин.

Реакцию считают положительной, если в пробирке появился осадок, дающий крупные хлопья при осторожном постукивании по нижней части пробирки. За титр агглютининов принимают наибольшее разведение сыворотки, вызывающее агглютинацию микроорганизмов.

9.1.4. Оценку выраженности иммунотоксического эффекта определяют, вычисляя достоверность различия среднегрупповых показателей подопытных и контрольных животных, а также учитывая число животных в процентах с проявлением иммунотоксического действия:

- сенсибилизирующего - появление ГЗТ и ГНТ, положительных тестов на химические аллергены, входящие в биопрепараты;
- антигенного - усиление продукции иммунных антител по сравнению с контрольным уровнем;
- неспецифического иммуномодулирующего - выход за пределы контрольных (или физиологической нормы) показателей содержания Т- и В-лимфоцитов.

За пороговую (Lim_{sens} и Lim_{imm}) концентрацию принимают ту, при действии которой у 1/3 опытных животных (30%) были обнаружены признаки одного или всех проявлений иммунотоксического действия, хотя среднегрупповые показатели существенно не отличались от таковых у контрольных животных.

За действующую концентрацию принимают ту, при воздействии которой признаки иммунотоксического действия были выявлены более чем у половины животных (50%), а среднегрупповые показатели статистически достоверно отличались от контрольных значений.

9.2. Методы изучения микробиоты кишечника и определение порога действия биотехнологических штаммов, препаратов на их основе на микробиоту кишечника животных.

9.2.1. При изучении повреждающего действия биотехнологических штаммов и препаратов на их основе в качестве чувствительной модели используется микробиота толстого кишечника. Бактериологическое исследование фекалий животных проводят в динамике до введения, в конце одномесячного эксперимента и через 2 недели после его окончания (восстановительный период - при условии, что были выявлены признаки дисбиоза по окончании эксперимента).

Отбор проб фекалий производят в стерильные пробирки, предварительно определив массу навески. Затем доливают стерильный физиологический раствор в объеме, необходимом для получения разведения образца 1:10. Для определения количества изотонического раствора массу пробы фекалий умножают на коэффициент 9.

После получения первого десятикратного разведения содержимое пробирки тщательно растирают стерильной стеклянной палочкой до однородной консистенции (при необходимости суспендируют с помощью гомогенизатора) и оставляют для отстаивания крупных частиц в течение 15 - 20 мин.

Затем 0,5 мл супернатанта переносят в пробирку с 4,5 мл стерильного изотонического раствора, тщательно перемешивают содержимое пробирки и далее производят аналогичные манипуляции для получения серии десятикратных разведений исследуемого материала (до $1:10^{10}$), используя одну стерильную пипетку (или наконечник автоматической пипетки) для каждого разведения.

Из пробирок с приготовленными разведениями вносят по 1,0 мл материала в пробирки с 9,0 мл полужидкой питательной среды типа Блаурокк для бифидобактерий и МРС-4 для лактобацилл, свежерегенерированных в течение 30 мин, а также в расплавленный столбик среды Вильсона-Блера (или ее аналог SPS-агар). Для выделения лактобактерий возможно использовать плотную питательную среду с последующим культивированием в CO_2 атмосфере. Капельным методом по 0,1 мл (100 мкл) разведенного материала вносят на соответствующие плотные питательные среды, как указано в таблице 4.

После инкубации производят подсчет выросших колоний микроорганизмов, начиная с последнего разведения, где отмечался видимый рост не менее 10 колоний, поддающихся визуальному учету.

Количество микроорганизмов в 1 г фекалий выражают в виде десятичного логарифма колониеобразующих единиц (далее - КОЕ), при этом необходимые расчеты производят по формуле (3):

$$C - \lg(N \times n \times 10), (3)$$

где: С - концентрация микроорганизма, lg КОЕ/г;

N - число колоний, формирующихся на питательной среде при посеве соответствующего разведения фекалий;

n - степень разведения фекалий;

10 - коэффициент при посеве 0,1 мл разведенных фекалий (при посеве 1,0 мл исследуемого материала этот коэффициент равен 1).

9.2.2. Питательные среды и реактивы. При проведении бактериологического исследования фекалий посев производят на набор питательных сред как коммерческих, так и приготовленных в лаборатории по стандартным прописям (см. таблицу 5), а идентификацию выделенных микроорганизмов до рода или иногда до вида проводят с использованием стандартных методик или на автоматическом биологическом анализаторе.

Таблица 5

Питательные среды и условия культивирования

Группы микроорганизмов	Питательные среды	Разведения для посева	Объем, мл	Условия культивирования
Кишечные палочки	Среда Эндо, Среда Левина и др. (плотная)	2, 3, 4, 5	0,1	37 °C, 24 ч, аэробные
Лактозонегативные, энтеробактерии				
Стафилококки	ЖСА, маннитно-солевой агар (плотная)	2, 3, 4, 5	0,1	37 °C, 48 ч, аэробные
Гемолизирующие бактерии	5% кровяной агар (плотная)	2, 3, 4, 5	0,1	37 °C, 24 - 48 ч, аэробные
Энтерококки	Энтерококк-агар (плотная)	4, 5, 6, 7	0,1	37 °C, 48 - 72 ч, аэробные
Лактобациллы	МРС-4 (полужидкая или плотная)	5, 6, 7, 8, 9	1,0	37 °C, 48 ч, микроаэрофильные (CO_2, атмосфера)
Бифидобактерии	Среда Блаурокк (полужидкая)	5, 7, 8, 9, 10	1,0	37 °C, 48 ч, аэробные (после регенерации среды)
Клостридии	Вильсон-Блер (плотная)	1, 2, 3, 4	1,0	37 °C, 24 - 48 ч, аэробные, "высокий столбик"
Грибы рода *Candida*	Среда Сабуро (плотная)	2, 3, 4, 5	0,1	37 °C, 24 - 48 ч, аэробные; далее 24 °C, 48 ч, аэробные
Примечание: допускается использование других качественных питательных сред с аналогичными характеристиками.				

Для выделения бифидобактерий и лактобацилл применяют питательные среды типа Блаурокк и МРС-4 соответственно. Для выделения энтеробактерий используют, например, лактозосодержащие коммерческие питательные среды типа Эндо, Левина, МакКонки. Для обнаружения стафилококков осуществляют посев на желточно-солевой агар (далее - ЖСА), приготовленный на основе элективного солевого агара с добавлением желточной взвеси. Допускается использование маннитно-солевого агара (среда Чапмана), который позволяет проводить первичную дифференциацию стафилококков. Для выявления гемолитической активности стафилококков и энтеробактерий применяют 5% кровяной агар, приготовленный на основе питательного агара с добавлением 5% донорской крови.

Микроскопические грибы выделяют на коммерческой питательной среде типа Сабуро желательно - с добавлением левомицетина (хлорамфеникола). Также возможно использование хромогенных питательных сред, которые позволяют дифференцировать дрожжеподобные грибы по культуральным свойствам.

Для выделения анаэробных спорообразующих бактерий (клостридий) готовят или применяют коммерческую питательную среду Вильсона-Блера (или ее аналог SPS-агар). Для выделения энтерококков используют коммерческую среду энтерококк-агар.

9.2.3. Идентификация и учет количества микроорганизмов. При учете количества энтеробактерий подсчитывают количество колоний красного цвета с характерным зеленоватым металлическим блеском или без него (для среды Эндо), грамотрицательные, оксидазоотрицательные, что позволяет отнести их к эшерихиям, а также определяют возможный рост бледно-розовых или бесцветных колоний. При этом выросшие на среде Эндо колонии красного цвета с характерным зеленоватым металлическим блеском, ферментирующие глюкозу до кислоты и газа и сбраживающие лактозу на среде Клиглера относят к типичным лактозопозитивным кишечным палочкам. Идентификацию энтеробактерий до вида (при необходимости) осуществляют с использованием стандартных методик (в том числе, с помощью коммерческих тест-систем для биохимической идентификации), а также на автоматическом биологическом анализаторе.

При определении количества стафилококков и их идентификации подсчитывают все виды колоний, выросших на ЖСА, обращая внимание на наличие радужного венчика (лецитовителлазная активность) вокруг некоторых из них (*Staphylococcus aureus*). Другими тестами для дифференциации *S. aureus* от *S. epidermidis* является определение гемолитической и плазмокоагулирующей активности стафилококков и анаэробное расщепление маннита.

Крупные или мелкие малиновые блестящие колонии или розовые с темным центром, выросшие на энтерококк-агаре после 48 ч инкубации при температуре плюс (37 +/- 2 °C), не обладающие каталазной активностью, относят к энтерококкам.

Дрожжеподобные грибы рода *Candida* выделяют на коммерческой среде Сабуро с хлорамфениколом или без АБП. Чашки с посевами в течение суток инкубируют в термостате при температуре плюс (37 +/- 2 °C), а следующие двое суток выдерживают при комнатной температуре завернутыми в бумагу. Характерные сливкообразные колонии кремового или белого цвета окрашивают по Граму и микроскопируют. При использовании хромогенных питательных сред возможна идентификация кандид до вида по культуральным свойствам (цвету, размеру колоний).

Количество лактобацилл, бифидобактерий и клостридий определяют посевом на соответствующие полужидкие или плотные питательные среды, разлитые в пробирки. При этом количество колоний микроорганизмов не подсчитывают, а определяют максимальное разведение материала (последнюю пробирку с видимым характерным ростом этих бактерий), которое и принимают за количество КОЕ, т.к. коэффициент, учитывающий посевную дозу разведенного образца для этих групп микроорганизмов, равен 1.

Бифидобактерии и лактобациллы на соответствующих элективных полужидких питательных средах образуют "колонии", напоминающие по внешнему виду "кометы", "гвоздики", "шарики" или "просяные зерна", которые можно наблюдать в толще полужидкой среды. Обнаружение в мазке из колоний со среды типа Блаурокк грамположительных слегка изогнутых палочек с разветвлением (бифуркацией) на одном или двух концах, расположенных в виде скоплений, напоминающих китайские иероглифы, свидетельствует о выделении бифидобактерий. Микроскопическое исследование колоний бактерий с полужидкой или плотной средой МРС-4 позволяет обнаружить лактобациллы (крупные грамположительные палочки, часто образующие цепочки).

Спорообразующие анаэробы (клостридии) выявляют путем посева в расплавленный столбик агаризованной среды Вильсона-Блера (или ее аналог SPS-агар). Через 24 - 48 ч инкубации определяют наличие колоний черного цвета в толще среды вне "зоны аэробиоза", обращая внимание на газообразование (разрыв столбика агара) <12>.

<12> **Примечание: допускается использовать другие стандартизованные современные методы изучения микробиоты кишечника. Идентификацию микроорганизмов можно также проводить с помощью современных биологических анализаторов.**

9.2.4. В качестве критериев оценки влияния биотехнологических штаммов и препаратов на микробиоту кишечника используют характер и степень изменения (частота встречаемости и концентрация представителей) состава кишечной микрофлоры и классифицируют как слабо, умеренно и сильно выраженное воздействие [9].

Если показатели количественного состава микробиоты фекалий в одной группе микроорганизмов в опыте отличаются от контроля более, чем на 1,5 - 2,0 lg КОЕ/г, но после прекращения воздействия изучаемого агента различия исчезают, то его повреждающее действие на микрофлору оценивается как слабо выраженное.

Если показатели количественного состава кишечной микробиоты более, чем в 2-х группах микроорганизмов в опыте отличаются от контроля более, чем на 1,5 - 2,0 lg КОЕ/г, но после прекращения воздействия изучаемого агента различия исчезают, то его повреждающее действие на микрофлору оценивается как умеренно выраженное.

Если показатели количественного состава микробиоты кишечника подопытных животных отличаются от таковых контрольных животных более, чем на 1,5 - 2,0 lg КОЕ/г хотя бы по одной из изученных групп показателей, но изменения не исчезают после восстановительного периода (через 2 недели по окончании эксперимента), то это рассматривается как сильно выраженное негативное воздействие на микрофлору кишечника.

При гигиеническом нормировании дозу или концентрацию биотехнологического штамма или препарата на его основе, вызывающую умеренно выраженное негативное воздействие, следует считать пороговым (Lim_{microb}) воздействием. Доза или концентрация, воздействие которой вызывает сильное повреждающее действие на микробиоту, следует считать действующей по этому эффекту.

9.3. Метод определения диссеминации штаммов микроорганизмов в кровь и внутренние органы.

9.3.1. Определение диссеминации штаммов микроорганизмов во внутренних органах и порога вредного действия по этому показателю осуществляют путем посева крови и отпечатков легких, сердца, печени, почек и селезенки на агаризованную селективную среду с последующим микроскопированием выросших колоний.

Исследование проводят в конце субхронического эксперимента и через 2 недели после его окончания. На каждый срок используют 3 - 4 животных. Для определения диссеминации и выявления наличия бактериемии после введения микроорганизма производят посев крови и отпечатков внутренних органов (легких, печени, селезенки, почек) на оптимальную для выявления роста агаризованную среду. Взятие материала производят стерильно. Шкурка животного обрабатывается спиртом.

9.3.2. При исследовании после внутрибрюшинного или внутрижелудочного введения вскрытие животного начинают в грудной полости, после интраназального, интратрахеального или ингаляционного воздействия - с брюшной полости.

Кровь из полости сердца отбирают стерильной пипеткой, 1 - 2 капли наносят на поверхность питательной среды и растирают стерильным шпателем ("газон"). Культивирование посевов штаммов микроорганизмов проводят при оптимальных для его выявления условиях.

9.3.3. При обнаружении диссеминации методом отпечатков параллельно с бактериологическими исследованиями проводят патоморфологические исследования внутренних органов с использованием общепринятых стандартных гистологических методов.

Кусочки органов помещают в 10% раствор формалина, осуществляют обезвоживание и заливку в парафин. Затем получают гистологические срезы, окрашивают гематоксилином и эозином. С помощью специальных для данного микроорганизма методов окраски определяют его наличие в органах, стадии развития и массивность обсеменения.

9.3.4. За пороговую (Lim_{dissem}) принимается минимальная доза или концентрация, при которой микроорганизмы высеваются по окончании субхронического эксперимента, но не высеваются в восстановительном периоде.

За действующую дозу или концентрацию принимается доза или концентрация, при которой через 2 недели после окончания эксперимента (период восстановления) также высевается микроорганизм из внутренних органов или в последних обнаруживаются патоморфологические изменения.

X. ОБОСНОВАНИЕ ПДК БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ШТАММОВ И ПРЕПАРАТОВ НА ИХ ОСНОВЕ В ВОЗДУХЕ РАБОЧЕЙ ЗОНЫ И АТМОСФЕРНОМ ВОЗДУХЕ ГОРОДСКИХ И СЕЛЬСКИХ ПОСЕЛЕНИЙ

10.1. Путем сравнения пороговых концентраций, определенных при экспериментальном изучении иммунотоксического, аллергизирующего эффектов микроорганизмов, влияния на микробиоту кишечника и диссеминации во внутренние органы, устанавливают ЛКВД, т.е. наименьшую концентрацию, вызвавшую достоверный вредный эффект.

10.2. В связи с тем, что микроорганизмы и препараты на их основе не обладают общим токсическим действием, а проявляют специфические эффекты (диссеминация, иммунотоксичность, аллергенность и нарушение аутомикрофлоры), то коэффициент запаса для установления $ПДК_{рз}$ выбирают наибольший, равный 10. Для установления $ПДК_{ав}$ также используют максимальный коэффициент запаса 10 от величины $ПДК_{рз}$.

10.3. Согласно гигиенической классификации микроорганизмов по степени опасности, биотехнологические штаммы относят к 3-ему и 4-му классу опасности [1]. Штаммы микроорганизмов или препараты на их основе с величиной $ПДК_{рз}$ более 5 x 10^3 КОЕ/$м^3$ относятся к 4-му классу опасности, с величиной $ПДК_{рз}$ менее или равной 5 x 10^3 КОЕ/$м^3$ - к 3-ему классу опасности. Соответственно, штаммы микроорганизмов или препараты на их основе с величиной $ПДК_{ав}$ более 5 x 10^2 КОЕ/$м^3$ относятся к 4-му классу опасности, с величиной $ПДК_{ав}$ менее или равной 5 x 10^2 КОЕ/$м^3$ - к 3-ему классу опасности (см. приложение 5 к настоящим МУ).

Если установлено в эксперименте, что микроорганизм или препарат на его основе обладает аллергизирующим эффектом, то рядом с величиной ПДК рекомендуется ставить "пометка А", предполагающая профилактические мероприятия, направленные на защиту органов дыхания, глаз и кожи.

10.4. Класс опасности биопрепаратов, в том числе препаратов, используемых в качестве инсектицидов, агрохимикатов в сельском хозяйстве, для рекультивации почв и очистки водных объектов, устанавливают в соответствии с документами по стандартизации <13>.

<13> Раздел 1 ГОСТ 12.1.007-76 "Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности", введенного в действие постановлением Госстандарта СССР от 10.03.1976 N 576.

Перед обоснованием гигиенических нормативов (ПДК) микроорганизмов и препаратов на их основе разрабатываются отдельным документом методические указания по методам контроля (далее - МУК) их содержания в воздухе рабочей зоны, атмосферном воздухе городских и сельских поселений <14>, воде водоемов и почве. В приложении 6 к настоящим МУ приведен рекомендуемый образец оформления МУК по контролю микроорганизмов и препаратов на их основе в воздухе. В приложении 7 к настоящим МУ приведены биотехнологические штаммы, для которых ранее были установлены ПДК, питательные среды и условия культивирования для разработки МУК в объектах окружающей среды.

<14> ГОСТ 12.1.005-88 "Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны", введенный постановлением Госстандарта СССР от 29.09.1988 N 3388 (далее - ГОСТ 12.1.005-88); ГОСТ Р 59059-2020 "Контроль загрязнений атмосферного воздуха. Термины и определения", введенный приказом Росстандарта от 30.09.2020 N 711-ст (далее - ГОСТ Р 59059-2020).

Для осуществления микробиологического контроля реального содержания нормируемого биопрепарата определяются приоритетные микроорганизмы (ведущий компонент смеси), по которым осуществляется контроль содержания препарата в объектах производственной и окружающей среды. В случае равного процентного содержания близкородственных микроорганизмов в препарате контроль проводится по сумме всех микроорганизмов.

Нормирование биотехнологических микроорганизмов и препаратов на их основе в воздухе рабочей зоны и атмосферном воздухе городских и сельских поселений по сокращенной программе.

В связи с накопленным опытом регламентирования биотехнологических штаммов микроорганизмов в воздухе рабочей зоны и атмосферном воздухе городских и сельских поселений для ряда штаммов гигиенический норматив (ПДК) можно устанавливать по аналогии, т.е. по сокращенной программе. В случае, если нормируемый селекционный штамм принадлежит к роду и виду микроорганизмов, для которых уже утверждены ПДК, то рекомендуется провести изучение патогенных свойств и лимитирующего показателя вредности (если он установлен) в эксперименте на животных.

Селекционные штаммы, полученные от общего штамма-предшественника, могут быть отнесены к одной линии. Для каждого штамма такой линии проводится исследование по сокращенной схеме только с изучением возможных патогенных свойств и могут быть применены ПДК, утвержденные для штамма-предшественника.

Штаммы ГММ, предназначенные для использования в замкнутых промышленных системах, имеют особенности гигиенического нормирования, а результаты экспериментальных проверок используют для выбора уровня защиты работающих (необходимых санитарно-технических мероприятий).

10.4.1. Штаммы ГММ, предназначенные для использования в замкнутых промышленных системах, могут быть объединены в "группу общего нормативного регулирования". К этой группе (линии штаммов) могут быть отнесены штаммы, полученные на основе общего штамма предшественника и отличающиеся от него генетическими изменениями, не влияющими на биобезопасность.

Для формирования "группы общего нормативного регулирования" (линии штаммов) необходимо наличие изученного репрезентативного штамма, внесенного в список утвержденных гигиенических нормативов (т.е. для этого штамма утверждены ПДК). Отнесение к группе общего нормативного регулирования (линии штаммов), подлежащих групповому гигиеническому нормированию, может применяться для ГММ штаммов в случае, если:

- ГММ штаммы созданы на основе общего реципиентного штамма, имеющего длительную историю безопасного использования в промышленности, и имеются доказательства, подтверждающие происхождения от общего родительского штамма (сходство геномов);

- внесенный генетический материал имеет функциональное сходство (например, замена регуляторных последовательностей или замена на аналогичные гены из других организмов);

- внесенный чужеродный генетический материал не влияет на токсигенность и патогенность штамма (например, внесение генов, кодирующих шапероны).

Отнесение к группе общего нормативного регулирования (линии штаммов), подлежащих групповому гигиеническому нормированию, осуществляется в ходе проведения экспертизы биобезопасности.

Для репрезентативного штамма группы общего нормативного регулирования проводятся экспертиза биобезопасности и экспериментальное исследование по полной токсиколого-гигиенической схеме. Для остальных штаммов ГММ, относимых к группе общего нормативного регулирования, рекомендуется проводить экспертизу биобезопасности и экспериментальное исследование по сокращенной схеме только с изучением возможных патогенных свойств.

10.4.2. Микробиологические препараты, имеющие постоянный (фиксированный) состав штаммов микроорганизмов, подлежат гигиеническому изучению как одно вещество с установлением пороговых концентраций по общетоксическому в случае наличия в препарате химических добавок, не имеющих гигиенических нормативов, и по специфическим эффектам. На этой основе устанавливают лимитирующий критерий вредного действия и класс опасности препарата. Нормирование монопрепаратов (в состав которого входит один штамм микроорганизма) можно проводить по сокращенной программе, когда препарат содержит родственный микроорганизм (один и тот же вид и род), для которого уже установлен гигиенический норматив. В этом случае необходимо провести изучение патогенных свойств и лимитирующего показателя вредности (если он установлен) в эксперименте на животных. Если препарат содержит консорциум микроорганизмов, возможна разработка ПДК по сокращенной программе (патогенность и отдельные специфические эффекты) при условии утвержденных гигиенических нормативов для родственных микроорганизмов, входящих в этот препарат.

XI. ОБОСНОВАНИЕ ГИГИЕНИЧЕСКИХ НОРМАТИВОВ (ПДК) БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ И ПРЕПАРАТОВ НА ИХ ОСНОВЕ В ВОДЕ ВОДНЫХ ОБЪЕКТОВ

11.1. Нормирование биотехнологических микроорганизмов и препаратов на их основе в воде водоемов включает следующие этапы.

11.2. Изучение патогенных свойств нового штамма по критериям, приведенным выше (см. главы IV и V). В биотехнологиях могут быть использованы только непатогенные микроорганизмы и соответственно препараты на основе непатогенных микроорганизмов.

11.3. Установление пороговой (Lim_{subch}) и максимально недействующей дозы (далее - МНД) в субхроническом эксперименте (30 дней) при внутрижелудочном введении животным (крысы) с учетом общего токсического действия и специфических эффектов (иммунотоксического, сенсибилизирующего и влияния на микробиоту кишечника) и дальнейшим пересчетом на минимально недействующую концентрацию (далее - МНК) <15>.

<15> МУ 2.1.5.720-98 "Обоснование гигиенических нормативов химических веществ в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования", утвержденные Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 15.10.1998 (далее - МУ 2.1.5.720-98).

МНК рассчитывается из величины МНД с учетом среднего веса человека и суточного водопотребления, включающего питьевую воду и используемую для приготовления пищи по формуле (4):

$$\text{МНК} = \frac{\text{МНД} \times \text{М}}{\text{V}} = \text{МНД} \times \text{К}, \quad (4)$$

где: МНК - минимально недействующая концентрация, мг/л;

МНД - максимально недействующая доза, мг/кг;

М - средняя масса взрослого человека, кг;

V - объем суточного водопотребления, л;

К - обобщенный коэффициент пересчета МНК по МНД.

Для Российской Федерации с учетом районов с жарким климатом, в которых водопотребление реализуется за счет воды и чая и составляет в сутки не менее 3 л, а также принятого среднего веса взрослого человека на уровне 75 кг обобщенный коэффициент пересчета МНК по МНД (К) составит 25, а расчет МНК будет осуществляться по преобразованной формуле (5):

МНК = МНД x 25, (5)

где: МНК - минимально недействующая концентрация, мг/л;

МНД - максимально недействующая доза, мг/кг.

Поскольку в эксперименте максимально недействующая доза (МНД) выражается числом микробных клеток на животное, то в последнюю формулу следует внести поправку с учетом средней массы крысы (0,25 кг). В этом случае пересчет МНД в МНК будет проводиться по формуле (6):

МНК = МНД x 100, (6)

где: МНК - минимально недействующая концентрация, КОЕ/л;

МНД - максимально недействующая доза, мг/кг.

11.3. Оценка воздействия биотехнологического штамма микроорганизма и готового препарата на его основе на микробиоценоз и процессы самоочищения воды водоема и определения пороговых концентраций по влиянию на эти показатели. Пороговой (Lim) является та концентрация, которая вызывает любые достоверные отрицательные изменения нескольких (более 1) показателей по сравнению с контролем. Концентрация, приводящая к изменению в те же сроки наблюдения любого из показателей, является максимально недействующей (подпороговой) концентрацией [10].

11.4. Лимитирующий показатель вредности для воды водных объектов определяется как наименьшая концентрация из сравнения МНК, установленной в субхроническом эксперименте на животных, с пороговыми концентрациями при исследовании микробиоты и процессов самоочищения водоема. Она и принимается в качестве ПДК для штаммов микроорганизмов или препарата на их основе в воде водоемов и выражается в КОЕ/л и г/л соответственно.

11.5. Максимальная величина ПДК биотехнологических штаммов микроорганизмов и препаратов на их основе для воды водоемов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования составляет 5 x 10^4 КОЕ/л.

XII. ПОКАЗАТЕЛИ И ПОСТАНОВКА ЭКСПЕРИМЕНТА ДЛЯ ОЦЕНКИ ВОЗДЕЙСТВИЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ И ПРЕПАРАТОВ НА ИХ ОСНОВЕ НА МИКРОБИОЦЕНОЗ И ПРОЦЕССЫ САМООЧИЩЕНИЯ ВОДЫ ВОДНЫХ ОБЪЕКТОВ

12.1. Для характеристики состояния микробиоценоза и процессов самоочищения водоемов при разработке ПДК биотехнологических микроорганизмов и биопрепаратов на их основе используют наиболее информативные санитарно-микробиологические и химические показатели <16>:

- общее микробное число (далее - ОМЧ);
- число обобщенных колиформных бактерий (далее - ОКБ);
- количество и сроки выживания патогенных энтеробактерий - *S. typhimurium* в воде;
- pH воды;
- растворенный кислород, перманганатная окисляемость;
- полное биохимическое потребление кислорода (далее - $БПК_{полное}$ или $БПК_{20}$). При необходимости используют перевод $БПК_{полное}$ в $БПК_5$ по формуле (7):

$$БПК_{полн} = БПК_5 \times 1,33; (7)$$

- азот аммиака, азот нитритов, азот нитратов.

<16> Глава III СанПиН 1.2.3685-21 "Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания", утвержденных постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 28.01.2021 N 2 (зарегистрировано Минюстом России 29.01.2021, регистрационный N 62296), с изменениями, внесенными постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 30.12.2022 N 24 (зарегистрировано Минюстом России 09.03.2023, регистрационный N 72558).

12.2. Для модельных экспериментов используют воду водоемов, не загрязненную в результате промышленного, сельскохозяйственного и бытового использования. Воду из водоемов отбирают в соответствии с документами по стандартизации <17>.

<17> ГОСТ Р 59024-2020 "Вода. Общие требования к отбору проб", введенный приказом Госстандарта от 10.09.2020 N 640-ст.

Воду перед экспериментом фильтруют через стерильный фильтр, разливают в стеклянные емкости с открытой поверхностью в объеме 20 л в каждом сосуде, исследуют по вышеперечисленным бактериологическим и химическим показателям.

В опытные сосуды с водой вносят взвесь суточной культуры исследуемого штамма микроорганизма, выращенного на плотной питательной среде, обеспечивающей оптимальный рост данного штамма в концентрациях 10^3, 10^4, 10^5 КОЕ/л. Воду в сосудах тщательно перемешивают.

В качестве тест-микроорганизмов в воду опыта и контроля вносят взвеси: *E. coli* - 10^6 КОЕ/л и *S. typhimurium* - 10^4 КОЕ/л, т.е. в количествах, близких к естественному фекальному загрязнению поверхностных водоемов. За исходное число микроорганизмов в модельных водоемах принимается не расчетное, а фактическое, определяемое путем посева воды сразу же после внесения их в воду.

12.3. Модельные водоемы содержат при стандартных показателях микроклимата - температура плюс 20 - 22 °C, влажность 40 - 60%, скорость движения воздуха 0,2 м/сек, при естественном освещении 300 лк. Определение санитарно-микробиологических показателей в модельных водоемах проводят в течение 1 месяца на 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20 и 30 сутки от начала эксперимента.

Посев воды из аквариумов проводят общепринятыми методами на элективные питательные среды для каждого вида микроорганизмов. Перед каждым отбором проб для анализа вода в емкостях тщательно перемешивается.

12.4. Эксперимент проводится в двух вариантах с использованием 13 емкостей (12 опытных сосудов, 1 контрольный сосуд). В первом варианте опытов в каждый из 3 сосудов однократно вносится микробная взвесь биотехнологического штамма в одной из концентраций (10^3, 10^4, 10^5 КОЕ/л), а в другие 3 сосуда - готовый биопрепарат, содержащий аналогичное количество клеток данного штамма.

Во втором варианте опытов вода каждого из 3 сосудов заражается одной из 3 концентраций штамма 4 - 5 раз с интервалом 5 - 6 дней, вода других 3 сосудов - готовым препаратом также 4 - 5 раз с интервалом 5 - 6 дней.

Контролем является сосуд с водой, не содержащий культур биотехнологического штамма и готового препарата. Для получения достоверных результатов выполняют не менее трех серий опытов.

12.5. Параллельно с бактериологическими исследованиями воды проводится изучение $БПК_{20}$ и химических показателей (pH воды, растворенный кислород, перманганатная окисляемость, азот аммиака, азот нитритов, азот нитратов). Отбор проб воды из экспериментальных водоемов осуществляется также на 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20 и 30 сутки.

XIII. МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ, ИДЕНТИФИКАЦИИ И КОЛИЧЕСТВЕННОГО УЧЕТА САНИТАРНО-ПОКАЗАТЕЛЬНЫХ И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ В ВОДЕ МОДЕЛЬНОГО ВОДОЕМА

13.1. Характеристика санитарно-микробиологических и химических показателей при разработке ПДК штаммов биотехнологических микроорганизмов и препаратов на их основе осуществляется в соответствии с документами по стандартизации <18>, а также методическими документами <19>.

<18> ГОСТ Р 58556-2019 "Оценка качества воды водных объектов с экологических позиций", введенный приказом Росстандарта от 27.09.2019 N 787-ст.

<19> МУ 2.1.5.720-98.

При содержании бактерий более 20 КОЕ/мл целесообразно применять прямые методы посева на поверхность подсушенных питательных сред 0,1 - 0,2 см^3 (мл) пробы с последующим растиранием шпателем до полного впитывания жидкости. При более низких количествах микроорганизмов применяют методы концентрирования бактерий с помощью мембранных фильтров или титрационные методы.

Выделение, идентификация и количественный учет микроорганизмов-продуцентов в модельном эксперименте осуществляется для контроля сроков выживания биотехнологических микроорганизмов и для расчета общей численности микроорганизмов, а также отдельных групп сапрофитных микроорганизмов в воде. С этой целью проводится посев на элективные питательные среды согласно паспортным данным биотехнологического штамма с последующей инкубацией в термостате и его идентификацией [6].

13.2. Определение ОМЧ.

ОМЧ определяют на МПА методом заливки с последующей инкубацией посевов при температуре плюс (37 +/- 1 °C) в течение 24 ч, при температуре плюс (20 +/- 2 °C) - в течение 72 ч.

13.3. Определение отдельных групп водных сапрофитных микроорганизмов проводится для оценки изменения структуры микробных ценозов, тесно связанных с процессами самоочищения воды.

Осуществляются посевы воды из контрольного водоема и водоемов, загрязненных культурами биотехнологических штаммов на МПА и кровяной агар. Кровяной агар используется для культивирования прихотливых микроорганизмов (например, стрептококков, стафилококков, листерий, клостридий), а также их первичной дифференциации по типу гемолиза. Посевы инкубируют в термостате с последующей идентификацией до родов и видов.

13.4. Определение санитарно-показательных микроорганизмов.

Число ОКБ, *S. typhimurium* определяют на элективных плотных питательных средах: среда Эндо для ОКБ и висмут-сульфитный агар - для *S. typhimurium* с последующей инкубацией в термостате при температуре плюс (37 + 1 °C) в течение (24 + 2) ч и идентификацией этих микроорганизмов <20>.

<20> **Примечание: допускается применение аналогичных питательных сред с лучшими характеристиками.**

13.5. Определение химических показателей, характеризующих процессы самоочищения водоема.

13.5.1. Определение водородного показателя воды (pH). Реакцию воды определяют тот час же при взятии пробы, т.к. с течением времени она может измениться из кислой или нейтральной в слабощелочную вследствие выделения из воды угольной кислоты. Концентрацию водородных ионов определяют с помощью потенциометра.

13.5.2. Определение перманганатной окисляемости в воде осуществляют в соответствии с документами по стандартизации <21>.

<21> ГОСТ Р 55684-2013 "Вода питьевая. Метод определения перманганатной окисляемости", введенный приказом Росстандарта от 31.10.2013 N 1320-ст.

Сущность метода заключается в окислении органических и неорганических веществ, присутствующих в пробе анализируемой воды, заданным количеством перманганата калия в сернокислой среде в процессе нагревания, последующем добавлении оксалат иона в виде раствора оксалата натрия (способ А) или раствора щавелевой кислоты (способ Б) и титровании его избытка раствором перманганата калия.

Значение перманганатной окисляемости в пересчете на атомарный кислород определяется по количеству пошедшего на титрование перманганата калия.

Титрационный метод определения перманганатной окисляемости в диапазоне значений (в пересчете на атомарный кислород): от 0,5 до 10,0 мг О/дм^3 - способ А; от 0,25 до 100 мг О/дм^3 - способ Б, характеризует допустимое состояние процессов самоочищения водоема.

13.5.3. Определение растворенного кислорода в воде осуществляют в соответствии с методическими документами <22>. Проводится в несколько этапов. Сначала в анализируемую пробу добавляют соль Mn (IV), которая в щелочной среде реагирует с растворенным кислородом с образованием нерастворимого дегидратированного гидроксида Mn (IV).

<22> РД 52.24.419-2019 "Массовая концентрация растворенного кислорода в водах. Методика измерений йодометрическим методом", введенная приказом Росгидромета от 11.09.2019 N 439.

Таким образом проводится фиксация, т.е. количественное связывание кислорода в пробе. Фиксация РК, являющегося неустойчивым компонентом в составе воды, должна быть проведена сразу после отбора пробы. Далее к пробе добавляют раствор сильной кислоты (соляной или серной) для растворения осадка и раствор йодида калия, в результате чего протекает химическая реакция с образованием свободного йода. Затем свободный йод титруют раствором тиосульфата натрия в присутствии крахмала, который добавляют для лучшего определения момента окончания титрования.

О завершении титрования судят по исчезновению синей окраски (обесцвечиванию) раствора в точке эквивалентности. Количество раствора тиосульфата натрия, израсходованное на титрование, пропорционально концентрации растворенного кислорода. В ходе анализа определяют концентрацию РК (в мг/л) и степень насыщения им воды (в %) по отношению к равновесному содержанию при данных температуре и атмосферном давлении.

13.5.4. Определение БПК$_{полное}$ осуществляют в соответствии с методическими документами <23>. За БПК$_{полное}$ принимается окончательная минерализация биохимически окисляющих органических веществ до начала нитрификации (появление нитритов в исследуемой пробе в концентрации 0,1 мг/дм^3).

<23> ПНД Ф 14.1:2:3:4.123-97 "Методика выполнения измерений биохимической потребности в кислороде после n дней инкубации (БПКполн.) в поверхностных пресных, подземных (грунтовых), питьевых, сточных и очищенных сточных водах", утвержденная Госкомэкологией России 21.03.1997.

Метод заключается в разбавлении исследуемой пробы различными объемами специально приготовленной разбавляющей воды. Уменьшение содержания кислорода за определенный период инкубации в темном месте, при контрольной температуре в полностью заполненной и герметически закрытой пробкой склянке, обусловлено протекающими в аэробных условиях бактериальными биохимическими процессами, которые приводят к минерализации органического вещества.

После измерения концентрации растворенного кислорода до и после инкубационного периода рассчитывается масса кислорода, поглощенного из 1 дм^3 воды. Величина уменьшения кислорода в склянке, умноженная на степень разведения, дает численную величину БПК, выраженную в мг O_2/дм^3.

13.5.5. Определение азотсодержащих веществ осуществляется в соответствии с документами по стандартизации <24>.

<24> ГОСТ 33045-2014 "Вода. Методы определения азотсодержащих веществ", введенный приказом Росстандарта от 11.11.2014 N 1535-ст.

Метод определения аммонийного азота основан на способности аммиака и ионов аммония взаимодействовать с реактивом Несслера с образованием окрашенного в желто-коричневый цвет соединения и последующим фотометрическим определением и расчетом массовой концентрации определяемых компонентов в пробе исследуемой воды.

При массовой концентрации аммонийного азота от 0,1 до 3,0 мг/дм^3 разбавление водой не требуется, а при более высоких концентрациях пробу разбавляют, но не более чем в 100 раз.

13.5.6. Метод определения азота нитритов заключается во взаимодействии нитритов в исследуемой пробе воды с сульфаниловой кислотой в присутствии 1-нафтиламина с образованием красно-фиолетового окрашенного соединения и последующим фотометрическим определением и расчетом массовой концентрации нитритов в пробе исследуемой воды.

При массовой концентрации азота нитритов от 0,003 до 0,3 мг/дм^3 разбавление водой не требуется, а при более высоких концентрациях пробу разбавляют, но не более чем в 100 раз.

13.5.7. Сущность метода определения азота нитратов заключается во взаимодействии нитратов с фенолдисульфоновой кислотой с образованием нитропроизводных фенола, которые со щелочами образуют окрашенные в желтый цвет соединения, и последующим фотометрическим определением и расчетом массовой концентрации азота нитратов в пробе исследуемой воды.

XIV. ПОКАЗАТЕЛИ И ПОСТАНОВКА ЭКСПЕРИМЕНТА ДЛЯ РЕГЛАМЕНТАЦИИ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ И ПРЕПАРАТОВ НА ИХ ОСНОВЕ В ПОЧВЕ

14.1. Разработку ПДК в почве целесообразно проводить прежде всего для наиболее изученных биотехнологических штаммов микроорганизмов и биопрепаратов на их основе, имеющих утвержденные ПДК$_{ав}$, а также в воде водных объектов.

Гигиеническое обоснование ПДК микроорганизмов в почве базируется на 3-х основных показателях вредности:

- миграционный водный;
- миграционный воздушный;
- общесанитарный.

Водно-миграционный показатель характеризует способность микроорганизма переходить из почвы в подземные грунтовые воды и поверхностные водоисточники, где важную роль играет не только скорость передвижения по порам, но и сорбция их на твердой фазе почвы [11].

Воздушно-миграционный показатель характеризует способность микроорганизма переходить из почвы в атмосферный воздух. Эти показатели дают представления о возможном загрязнении как воды водоемов, так и атмосферного воздуха, величина их не должна превышать установленных ПДК изучаемых микроорганизмов в указанных средах.

Миграционные процессы биотехнологических микроорганизмов изучены недостаточно, поэтому эти показатели вредности не могут быть в полной мере использованы для гигиенического нормирования биотехнологических штаммов микроорганизмов и биопрепаратов на их основе в почве.

Ключевыми моментами при регламентации их содержания в почве являются воздействие биотехнологических микроорганизмов на самоочищение почвы от органических веществ, на почвенный биоценоз и сроки выживания в почве патогенных и санитарно-показательных микроорганизмов и определяются с помощью учета показателей, перечисленных в пунктах 14.2. - 14.3.

14.2. Показатели, характеризующие почвенный микробиоценоз и процессы самоочищения почвы от органических веществ:

- ОМЧ;
- общее число и процент почвенных бацилл;
- количество почвенных грибов и актиномицетов;
- почвенные дрожжи;
- концентрация азота аммония и нитратов;
- динамика разрушения клетчатки.

14.3. Показатели, характеризующие самоочищение почвы от патогенных и санитарно-показательных микроорганизмов:

- сроки выживания в почве тест-микроорганизмов: *E. coli* и *S. typhimurium*;
- токсичность почвы к тест-микроорганизмам *E. coli* и *S. typhimurium*.

14.4. Постановка модельного эксперимента.

14.4.1. Лабораторные исследования проводятся на естественном типе почвы, преобладающем в данной местности (крае, области, республике), наиболее легкого механического состава (песчаные, супесчаные) с содержанием гумуса не выше 2% и определенным значением pH.

Отбирается почва пахотного слоя (0 - 25 см) с заведомо незагрязненных участков. Для опытов берется 2,0 - 3,0 кг подготовленной почвы на сосуд, что является оптимальным объемом.

Экспериментальная почва по бактериологическим показателям должна соответствовать "чистым" почвам и быть нетоксичной в отношении тест-микроорганизмов *E. coli*, *S. typhimurium* и биотехнологического микроорганизма.

Для этого в стерильную чашку Петри вносится 10,0 г перемешанной и просеянной почвы и ровным слоем распределяется на половину дна чашки.

Чашки с почвой заливают 1,5% агаром в количестве около 10,0 мл с таким расчетом, чтобы он покрыл слой почвы. После его застывания в чашки вносится питательный агар также в количестве 10,0 мл, адекватный тест-микроорганизмам. Чашки высушивают под бактерицидными лампами в течение 30 мин. Затем производится посев индикаторных штаммов микроорганизмов. Посевы инкубируют в зависимости от вида индикаторного микроорганизма. Колонии идентифицируются по "форме роста". Кроме того, из каждой серии посевов с нескольких чашек снимают колонии и производят их идентификацию.

14.4.2. В основу исследований положена методика "почвенных закладок". Экспериментальная почва обсеменяется культурами тест-микроорганизмов из расчета: *E. coli* - 10^6 КОЕ/г, *S. typhimurium* - 10^4 КОЕ/г почвы, т.е. в количествах, близких к естественному фекальному загрязнению почв. В почву опыта в одни сосуды вносятся культуры изучаемых микроорганизмов в концентрациях: 10^3, 10^4 и 10^5 КОЕ/г почвы, в другие - готовые препараты на основе данного штамма. Контрольная почва не заражается биотехнологическим штаммом или готовым препаратом.

С целью получения достоверных данных каждый вариант эксперимента дублируется три раза. В одном варианте опытов загрязнение почвы микроорганизмами и готовым препаратом проводится однократно, а в другом варианте - 4 - 5 раз с интервалами в 10 - 15 суток. Всего используют 13 сосудов, считая с контрольным: 3 сосуда для 3 концентраций биотехнологического штамма, 3 сосуда для 3 концентраций готовой формы препарата - для однократного внесения и столько же сосудов - для многократного внесения.

Контролем служит сосуд, в почву которого не вносится культура биотехнологического штамма и готового препарата на его основе.

Способ внесения определяется путями поступления в почву биотехнологических штаммов и препаратов на их основе в почву в естественных условиях. Если существует опасность загрязнения микроорганизмами почвы с осадками, выбросами промышленных предприятий или в сельском и лесном хозяйстве целенаправленно используются микробные инсектициды, то культура биотехнологического микроорганизма вносится в виде раствора при помощи пульверизатора в целый объем почвы из расчета на 1 кг абсолютно сухой почвы.

Если промышленный микроорганизм поступает в почву со сточными водами, то его вносят в почву с поливной водой, в которой содержится определенная концентрация этого штамма. При внесении штамма в почву в виде растворов количество влаги не должно превышать расчетного количества жидкости на данную навеску абсолютно сухой почвы, обеспечивающей влажность 60% от полной влагоемкости.

Для оптимизации процессов нитрификации в почву добавляется болтушка из лиственного перегноя в количестве 1% от веса почвы. Кроме того, на 1000 г почвы вносят сернокислый аммоний - 235,3 мг; калий фосфорнокислый однозамещенный - 78,4 мг; сернокислый магний - 39,0 мг и мел - 1000 мг. Затем почву в количествах по 5,0 кг помещают в лабораторные сосуды.

14.4.3. Для определения активности целлюлозоразрушающих бактерий в почву опыта и контроля закладывают полоски ткани из чистого льна. Сухой вес каждой полоски равен 2,0 г. В процессе эксперимента льняные полоски извлекают из почвы, отмывают в воде от частичек почвы, высушивают и измеряют вес. Затем вычисляют достоверность разницы сухого веса льняных полосок в опыте и в контроле. Выемка из почвы полосок проводится каждые 10 суток.

В лабораторных экспериментах с целью поддержания постоянной влажности (60% от водной влагоемкости) производят регулярный контроль за влажностью почвы и поливку всех сосудов дехлорированной стерильной водопроводной водой.

Наблюдение закладок осуществляется путем отбора проб почвы и исследования на общую численность сапрофитных микроорганизмов, общее число и процент почвенных бацилл, количество грибов и актиномицетов, количество тест-микроорганизмов *E. coli*, *S. typhimurium*, концентрацию азота аммония и нитратов, динамику распада клетчатки и токсичность почвы к тест-микроорганизмам. Для анализа условий проведения лабораторных экспериментов определяют влажность, pH и температуру почвы.

В варианте эксперимента с однократным загрязнением почвы биотехнологическими микроорганизмами пробы почвы отбирают в день заражения, через 1, 3, 5, 10, 15, 20, 30 суток (в первый месяц). Начиная со второго месяца, анализ делают через каждые 14 дней. Исследования проводят до 120 суток, в зависимости от сроков выживания в почве изучаемых микроорганизмов. Если изучаемые микроорганизмы перестали высеваться раньше, то эксперимент можно прекратить.

В эксперименте с многократным загрязнением почвы пробы отбирают в день заражения почвы и дважды между внесениями в почву культуры изучаемого штамма.

XV. МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ, ИДЕНТИФИКАЦИИ И КОЛИЧЕСТВЕННОГО УЧЕТА САНИТАРНО-ПОКАЗАТЕЛЬНЫХ И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ В МОДЕЛЬНОМ ПОЧВЕННОМ ЭКСПЕРИМЕНТЕ

15.1. Посев почвенных разведений производится преимущественно поверхностно на элективные питательные среды, указанные в паспортных данных на штамм, с последующей инкубацией в термостате и идентификацией биотехнологического микроорганизма.

Для получения сравнимых результатов следует производить пересчет количества определяемых микроорганизмов и концентрации азота аммония и нитратов на единицу массы абсолютно сухой почвы.

15.2. Общая численность почвенных сапрофитных микроорганизмов (ОМЧ).

ОМЧ учитывается путем посева разведений почвенной суспензии на поверхность почвенного агара, инкубации в термостате при температуре плюс (30 +/- 2 °C) в течение 72 ч и подсчета выросших колоний, исключая количество колоний штамма микроорганизма.

15.3. Общее число почвенных бацилл и санитарно-показательных микроорганизмов определяется путем посева прогретых при температуре плюс 80 °C в течение 15 мин разведений почвенной суспензии на поверхность МПА. Термостатирование и учет проводится аналогично учету общей численности почвенных сапрофитных микроорганизмов.

Выделение и идентификация *E. coli* и *S. typhimurium* осуществляется путем прямого поверхностного посева разведений почвенной суспензии на поверхность агара Эндо для *E. coli* и висмут-сульфитного агара для *S. typhimurium* с последующей инкубацией в термостате при температуре плюс (37 +/- 1 °C) в течение (24 +/- 3) ч и идентификацией этих микроорганизмов.

15.4. Определение концентрации микроскопических грибов и актиномицетов осуществляется путем посева разведений почвенной суспензии поверхностным способом на агаризованные среды.

Для учета актиномицетов используется крахмало-аммиачный агар или агар Ваксмана, для учета грибов - сусло-агар или минеральная среда Чапека.

При изучении влияния на микробиоценоз микроорганизмов, являющихся грибами или актиномицетами, необходимо дифференцировать почвенные сапрофиты от биотехнологических штаммов.

15.5. Почвенные дрожжи выделяются путем поверхностного посева разведений почвенной суспензии на агар Сабуро. При выделении мезофильных дрожжей инкубацию производят при температуре плюс (28 +/- 2 °C) 4 - 5 дней, при выделении психрофильных форм - при температуре плюс 5 °C не менее 14 суток.

15.6. Определение в почве азота аммония начинают с приготовления почвенной вытяжки.

Навеску воздушно-сухой почвы 20,0 г помещают в колбу емкостью 250 мл, туда же наливают 100 мл дистиллированной воды. Содержимое колбы взбалтывают 3 мин, затем фильтруют через складчатый толстый фильтр. Раствор отфильтровывают полностью.

Определенный объем вытяжки помещают в мерную колбу емкостью 50,0 мл, добавляют 2,0 мл раствора сегнетовой соли, приливают 40 мл дистиллированной воды. Смесь перемешивают взбалтыванием, добавляют 2 мл реактива Несслера, снова перемешивают и объем доводят дистиллированной водой до 50,0 мл. Раствор приобретает чисто желтую окраску, светлого оттенка. Если раствор приобретает оранжевый или красноватый цвет, анализ повторяют с меньшим объемом вытяжки.

Метод основан на получении оранжевого комплекса NH_2HgOI (йодистого меркураммония) при взаимодействии реактива Несслера (щелочной раствор K_2HgI_4) с солями аммония. Интенсивность полученной окраски пропорциональна содержанию аммония в растворе.

Оптическую плотность раствора определяют с помощью фотоколориметра. Содержание в растворе NH_4 устанавливают по калибровочной кривой образцовых растворов.

15.7. Определение в почве азота нитратов дисульфофеноловым методом (по Грандваль-Ляжу). Для определения азота нитритов в почве отбирают 25,0 мл прозрачного фильтрата почвенной вытяжки (способ приготовления вытяжки см. выше) в фарфоровую чашку и выпаривают на водяной бане досуха. Это количество соответствует 5,0 г почвы.

К сухому остатку приливают 1,0 мл дисульфофеноловой кислоты, тщательно распределяют по чашке стеклянной палочкой и оставляют для взаимодействия на 20 мин. Затем приливают 15,0 мл дистиллированной воды, перемешивают и содержимое нейтрализуют 20% раствором едкого натра до появления устойчивой желтой окраски.

Окрашенный раствор переносят в колбу на 50,0 мл, доводят до метки и колориметрируют на ФЭКе при синем светофильтре. Содержание нитратов в почве вычисляют по калибровочной кривой образцовых растворов <25>.

<25> **Примечание: определение химических показателей в воде водоемов и почве допускается проводить методами с аналогичными или лучшими характеристиками.**

15.8. Состояние процессов самоочищения, биоценоза почвы зависит от целого ряда условий: типов почвы, климатических и биогеохимических особенностей почвы, вида землепользования. В связи с этим нет единых количественных критериев оценки, характеризующих микробиоценоз и процессы самоочищения почвы.

15.9. Действие микроорганизмов следует учитывать по достоверному изменению вышеуказанных показателей во времени в эксперименте относительно контрольных образцов, не содержащих биотехнологических микроорганизмов.

К отрицательным изменениям почвы под влиянием изучаемой концентрации биотехнологического микроорганизма, а также биопрепарата на его основе относятся:

- торможение процессов самоочищения почвы от органических веществ, от кишечных палочек, патогенных микроорганизмов *S. typhimurium*;
- угнетение численности сапрофитных бактерий, азотфиксации и накопления азота нитратов;
- негативным действием биотехнологического штамма или микробиологического препарата является также стимуляция почвенных грибов, в результате чего происходит разбалансировка комплекса почвенных микроорганизмов в сторону доминирования в нем этой группы микроорганизмов, являющихся активными токсинообразователями.

15.10. В результате проведенных экспериментальных исследований устанавливается пороговая (Lim) - минимально действующая концентрация изучаемого микроорганизма или препарата. Пороговой является та концентрация, которая вызывает любые достоверные отрицательные изменения нескольких (более 1) изученных показателей.

Концентрация, приводящая к изменению в те же сроки наблюдения любого одного из изученных показателей, является максимально недействующей (подпороговой) концентрацией, она принимается за ПДК изучаемого микроорганизма и (или) препарата в почве и выражается в КОЕ/кг абсолютно сухой почвы.

XVI. СРЕДСТВА ИЗМЕРЕНИЙ, ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ УСТРОЙСТВА, РЕАКТИВЫ, ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ И МАТЕРИАЛЫ

16.1. При выполнении измерений применяют следующие средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы, питательные среды и материалы, приведенные в таблицах 6 - 8.

Таблица 6

Средства измерений

Наименование средств измерения	Обозначение и наименование документов, технические характеристики
Барометр-анероид	Диапазоном измерения атмосферного давления 5 - 790 мм рт. ст., предел допустимой погрешности +/- 2,5 мм рт. ст.
Весы лабораторные, аналитические	Наибольший предел взвешивания 110 г, предел допустимой погрешности +/- 0,2 мг, ГОСТ Р 53228-2008
Колбы мерные лабораторные конические КН-2-50-34, КН-2-250-50, КН-2-500-50, КН-2-1000-50	ГОСТ 1770-74
Пипетки градуированные 2-го класса точности Цилиндры мерные	Вместимостью 1,0; 2,0, 5,0, 10 см^3, ГОСТ 29227-91 2-го класса точности вместимостью 25 и 50 см^3, ГОСТ 1770-74
Термометр лабораторный шкальный Аспирационный бактериологический пробоотборник	Пределы измерения от 0 до плюс 55 °C Скорость до 40 л/мин, расход регулируется по ротаметру, диаметр чашек Петри 90, 100, 120 мм, определение в диапазоне 25 - 10000 КОЕ/м^3
Примечание: допускается использование средств измерения с аналогичными или лучшими характеристиками.	

Таблица 7

Вспомогательные устройства и материалы

Наименование вспомогательных устройств и материалов	Обозначение и наименование документов, технические характеристики
Шкаф сушильный стерилизационный	Поддерживающий температуру плюс (160 +/- 5 °C)
Термостаты	Поддерживающие рабочую температуру плюс (37 +/- 2°C)
Центрифуга лабораторная, 5000 об/мин	-
Автоклав электрический	ГОСТ 9586-75
Стерилизаторы паровые медицинские	ГОСТ 31598-2012, ГОСТ Р ЕН 13060-2011
Дистиллятор	Производительность 5 л/ч, масса 6 кг
Облучатель бактерицидный настенный, рециркулятор	Мощность УФ-лампы 15 - 30 Вт
Холодильник бытовой	ГОСТ 26678-85

Микроскоп биологический с иммерсионной системой	-
Лупа с увеличением х10	ГОСТ 25706-83
Пробирки типов П1, П2	ГОСТ 25336-82
Спиртовки лабораторные стеклянные	ГОСТ 23932-90
Чашки биологические (Петри) стеклянные	ГОСТ 23932-90
Воронки конусные	диаметром 40 - 45 мм, ГОСТ 25336-82
Груша резиновая	ГОСТ 33499-2015
Петля бактериологическая	-
Марля медицинская	ГОСТ 9412-2021
ИС МЕГАНОРМ: примечание. В официальном тексте документа, видимо, допущена опечатка: имеется в виду ГОСТ 5556-2022, а не ГОСТ	
Вата медицинская гигроскопическая	ГОСТ 25556-2022
Бумага фильтровальная лабораторная	ГОСТ 12026-76
Примечание: допускается использование вспомогательных устройств и материалов с аналогичными или лучшими техническими характеристиками.	

Таблица 8

Реактивы и питательные среды

Наименование реактивов и питательных сред	Обозначение и наименование документов, технические характеристики
Агар микробиологический	ГОСТ 17206-96
МПБ	ГОСТ 20730-75
Вода дистиллированная	ГОСТ Р 58144-2018
Спирт этиловый технический	ГОСТ 17299-78
Спирт этиловый ректификованный	ГОСТ 5962-2013
Фиккол	-
ПАФ	-
Физиологический раствор, 0,9%	ГОСТ 4233-77
Ацетат кальция $Ca(C_2H_3O_2)_2$	ГОСТ Р 54537-2011
Хлороформ $CHCl_3$, ЧДА	ГОСТ 20015-88
Уксусная кислота, CH_3COOH ($C_2H_4O_2$) ледяная хч	ГОСТ 61-75
Глюкоза $C_6H_{12}O_6$	ГОСТ 975-88
Витамин B_6, $C_8H_{11}NO_3$ пиридоксин	-
Глютаровый альдегид $C_5H_8O_2$	-

Среда 199	-
Метилгрюн, малахитовый зеленый	-
Пиронин, $C_{17}H_{19}ClN_2O$	-
Краситель Гимза (Азур-эозин по Романовскому)	-
Нейтрал-рот нейтральный красный $C_{15}H_{17}ClN_4$	-
Примечание: допускается использование других питательных сред, диагностических препаратов и реактивов с аналогичными характеристиками. **Селективные среды для конкретных биотехнологических штаммов микроорганизмов разрабатываются и предоставляются для проведения исследований их владельцами, поскольку состав селективной питательной среды обеспечивает максимальный синтез целевого продукта.**	

Приложение 1
к МУ 4.2.4071-24

ХАРАКТЕРИСТИКИ ВНЕСЕННОГО ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

1. Для получения разрешения на промышленное использование штамма ГММ вносимый генетический материал должен иметь следующие характеристики <26>:

1.1. Лимитированный размер. Внесенный генетический материал должен состоять из следующих компонентов:

- структурного гена(ов);

- регуляторной последовательности, позволяющей экспрессировать только структурный ген(ы);

- ассоциированных нуклеотидных последовательностей, необходимых для генно-инженерных манипуляций, стабильности и экспрессии вносимого генетического материала, включая линкеры, гомополимеры, адаптеры, транспозоны, сайты рестрикционных ферментов.

ИС МЕГАНОРМ: примечание.
В официальном тексте документа, видимо, допущена опечатка: имеется в виду Федеральный закон N 86-ФЗ

<26> Федеральный закон от 05.06.1996 N 86-ФЗ.

2. Характеристика генетического материала должна содержать следующую информацию:

2.1. Нуклеотидная последовательность внесенного генетического материала;

2.2. Функции всех продуктов, синтез которых контролируется или определяется (кодируется) внесенным генетическим материалом;

2.3. Функции последовательностей, которые участвуют в регуляции экспрессии внесенного генетического материала;

2.4. Отсутствие ассоциированных нуклеотидных последовательностей, за исключением перечисленных в пункте 1.1.

3. Отсутствие определенных последовательностей. Такое свойство внесенной последовательности должно означать, что в нее и, соответственно, в реципиент не должны попасть последовательности, кодирующие опасные токсины или их функционально значимые фрагменты <27>.

<27> Постановление Правительства Российской Федерации от 16.07.2022 N 1287 "Об утверждении списка микроорганизмов, токсинов, оборудования и технологий, подлежащих экспортному контролю".

4. Низкая способность к мобильности. Это требование необходимо для обеспечения низкой частоты переноса генетического материала в другие микроорганизмы из окружающей среды. Такой перенос возможен за счет конъюгации, трансдукции или трансформации, при этом генетический материал может попасть в различные популяции микроорганизмов, свойства которых уже невозможно будет предсказать. Допустимая частота переноса ДНК меньше 10^{-8}.

Использование перечисленных критериев для внесенного генетического материала позволяет минимизировать риск от попадания в реципиент не охарактеризованного генетического материала и от непрогнозируемых последствий генетической модификации.

Заявитель предоставляет описание проведенных генно-инженерных манипуляций, полную нуклеотидную последовательность внесенного генетического материала с указанием всех элементов и их функций.

Приложение 2
к МУ 4.2.4071-24

ГРУППЫ ШТАММОВ-РЕЦИПИЕНТОВ И КРИТЕРИИ ОТНЕСЕНИЯ К НИМ

I. Все штаммы-реципиенты разделены на три группы:

1. Штамм-реципиент входит в список рекомендованных реципиентов (первая группа) <28>.

<28> Примечание: список рекомендованных реципиентов (первая группа) - *Acetobacter aceti*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium acetobutylicum*, *Escherichia coli K-12*, *Penicillium roqueforti*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces uvarum*, *Trichoderma reesei* QM6a, *Bacillus amyloliquefaciens subsp. Amyloliquefaciens*.

2. Штамм реципиент не входит в список рекомендованных реципиентов, но является хорошо изученным и имеет длительную историю безопасного применения в промышленности (вторая группа) (см. таблицу 9).

Таблица 9

Рекомендуемый список микроорганизмов, имеющих длительную историю безопасного применения (2-ая группа) <29>

<29> Европейская комиссия по безопасности продуктов питания (англ. European Food Safety Authority, EFSA) - efsa.onlinelibrary.wiley.com'do:/epdf/10.2903/j.efsa.2015.4331 (в свободном доступе).

Вид микроорганизма			**ограничения (**
Грамположительные неспорообразующие бактерии			
Bifidobacterium adolescentis	*Bifidobacterium bifidum*	*Bifidobacterium longum*	-
Bifidobacterium animalis	*Bifidobacterium breve*		
Carnobacterium divergens			-
Corynebacterium glutamicum			производства
Lactobacillus acidophilus	*Lactobacillus delbrueckii*	*Lactobacillus panis*	-
Lactobacillus animalis	*Lactobacillus diolivorans*	*Lactobacillus collinoicies*	
Lactobacillus amylolyticus	*Lactobacillus farciminis*	*Lactobacillus paracasei*	
Lactobacillus amylovorus	*Lactobacillus fermentum*	*Lactobacillus paraplantarum*	
Lactobacillus alimentarius	*Lactobacillus gallinarum*	*Lactobacillus pentosus*	
Lactobacillus aviaries	*Lactobacillus gasseri*	*Lactobacillus plantarun*	
Lactobacillus brevis	*Lactobacillus helveticus*	*Lactobacillus pontis*	
Lactobacillus buchneri	*Lactobacillus hilgardii*	*Lactobacillus reuteri*	
Lactobacillus casei	*Lactobacillus johnsonii*	*Lactobacillus rhamnosus*	
Lactobacillus cellobiosus	*Lactobacillus kefiranofaciens*	*Lactobacillus sakei*	
Lactobacillus coryniformis	*Lactobacillus kefiri*	*Lactobacillus salivarius*	

Lactobacillus crispatus *Lactobacillus curvatus*	*Lactobacillus mucosae*	*Lactobacillus sanfranciscensis*	
Lactococcus lactis			-
Leuconostoc citreum *Leuconostoc pseudomesenteroides*	*Leuconostoc lactis*	*Leuconostoc mesenteroides*	-
Microbacterium imperiale			производства
Oenococcus oeni			-
Pasteurianishizawae			производства п борьбы с цист
Pediococcus acidilactics *Pediococcus dextrinicus*		*Pediococcus parvulus* *Pediococcus pentosaceus*	-
Propionibacterium freudenreichii	*Propionibacterium acidipropionici*		-
Streptococcus thermophilus			-
Бациллы грамположительные спорообразующие			
Bacillus atrophaeus *Bacillus clausii* *Bacillus coaguians* *Bacillus flexus*	*Bacillus fusiformis* *Bacillus lentus* *Bacillus megaterium* *Bacillus mojavensis*	*Bacillus pumilus* *Bacillus smithii* *Bacillus vailismortis*	<*
Geobacillus stearothermophilus			
Грамотрицательные бактерии			
Gluconobacter oxydans			производства
Xanthomonas campestris			производства кса
Дрожжи			
Candida cylinaracea			производства
Debaryomyces hansenii			-
Hansenias porauvarum			-
Kluyveromyces lactis		*Kluyveromyces marxianus*	-
Komagataella pastoris *Lindner ajadinii*			производства

Ogataea angusta		
Saccharomyces bayanus	*Saccharomyces pastorianus*	<*
Schizosaccharomyces pombe		-
Wickerhamomyces anomalus		<*
Xanthophyllomyces dendrorhous (imperfect form Phaffiarhodozyma)		-

Примечание:
<*> - только в случае отсутствия токсической активности и приобретенных генов устойчивости к АБП;
<**> - только в случае отсутствия резистентности к противогрибковым средствам, используемым для ле инфекций в случаях, когда жизнеспособные клетки добавляют в корм или кормовую цепь.

3. Штамм-реципиент не входит в список рекомендованных реципиентов, данные о биобезопасности промышленного применения отсутствуют (третья группа).

Заявитель предоставляет данные о таксономической идентификации штамма-реципиента, достоверность которых оценивается БРЦ при проведении экспертизы.

II. Критерии отнесения к рекомендованным штаммам-реципиентам. Для внесения в список рекомендованных реципиентов штамм-кандидат должен отвечать следующим критериям:

- первый критерий. Должны быть предоставлены данные, позволяющие провести однозначную идентификацию и классификацию микроорганизма. Также должна быть доступна полная информация о генотипических и фенотипических характеристиках микроорганизма;
- второй критерий. Должна быть предоставлена информация о взаимоотношениях исследуемого микроорганизма с близкородственными микроорганизмами, которые обладают потенциальным негативным эффектом на здоровье человека и окружающую среду;
- третий критерий предполагает наличие длительной истории безопасного коммерческого использования микроорганизма;
- четвертый критерий требует отсутствия отрицательных результатов исследований по выявлению потенциально опасного воздействия микроорганизма на здоровье человека и окружающую среду;
- пятый критерий предполагает низкую выживаемость микроорганизма в окружающей среде;
- шестой критерий предполагает наличие опыта использования микроорганизма для создания биобезопасных штаммов ГММ на его основе.

Только одновременное выполнение всех критериев делает возможным сделать заключение о безопасности микроорганизма и внесение в список рекомендованных реципиентов. Внесение микроорганизмов в перечень рекомендуемых реципиентов осуществляется уполномоченной государственной экспертной организацией с учетом зарубежного опыта.

Приложение 3
к МУ 4.2.4071-24

КРИТЕРИИ ПРОВЕРКИ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ШТАММА ГММ <30>

<30> Таблица 1 Методики производства молекулярно-генетического исследования генно-инженерно-модифицированных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения, используемых для разведения и (или) выращивания на территории Российской Федерации, утвержденной приказом Минсельхоза России от 30.10.2020 N 655.

N	Характеристика	Описание характеристики	Критерий	Методы оценки кри
1.	Специфичность ПЦР	Способность ПЦР тест-системы выявлять только целевую ДНК	ПЦР тест-система должна выявлять целевую ДНК. ПЦР тест-система не должна давать ложноположительных результатов, в том числе выявлять ДНК близкородственных и неродственных биологических видов в 100% проводимых исследований	Для оценки специфичнс используют контрольны образцов. В состав пане входят образцы, содерж целевую ДНК и не содер целевую ДНК (например образцы других биологи видов, в том числе близкородственных)

2.	Чувствительность ПЦР	Наименьшее содержание копий целевой ДНК, которое может быть определено с использованием данной ПЦР методики, в первую очередь зависит от свойств используемых праймеров и зондов	Чувствительность должна быть не ниже 100 копий целевой ДНК, например, плазмидной, в одной ПЦР реакции	Проводят исследования десятикратных разведе целевой плазмидной ДН известной концентрацие повторах каждое. Опред максимальное разведен котором ДНК воспроизв выявляется (в двух пов

Приложение 4
к МУ 4.2.4071-24

ПОЛУЧЕНИЕ ДОСТОВЕРНЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ И ВОСПРОИЗВОДИМЫХ МЕТОДИК ПОДГОТОВКИ ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Получение достоверных и воспроизводимых микробиологических результатов исследования зависит от следующих факторов [12, 13]:

- техническое выполнение лабораторной работы непосредственно зависит от предшествующего обучения, специализации, личного опыта и условий работы;
- оптимальные факторы окружающей среды - приспособленное для лабораторной работы помещение, рациональное освещение (300 - 500 лк) или эффективная вентиляция (1 - 2 м/с), оптимальная температура (плюс 18 - 20 °C), уровень шума 40 дБ;
- методы и время отбора проб для исследования, подготовка образца к исследованию;
- качество реагентов, химикатов, лабораторной посуды, тест-штаммов, искусственных питательных сред и лабораторных животных - все это влияет на достоверность результатов исследования;
- ключевым аспектом получения достоверных результатов и воспроизводимости микробиологического анализа является высокое и стабильное качество питательных сред. Для статистически достоверного результата в качестве итогового количества колоний рекомендуется использовать среднее значение КОЕ на трех чашках Петри, количество КОЕ на которых не должно превышать 250 <31>.

<31> ГОСТ Р 70393-2022 "Изделия медицинские для диагностики *in vitro*. Приготовление, производство, хранение и испытания питательных сред", введенный приказом Росстандарта от 13.10.2022 N 1132-ст; ГОСТ ISO 11133-2016 "Приготовление, производство, хранение и определение рабочих характеристик питательных сред", введенный приказом Росстандарта от 07.11.2016 N 1605-ст.

2. Методика приготовления взвеси и количественный учет штаммов биотехнологических микроорганизмов для исследований.

При проведении санитарно-гигиенических исследований штаммов микроорганизмов необходимо использовать свежую культуру микроорганизма, выращенную до стадии, которая согласно техническим условиям (ТУ) и техническому регламенту конкретного производства, попадает в воздух производственной и окружающей среды.

Селективные питательные среды, используемые для выращивания и получения синтеза максимального количества целевого продукта, подбираются владельцем штамма (биопрепарата) и предоставляются в необходимом количестве исполнителям, которые будут проводить санитарно-гигиенические исследования.

Оптимальные (селективные) питательные среды изложены в паспорте изучаемого биотехнологического микроорганизма, который предоставляет депонирующая организация.

При приготовлении взвеси культуры микроорганизма, выращенного на плотной селективной среде, производят смыв с поверхности и дезинтегрируют. Определяют оптическую плотность полученной микробной суспензии, после чего ее раститровывают последовательными десятикратными разведениями физиологическим раствором до предполагаемой концентрации 100 - 1000 клеток в 1 мл.

Из 2 - 3 последних разведений производят высев по 0,1 мл каждого разведения на 3 чашки Петри. По истечении рекомендованных в соответствии с указаниями в паспорте штамма сроков термостатирования (время и температура) по числу выросших колоний штамма (учету подлежат чашки с ростом от 10 до 250 колоний) рассчитывается концентрация КОЕ в "исходной" суспензии по формуле (8):

$$C = \frac{K}{V} N; \quad N = \frac{T}{n}, \qquad (8)$$

где: C - число живых микроорганизмов в 1 мл "исходной" взвеси;

K - кратность разведения высеваемой микробной взвеси;

V - объем единичной посевной дозы (в мл);

N - среднее число колоний в серии единичных высевов одинаковых разведений культуры;

T - общее число колоний, найденных во всех высевах данного разведения;

n - число высевов одинаковых разведений на чашки с плотной питательной средой.

Для определения концентрации в суспензии дрожжевых клеток, спор бактерий и грибов можно использовать камеру Горяева или другие счетные камеры.

Для учета жизнеспособных клеток взвесь микроорганизмов разводят 1:1 краской следующего состава: 0,1% раствор эозина, приготовленный на 1,7% растворе хлорида натрия, смешивают в соотношении 1:1 с 0,1% раствором трипанового синего, приготовленным на дистиллированной воде.

Приготовленной таким образом взвесью заполняют счетную камеру и в соответствии с инструкцией для используемой камеры ведут подсчет клеток, отдельно учитывая число окрашенных (мертвых) клеток. Определяют процент живых клеток. Учитывая двойное разведение суспензии при окрашивании, в числитель соответствующей формулы для расчета количества клеток вводится коэффициент 2.

3. Приготовление отмытых эритроцитов для определения гемолизинов.

Эритроциты человека отмывают с помощью центрифугирования при 2500 об/мин в физиологическом растворе с 0,005 М ацетата кальция до получения прозрачной надосадочной жидкости. Затем эритроциты разводят физиологическим раствором с 0,005 М ацетата кальция в соотношении 1:20.

4. Приготовление экстракта пупочных канатиков.

Пупочные канатики разрезают по ходу кровеносных сосудов и отмывают в дистиллированной воде. Отмытые пупочные канатики помещают на 4 ч в ацетон для их обезвоживания, просушивают и измельчают.

К 500 г измельченных пупочных канатиков, помещенных в колбу с притертой пробкой, добавляют 1000 мл стерильной дистиллированной воды и 15,0 мл хлороформа <32>. Смесь тщательно перемешивают при энергичном встряхивании и сутки выдерживают при температуре плюс 4 °C.

<32> Примечание: хлороформ (триметилметан) 2 класс опасности, $ПДК_{рз}$ 10/5 мг/м^3, $ПДК_{ав}$ 0,1/0,003 мг/м^3, обладает раздражающим действием. При работе с реактивом рекомендуется использовать вытяжной шкаф, а также средства защиты глаз и кожи.

Затем производят отжимание кашицы через стерильное полотенце. Остаток кашицы на полотенце промывают 1000 мл дистиллированной воды и полученную жидкость центрифугируют 30 мин при 3000 об/мин.

Прозрачную вязкую жидкость, полученную после центрифугирования, доводят до pH = 9,0, к ней добавляют 15,0 мл хлороформа и в опыт берут образцы препарата, обладающие большей вязкостью, которые при разведении в 4 раза еще дают муциновый сгусток при добавлении 2 - 3 капель 2% раствора уксусной кислоты.

Приготовленный таким образом экстракт пупочных канатиков сохраняется в холодильнике не более 4-х недель.

5. Приготовление лецитовителлина для определения лецитиназы.

Куриное яйцо отмывают щеткой с мылом, обрабатывают спиртом, стерильным скальпелем раскалывают скорлупу и содержимое выливают в стерильную чашку Петри.

В стерильных условиях 10 мл желтка с помощью пипетки смешивают с 190 мл физиологического раствора, содержащего 0,005 М ацетата кальция, и прогревают при температуре плюс 56 °C в течение 30 мин. Эмульсию желтка фильтруют через стерильный бумажный фильтр до получения прозрачной, слегка опалесцирующей жидкости. Готовый препарат хранят в холодильнике не более 2-х недель.

Приложение 5
к МУ 4.2.4071-24

ГИГИЕНИЧЕСКАЯ КЛАССИФИКАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ ПО СТЕПЕНИ ОПАСНОСТИ ВОЗДЕЙСТВИЯ НА ОРГАНИЗМ [1]

Показатели	1 класс	2 класс	3 класс	4 класс
Показатели патогенности:				
- вирулентность, КОЕ/жив	<= 10^6		> 10^6	
- Lim_{bact}, КОЕ/жив	< 10^7		> 10^7	

- диссеминация в кровь и органы, дни	Диссеминация 1 - 30 дней	Персистирование 1 - 15 дней	
ПЛК$_{рз}$, КОЕ/м^3	Не рекомендуются к использованию в биотехнологической промышленности	<= 5 x 10^3	> 5 x 10^3
ПДК$_{ав}$, КОЕ/м^3		< 5 x 10^2	> 5 x 10^2
Lim$_{sch\ sens}$, КОЕ/м^3		<= 5 x 10^4	> 5 x 10^4
Lim$_{sch\ imin}$, КОЕ/м^3		<= 5 x 10^4	> 5 x 10^4
Lim$_{sch\ dis}$, КОЕ/м^3		<= 5 x 10^4	> 5 x 10^4

Примечание:
1 класс - особо опасные инфекции;
2 класс - опасные микроорганизмы, возбудители других инфекционных заболеваний;
3 класс - умеренно опасные микроорганизмы;
4 класс - малоопасные.

Приложение 6
к МУ 4.2.4071-24
(рекомендуемый образец)

**Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование
Российской Федерации**

**4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ
И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ**

МЕТОД МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ИЗМЕРЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ШТАММА МИКРООРГАНИЗМА (МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА) В ВОЗДУХЕ РАБОЧЕЙ ЗОНЫ И В АТМОСФЕРНОМ ВОЗДУХЕ ГОРОДСКИХ И СЕЛЬСКИХ ПОСЕЛЕНИЙ

Методические указания по методам контроля

МУК 4.2.-XX

Москва 20XX

Метод микробиологического измерения концентрации микроорганизма (микробиологического препарата) в воздухе рабочей зоны и в атмосферном воздухе городских и сельских поселений. МУК 4.2. -XX

1. Разработаны - организация (автор).

2. Утверждены руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации "__" ________ 20XX г.

3. Введены впервые

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
"_" _______ 202X г.
Дата введения "__" ________ 202X г.

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ
И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

МЕТОД МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ИЗМЕРЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ШТАММА МИКРООРГАНИЗМА (МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА) В ВОЗДУХЕ РАБОЧЕЙ ЗОНЫ И В АТМОСФЕРНОМ ВОЗДУХЕ ГОРОДСКИХ И СЕЛЬСКИХ ПОСЕЛЕНИЙ

Методические указания по методам контроля

МУК 4.2.XXXX-20XX

I. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

1.1. Настоящие методические указания по методам контроля (далее - МУК) описывают порядок применения метода микробиологического количественного анализа концентрации штамма микроорганизма (препарата) (далее - микроорганизм, препарат) в воздухе рабочей зоны и в атмосферном воздухе городских и сельских поселений в диапазоне концентраций от XX до XXXX клеток в 1 м^3 воздуха.

1.2. МУК носят рекомендательный характер.

II. БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММА МИКРООРГАНИЗМА (МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА)

2.1. Штамм планируется использовать для создания.

2.2. Способ получения штамма (биопрепарата).

2.3. Определение штамма, таксономическое положение и депонирование.

2.4. Морфологическое описание колоний и клеток микроорганизма.

2.5. Описание оптимальной плотной питательной среды для выращивания и размножения штамма.

2.6. Штамм микроорганизма относится к микроорганизмам, непатогенным для человека <33>. Работа со штаммом не требует специальных мер предосторожности.

<33> Приложение 1 СанПиН 3.3686-21 "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней", утвержденных постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 28.01.2021 N 4 (зарегистрировано Минюстом России 15.02.2021, регистрационный N 62500), с изменениями, внесенными постановлениями Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 11.02.2022 N 5 (зарегистрировано Минюстом России 01.03.2022, регистрационный N 67587), от 25.05.2022 N 16 (зарегистрировано Минюстом России 21.06.2022, регистрационный N 68934) (далее - СанПиН 3.3686-21).

III. МЕТОДЫ ИЗМЕРЕНИЙ

3.1. Метод основан на аспирации из воздуха колониеобразующих клеток микроорганизма и подсчета количества выросших колоний по типичным культурально-морфологическим признакам штамма на селективной агаризованной среде. При наличии в воздухе высоких концентраций штамма микробиологического препарата возможно использование седиментационного метода Коха.

IV. СРЕДСТВА ИЗМЕРЕНИЙ, ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ УСТРОЙСТВА, РЕАКТИВЫ, ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ И МАТЕРИАЛЫ

4.1. При выполнении измерений применяют следующие средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы, питательные среды и материалы, приведенные в таблицах 4.1 - 4.3.

Таблица 4.1

Средства измерений

Наименование средств измерения	Обозначение и наименование документов, технические характеристики
Барометр-анероид	Диапазоном измерения атмосферного давления 5 - 790 мм рт. ст., предел допустимой погрешности +/- 2,5 мм рт. ст.
Весы лабораторные, аналитические	Наибольший предел взвешивания 110 г, предел допустимой погрешности +/- 0,2 мг, ГОСТ Р 53228-2008
Колбы мерные лабораторные конические КН 2-50-34, КН-2-250-50, КН-2-500-50, КН-2-1000-50	ГОСТ 1770-74
Пипетки градуированные 2-го класса точности	Вместимостью 1,0, 2,0, 5,0, 10 $см^3$, ГОСТ 29227-91
Цилиндры мерные	2-го класса точности вместимостью 25 и 50 $см^3$, ГОСТ 1770-74
Термометр лабораторный шкальный	Пределы измерения от 0 до плюс 55 °C
Аспирационный бактериологический пробоотборник	Скорость до 40 л/мин, расход регулируется по ротаметру, диаметр чашек Петри 90, 100, 120 мм, определение в диапазоне 25 - 10000 $КОЕ/м^3$
Примечание: допускается использование средств измерения с аналогичными или лучшими характеристиками.	

Таблица 4.2

Вспомогательные устройства и материалы

Наименование вспомогательных устройств и материалов	Обозначение и наименование документов, технические характеристики
Шкаф сушильный стерилизационный	Поддерживающий температуру плюс (160 +/- 5 °C)
Термостаты	Поддерживающие рабочую температуру плюс (28 +/- 2 °C) и плюс (37 +/- 2 °C)
Автоклав электрический	ГОСТ 9586-75
Стерилизаторы паровые медицинские	ГОСТ Р ЕН 13060-2011, ГОСТ 31598-2012
Дистиллятор	Производительность 5 л/ч, масса 6 кг
Облучатель бактерицидный настенный	Мощность УФ-лампы 15 - 30 Вт
Холодильник бытовой	ГОСТ 26678-85
Микроскоп биологический с иммерсионной системой	-
Лупа с увеличением x10	ГОСТ 25706-83
Пробирки типов П1, П2	ГОСТ 25336-82
Спиртовки лабораторные стеклянные	ГОСТ 23932-90
Чашки биологические (Петри) или одноразовые из полимерных материалов	ГОСТ 23932-90
Воронки конусные	Диаметром 40 - 45 мм, ГОСТ 25336-82
Груша резиновая	ГОСТ 33499-2015
Петля бактериологическая	
Марля медицинская	ГОСТ 9412-2021
ИС МЕГАНОРМ: примечание. В официальном тексте документа, видимо, допущена опечатка: имеется в виду ГОСТ 5556-2022, а не ГОСТ	
Вата медицинская гигроскопическая	ГОСТ 25556-2022
Бумага фильтровальная лабораторная	ГОСТ 12026-76
Примечание: допускается использование вспомогательных устройств и материалов с аналогичными или лучшими техническими характеристиками.	

Таблица 4.3

Реактивы и питательные среды

Наименование реактивов и питательных сред	Обозначение и наименование документов, технические характеристики
Агар микробиологический	ГОСТ 17206-96
ИС МЕГАНОРМ: примечание. В официальном тексте документа, видимо, допущена опечатка: имеется в виду ГОСТ 6709-72, а не ГОСТ 67	

Вода дистиллированная	ГОСТ 6709-90
ГРМ-агар	
Спирт этиловый технический	ГОСТ 17299-78
Спирт этиловый ректификованный	ГОСТ 5962-2013
Сусло пивное	ГОСТ 34979-2023
Примечание: допускается использование других питательных сред, диагностических препаратов и реактивов с аналогичными характеристиками.	

V. ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ

5.1. Выполнение измерений концентрации клеток микроорганизма в воздухе рабочей зоны и в атмосферном воздухе осуществляют в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями <34>, методическими документами <35>, а также документами по стандартизации <36>.

<34> Глава IV СанПиН 3.3686-21.

<35> МУК 4.2.1054-01 "Измерение концентраций микроорганизмов-продуцентов, бактериальных препаратов и их компонентов в атмосферном воздухе населенных мест", утвержденные Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации, Первым заместителем Министра здравоохранения Российской Федерации 06.06.2001 (далее - МУК 4.2.1054-01).

<36> ГОСТ 12.1.005-88.

5.2. При выполнении измерений необходимо соблюдать требования по электробезопасности при работе с электроустановками <37> и инструкции по эксплуатации прибора.

<37> ГОСТ 12.1.019-2017 "Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты", введенный приказом Росстандарта от 07.11.2018 N 941-ст; ГОСТ 12.1.009-2017 "Электробезопасность. Термины и определения", введенный приказом Росстандарта от 07.11.2018 N 942-ст.

5.3. Все виды работ с реактивами проводят только в вытяжном шкафу при работающей вентиляции, работа с биологическим материалом осуществляется в боксе, оборудованным бактерицидными лампами.

5.4. К выполнению измерений и обработке их результатов допускают лиц с высшим или средним специальным образованием, прошедших соответствующую подготовку и имеющих навыки работы в области микробиологических исследований.

VI. УСЛОВИЯ ИЗМЕРЕНИЙ

6.1. Приготовление сред, подготовку к анализу проводят в следующих условиях:

температура воздуха - плюс (20 +/- 5) °C;

атмосферное давление - (760 +/- 20) мм рт. ст.;

влажность воздуха - не более 80%.

VII. ПРИГОТОВЛЕНИЕ АГАРИЗОВАННОЙ СРЕДЫ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Описание способа приготовления.

7.2. Приготовленную среду разливают в стерильные колбы по 200 - 250 см^3 и автоклавируют при температуре плюс 120 °C в течение 15 - 20 мин.

7.3. Готовую среду хранят в защищенных от света условиях при температуре не выше 8 °C в течение не более 10 дней.

VIII. ПРОВЕДЕНИЕ ИЗМЕРЕНИЯ

8.1. Отбор проб воздуха. Отбор проб воздуха проводят в соответствии с документами по стандартизации <38>.

<38> ГОСТ Р 8.563-2009 "Государственная система обеспечения единства измерений. Методики (методы) измерений", введенный приказом Ростехрегулирования от 15.12.2009 N 1253-ст.

Для этого воздух аспирируют при помощи пробоотборника на поверхность плотной питательной среды в соответствии с технической документацией (инструкцией) на прибор. Время аспирации и объем отбираемого воздуха зависит от предполагаемой концентрации микроорганизма (таблица 8.1).

Таблица 8.1

Время и скорость отбора проб воздуха

Предполагаемая концентрация микроорганизма в воздухе, кл/м^3	Время отбора проб воздуха, мин			Количество чашек Петри на 1 пробу воздуха
	10 дм^3/мин	20 дм^3/мин	30 дм^3/мин	
50	-	-	10	1
500	-	-	5	1
5000	-	1	-	Последовательно 2 чашки по 30 сек
50000	1	-	-	Последовательно 4 чашки по 15 сек

Аппарат перед каждым отбором пробы воздуха тщательно протирают 96° этиловым спиртом. Особенно тщательно обрабатывают поверхность подвижного диска и внутреннюю стенку прибора; наружную и внутреннюю стенку крышки. На подвижный диск устанавливают подготовленную чашку Петри со средой, одновременно снимая с нее крышку. Прибор закрывают. Соприкосновение крышки прибора со средой недопустимо (количество питательной среды в чашки вносят в соответствии с инструкцией к прибору). После отбора пробы воздуха и остановки диска прибор открывают, быстро снимают чашку Петри и закрывают крышкой от данной чашки. На дне чашки Петри стеклографом отмечают точку контроля, время аспирации и дату отбора пробы.

8.2. Выполнение анализа.

8.2.1. При выполнении анализа воздуха стерильную агаризованную среду расплавляют, остужают до температуры плюс (50 - 60) °С и разливают в чашки Петри.

8.2.2. Контроль чистоты розлива проводят в соответствии с методическими документами <39>. Для этого чашки с застывшей средой помещают в термостат при температуре плюс 37 °С не менее чем на 18 ч. Проросшие чашки бракуют, стерильные чашки используют для контроля воздуха. Разлитую в чашки питательную среду хранят при температуре плюс (2 - 8) °С не более 10 дней.

<39> Подпункт 7.1.1 МУК 4.2.2316-08 "Методы контроля бактериологических питательных сред", утвержденных руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 18.01.2008 (далее МУК 4.2.2316-08).

ИС МЕГАНОРМ: примечание.
Текст дан в соответствии с официальным текстом документа.

8.2.3. После отбора проб воздуха чашки Петри культивируют при оптимальной температуре плюс (XX +/- 2) °С. Через 2 - 4 суток производят подсчет выросших колоний по культурально-морфологическим признакам. При необходимости, идентификация до вида может быть проведена на основе секвенирования генов 16S рРНК или с применением других современных методов.

8.2.4. Ростовые свойства используемой питательной среды должны быть проверены до проведения анализа воздуха в соответствии с ростовыми свойствами питательных сред <40>. Для этого коллекционные штаммы микробиологического препарата высеваются на 2 - 3 чашки используемой среды.

<40> Пункт 7 МУК 4.2.2316-08.

8.2.5. Лиофилизованную культуру коллекционного штамма микробиологического препарата необходимо использовать 2 - 3 пассажа во избежание потери им заданных ростовых свойств.

IX. ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЯ

9.1. Расчет концентрации клеток микроорганизма производят по формуле (1):

$$К = \frac{П \times 1000}{С \times Т}, \quad (1)$$

где: К - концентрация штамма в воздухе, КОЕ/м^3;

П - количество типичных колоний, выросших на чашке Петри;

1000 - коэффициент пересчета дм^3 на м^3 воздуха;

С - скорость аспирации воздуха, дм^3/мин;

Т - время аспирации, мин.

X. ОФОРМЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЙ

10.1. Результаты измерений оформляют протоколом <41>. Протокол испытания должен включать:

- всю информацию, необходимую для полной идентификации образца;
- используемый метод испытаний;
- все детали испытания, не установленные настоящим документом;
- полученные результаты и соотношение их с уровнем ПДК$_{рз}$ или ПДК$_{ав}$.

<41> Пункты 7.3, 7.8 ГОСТ ISO 17025-2019 "Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий", введенного приказом Росстандарта от 15.07.2019 N 385-ст.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЕ ССЫЛКИ

1. Федеральный закон от 30.03.1999 N 52-ФЗ "О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения".

2. СанПиН 3.3686-21 "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней".

3. МУК 4.2.2316-08 "Методы контроля бактериологических питательных сред".

4. ГОСТ 12.1.009-2017 "Электробезопасность. Термины и определения".

5. ГОСТ Р 53228-2008 "Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания".

6. ГОСТ 1770-74 "Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия".

7. ГОСТ 29227-91 "Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования".

8. ГОСТ Р 8.563-2009 "Государственная система обеспечения единства измерений. Методики (методы) измерений".

9. ГОСТ 31598-2012 "Стерилизаторы паровые большие. Общие технические требования и методы испытаний".

10. ГОСТ Р ЕН 13060-2011 "Стерилизаторы паровые малые".

11. ГОСТ 22340-89 "Аквадистилляторы медицинские электрические. Общие технические требования и методы испытаний".

12. ГОСТ 26678-85 "Холодильники и морозильники бытовые электрические компрессионные параметрического ряда. Общие технические условия".

13. ГОСТ 25706-83 "Лупы. Типы, основные параметры. Общие технические требования".

14. ГОСТ 25336-82 "Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры".

15. ГОСТ 23932-90 "Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Общие технические условия".

16. ГОСТ 9412-2021 "Марля медицинская. Общие технические условия".

17. ГОСТ 5556-2022 "Вата медицинская гигроскопическая. Технические условия".

18. ГОСТ 12026-76 "Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия".

19. ГОСТ 17206-96 "Агар микробиологический. Технические условия".

20. ГОСТ Р 58144-2018 "Вода дистиллированная. Технические условия".

21. ГОСТ 17299-78 "Спирт этиловый технический. Технические условия".

22. ГОСТ 5962-2013 "Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья. Технические условия".

23. ГОСТ 33499-2015 "Груши свежие. Технические условия".

Приложение 7
к МУ 4.2.4071-24

ИДЕНТИФИКАЦИЯ НЕКОТОРЫХ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ, ДЛЯ КОТОРЫХ РАНЕЕ УСТАНОВЛЕНЫ ПДК И УСЛОВИЯ ИХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

N п/п	Таксономическое положение	Питательная среда (базовая)	Добавка к среде для подавления посторонней микрофлоры	Условия культивирования	Мор
				БАКТЕРИИ	
		грамотрицательные аэробные/микроаэрофильные палочки и кок			

1.	Семейство *Neisseriaceae*, род *Acinelobacter*, вид *aleovorum s. paraffinicum*, шт. ВСБ 712	МПА	Спирт этиловый ректификованный 2 мл/100 мл среды	1 сутки, 38 °С	Круглы краем, бесцве
2.	Семейство *Azotobacteriaceae*, род *Azotobacter*, вид *vinelandii* (Lipman), шт. ФЧ-1	Мясной бульон/МПА 1:1, пептон 10, NaCl 5,0, агар 2,0, pH 7,2 - 7,4	Амфотерицин 10 мкг/мл, стрептомицина сульфат 250 мкг/мл	2 - 3 суток, 28 °С	Мелки плотны блестя агар
3.	Семейство *Pseudomanaceae*, род *Pseudomonas*, вид *fluorescens*, шт. К3б	МПА	Нафталин 2 мл/100 мл среды	2 суток, 28 °С	Полуп глянце опалес центре уплотн точки,
4.	Семейство *Pseudomanaceae*, род *Pseudomonas*, вид *stutzeri*, шт. 367-1	Картофельный агар	Низкомолекулярные спирты, кроме метанола, 2 мл/100 мл среды	2 суток, 32 °С	Светл в цент бежев волнис
5.	Семейства *Acetobacteraceae*, род *Acetobacter*, вид *methylicum*, шт. ВСБ-924	САС с метанолом	Метанол, 2 мл/100 мл среды, pH 4,5	3 суток, 30 - 35 °С	Выпук серова слизис консис
	грамположительные палочки и кокки, образующие эндоспоры				
6.	Семейство *Bacillaceae*, род *Bacillus*, вид *polymixa*, шт. F-12, вид *subtilis*, шт. 265-76	Белково-витаминный агар, кукурузо-пептонный агар и др.	Амфотерицин В или полимиксин М (10 мкг/1 мл)	1 сутки, 30 - 37 °С	Круглы выпукл шерох лопаст желто цвета,
	грамположительные неспорообразующие палочки правильной фо				
7.	Семейство *Lactobacillaceae*, род *Bacillus*, вид *casei*, шт. 21	Среда Рогози, МПА	Желчь	7 - 8 суток, 30 °С	Мелки глубин вырост
	факультативные анаэробные грамотрицательные палочки				
8.	Семейство *Enterobacteriaceae*, род *Escherichia*, вид *coli*, шт. 1864, 472-Т23, ТДГ-6.436	Среда Эндо	Ампициллин 200 мкг/1 мл	1 сутки, 27 °С	Выпук поверх ровны эмуль солево непигм
	АКТИНОМИЦЕТЫ И РОДСТВЕННЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ				
	коринеформные бактерии				
9.	Семейство *Actinomycetaceae*, род *Actinomyces*, вид *roseolus*, шт. Z-219	Кровяной агар, среда Гаррода	-	7 - 14 суток	Колон нитеви
10.	Семейство *Corynebacteriaceae*, род *Corynebacterium*,	МПА	Грамицидин 10 - 50 мкг/1 мл среды	3 суток, 32 °С	Желто желты краем,

	вид *glutamicum*, шт. ВКПМ-В 5115, шт. ВСБ 206-L				
11.	Семейство *Brevibacteriaceae*, род *Brevibacterium*, вид *fiavum*, шт. ВНИИ Генетика 50-72 (ВКПМ-В37-57), вид *lactofermentum*, шт. НИТИА-89	Агар Хоттингера	-	3 суток, 32 °С	Серов кремо выпукл краем, блестя
				3 суток, 29 - 31 °С	Тверд кремо
	нокардиоформные актиномицеты				
12.	Семейство *Nocardiaceae*, род *Nocardia*, вид *mediterrondii*	САС, среда Красильникова, Гаузе 1, органические среды	Амфотерицин В, 5 мкг/1 мл среды	8 - 12 суток, 28 °С	Крупны или пл складч Раство на раз зелено ржаво красно коричн
13.	Семейство *Nocardiaceae*, род *Rhodococcus*, вид *erythropolis*, шт. 367-2, 367-6, вид *moris*, шт. 367-5, вид *ruber*, шт. 1418 (ВКМ Ас1513D)33	Среда Раймонда, картофельный агар	Нефть или нефтепродукты, 2 мл/100 мл среды	4 суток, 30 - 32 °С	Оранж оранж ровны блестя
			-	4 суток, 30 °С	Красны выпукл
	актиномицеты				
14.	Семейство *Micromonosporaceae*, род *Micromonospora*, вид *atratavinosa* sp. Nov. 1573, шт. 184R	Среда Гаузе 1	Амфотерицин В, 20 мкг/1 мл среды, сизомицин, 2000 мкг/1 мл среды	10 - 12 суток, 37 °С	Черны складч поверх мм
15.	Семейство *Micromonosporaceae*, род *Micromonospora*, вид *puppurea*, var. *violaceae*	Среда Гаузе 1	Амфотерицин В, 10 мкг/1 мл среды	10 суток, 35 °С	Хорош септир мицел которо круто среды
	стрептомицеты и близкие к ним роды				
16.	Семейство *Streptomycetaceae*, род *Streptomyces*, вид *aureofaciens*, шт. 019(8), шт. STR 2255	Среда Хоттингера	Амфотерицин В, 20 мкг/1 мл среды	10 - 12 суток, 28 °С	Обиль мицел колони слабо кратер
					Хорош мицел округл серого выдел темны

17.	Семейство *Streptomycetaceae*, род *Streptomyces*, вид cinnamonensis, шт. НИЦБ 109	ISP Medium No3 (овсяно-солевая среда на основе агара Difco)	Олеандромицин или линкомицин, 15 мкг/1 мл среды	3 - 4 суток, 28 °С	Серо-б радиал с фест выпукл темны
18.	Семейство *Streptomycetaceae*, род *Streptomyces*, вид *eritreus*, шт. 851	ISP Medium No6 (пептонно-дрожжевой железосодержащий агар)	Эритромицин, 250 - 500 мкг/1 мл среды	10 - 14 суток, 32 °С	Обиль трудно фрагм мицел вегета 2,0 мм
19.	Семейство *Streptomycetaceae*, род *Streptomyces*, вид *kanamyceticus*	Среда Гаузе-1	Амфотерицин В, 10 мкг/1 мл среды	12 суток, 28 °С	Колон плоски возду белый субстр коричн
20.	Семейство *Streptomycetaceae*, род *Streptomyces*, вид *noursei*, шт. 153/55	Крахмально-аммиачная среда	Амфотерицин В, 10 мкг/1 мл среды	5 суток, 27 °С	Белые складч припод плоски краем. мицел
21.	Семейство *Streptomycetaceae*, род *Streptomyces*, вид *ruminosus*, шт. 1-43	Среда с кукурузным экстрактом и картофельным крахмалом	Амфотерицин В, 20 мкг/1 мл среды	8 - 12 суток, 27 °С	Радиа в цент субстр коричн Возду серый хорош
22.	Семейство *Streptomycetaceae*, род *Streptoverticillium*, вид *griseocameum*	САС	Неомицин, лизоцим	8 суток, 25 - 30 °С	Небол обособ возду бархат хлопье розова цвета оттенк
	актинобактерии				
23.	Семейство *Mycobacteriaceae*, род *Mycobacterium*, вид sp., шт. В3805	Кукурузно-мучной глицериновый агар	-	7 суток, 35 - 40 °С	Возду не обр
	грибы и дейтеромицеты				
24.	Род *Acremonium*, вид *chizogenium*, шт. 298	Среда Сабуро	Стрептомицин, 500 мкг/1 мл среды	9 - 11 суток, 28 °С	Выпук складч цвета краям
25.	род *Candida,* вид *famata*, шт. ВСБ-641	Сусло-агар	Дрожжевой гидролизат, стрептомицин, 50 Ед/мл среды	2 - 3 суток, 32 - 34 °С	Одно гладки краем

26.	Род *Candida*, вид *lipolytica*, шт. 367-3	Картофельный агар, МПА, сусло-агар, среда Раймонда	Нефтепродукты, 2 мл/100 мл среды	2 суток, 30 - 32 °C	Белов плоски волнис псевдо
27.	Род *Candida*, вид *tropicalis*, шт. ВСБ-928	Картофельный агар, САС	-	3 суток, 30 °C	Белов 3-й де псевдо
28.	Род *Candida*, вид *utilis*, шт. ВСБ-651	Картофельный агар, сусло-агар	-	2 суток, 30 °C	Белов образу псевдо
29.	Род *Fuzidium*, вид *coccineum*, шт. 108	Сусло-агар, среда N 9	Амфотерицин В, 10 мкг/мл среды	9 - 14 суток, 24 °C	Круглы серова белым фесто мицел слабо
30.	Род *Penicillium*, вид *chrizogenium*	Среда Чапека, среда Райстрика	Канамицин (неомицин, сизомицин), 25 - 50 мкг/мл среды	9 - 10 суток, 24 °C	Бежев центр неровн сторон коричн
31.	Семейство *Entomophtoraceae*, род *Entomoplstora*	Среда Сабуро, декстрозный агар	Карбамазепин, 150 мкг/мл среды, амфотерицин В, 10 мкг/мл, полимиксин М, 250 мкг/мл среды	4 - 5 суток, 25 °C	Округл припод серова
32.	род *Pichia*, вид *membranofaciens*	Кукурузный агар	-	3 суток, 30 - 34 °C	Кремо цвета, край л поверх хорош ветвящ псевдо
33.	род *Trichoderma*, вид *reesei*, шт. NIBT 18.2-33	Сусло-агар	Карбамазепин, 150 мкг/мл среды	4 - 5 суток, 28 - 30 °C	Круглы подош припод поверх волнис мицел

Примечание: САС - синтетическая агаризованная среда;
МПА - мясо-пептонный агар;
N 16 - 22 - отбор пробы воздуха желательно проводить в жидкостной поглотитель.

НОРМАТИВНЫЕ И МЕТОДИЧЕСКИЕ ДОКУМЕНТЫ

1. Федеральный закон от 30.03.1999 N 52-ФЗ "О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения".

2. Федеральный закон от 28.12.2013 N 412-ФЗ "Об аккредитации в национальной системе аккредитации".

ИС МЕГАНОРМ: примечание.
В официальном тексте документа, видимо, допущена опечатка: Федеральный закон N 86-ФЗ "О государстве
деятельности" принят 05.07.1996, а не 05.06.1996.

3. Федеральный закон от 05.06.1996 N 86-ФЗ "О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности".

4. Постановление Правительства Российской Федерации от 16.07.2022 N 1287 "Об утверждении списка микроорганизмов, токсинов, оборудования и технологий, подлежащих экспортному контролю".

5. СанПиН 3.3686-21 "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней".

6. СанПиН 1.2.3685-21 "Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания".

7. Методика производства молекулярно-генетического исследования генно-инженерно-модифицированных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения, используемых для разведения и (или) выращивания на территории Российской Федерации.

8. Р 1.2.3156-13 "Оценка токсичности и опасности химических веществ и их смесей для здоровья человека".

9. МУК 4.2.2602-10 "Система предрегистрационного доклинического изучения безопасности препаратов. Отбор, проверка и хранение производственных штаммов, используемых при производстве пробиотиков".

10. МУК 4.2.2316-08 "Методы контроля бактериологических питательных сред".

11. МУ 1.1.578-96 "Требования к постановке экспериментальных исследований по обоснованию предельно допустимых концентраций промышленных химических аллергенов в воздухе рабочей зоны и атмосферы".

12. МУ 2.1.5.720-98 "Обоснование гигиенических нормативов химических веществ в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования".

13. Методические указания к постановке исследований по изучению раздражающих свойств и обоснованию предельно допустимых концентраций избирательно действующих раздражающих веществ в воздухе рабочей зоны.

14. Методические указания по гигиенической оценке микробных средств защиты растений от насекомых и болезней на основе неспорообразующих микроорганизмов.

15. РД 52.24.419-2019 "Массовая концентрация растворенного кислорода в водах. Методика измерений йодометрическим методом".

16. ПНД Ф 14.1:2:3:4.123-97 "Методика выполнения измерений биохимической потребности в кислороде после n дней инкубации (БПК полн.) в поверхностных пресных, подземных (грунтовых), питьевых, сточных и очищенных сточных водах".

17. ГОСТ Р 59024-2020 "Вода. Общие требования к отбору проб".

18. ГОСТ Р 58556-2019 "Оценка качества воды водных объектов с экологических позиций".

19. ГОСТ Р 55684-2013 "Вода питьевая. Метод определения перманганатной окисляемости".

20. ГОСТ 33045-2014 "Вода. Методы определения азотсодержащих веществ".

21. ГОСТ Р 70393-2022 "Изделия медицинские для диагностики *in vitro*. Приготовление, производство, хранение и испытания питательных сред".

22. ГОСТ ISO 11133-2016 "Приготовление, производство, хранение и определение рабочих характеристик питательных сред".

23. ГОСТ 33044-2014 "Принципы надлежащей лабораторной практики".

24. ГОСТ 12.1.009-2017 "Электробезопасность. Термины и определения".

25. ГОСТ Р 53228-2008 "Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания".

26. ГОСТ 1770-74 "Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия".

27. ГОСТ 29227-91 "Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования".

28. ГОСТ Р 8.563-2009 "Государственная система обеспечения единства измерений. Методики (методы) измерений".

29. ГОСТ 31598-2012 "Стерилизаторы паровые большие. Общие технические требования и методы испытаний".

30. ГОСТ Р ЕН 13060-2011 "Стерилизаторы паровые малые".

31. ГОСТ 26678-85 "Холодильники и морозильники бытовые электрические компрессионные параметрического ряда. Общие технические условия".

32. ГОСТ 25706-83 "Лупы. Типы, основные параметры. Общие технические требования".

33. ГОСТ 25336-82 "Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры".

34. ГОСТ 23932-90 "Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Общие технические условия".
35. ГОСТ 9412-2021 "Марля медицинская. Общие технические условия".
36. ГОСТ 5556-2022 "Вата медицинская гигроскопическая. Технические условия".
37. ГОСТ 12026-76 "Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия".
38. ГОСТ 17206-96 "Агар микробиологический. Технические условия".
39. ГОСТ Р 58144-2018 "Вода дистиллированная. Технические условия".
40. ГОСТ 17299-78 "Спирт этиловый технический. Технические условия".
41. ГОСТ 5962-2013 "Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья. Технические условия".
42. ГОСТ 12.1.007-76 "Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности".
43. ГОСТ 10444.7-86 "Методы выявления ботулинистических токсинов и *Clostridium botulinum*".
44. ОФС 1.7.2.0001.15 "Безопасность пробиотиков в тестах in vivo".
45. ГОСТ 20730-75 "Питательные среды. Мясо-пептонный бульон (для ветеринарных целей). Технические условия".
46. ГОСТ Р 58144-2018 "Вода дистиллированная. Технические условия".
47. ГОСТ 5962-2013 "Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья. Технические условия".
48. ГОСТ 17299-78 "Спирт этиловый технический. Технические условия".
49. ГОСТ Р 54537-2011 "Добавки пищевые. Кальция ацетат Е263".
50. ГОСТ 20015-88 "Хлороформ. Технические условия".
51. ГОСТ 61-75 "Группа Л52. Реактивы. Уксусная кислота".
52. ГОСТ 975-88 "Глюкоза кристаллическая гидратная".
53. ГОСТ 12.1.005-88 "Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны".
54. ГОСТ Р 59059-2020 "Контроль загрязнений атмосферного воздуха. Термины и определения".
55. ГОСТ ISO 17025-2019 "Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий".
56. ГОСТ Р 57095-2016 "Биотехнологии. Термины и определения".
57. ГОСТ Р 56997-2016 "Химические дезинфицирующие средства и антисептики. Средства для дезинфекции на объектах общественного питания и торговли. Показатели токсичности и опасности".
58. ГОСТ 33499-2015 "Груши свежие. Технические условия".
59. ГОСТ 4233-77 "Натрий хлористый. Технические условия".
60. ГОСТ 34979-2023 "Концентрат пивного сусла. Общие технические условия".

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЕ ССЫЛКИ

1. Шеина Н.И. Критерии оценки биобезопасности микроорганизмов, используемых в биотехнологической промышленности. Вестник ОГУ. 2012; 142(6):165 - 169.
2. Шеина Н.И., Буданова Е.В., Королик В.В., Мялина Л.И., Сазонова Л.П. Оценка безопасности микробиологических препаратов, используемых в биотехнологиях. Материалы II Национального конгресса с международным участием по экологии человека, гигиене и медицине окружающей среды "СЫСИНСКИЕ ЧТЕНИЯ - 2021", 2021; 456 - 459.
3. Шеина Н.И., Королик В.В., Буданова Е.В. Методологические основы оценки безопасности микробиологических препаратов. Сб. материалов XIII Всероссийского съезда гигиенистов, токсикологов и санитарных врачей. "Развивая вековые традиции, обеспечивая "санитарный щит". Под ред. Поповой А.Ю., Кузьмина С.М., 2022; 2:444 - 447.
4. Шеина Н.И., Буданова Е.В., Другова Е.Д., Королик В.В. и др. Токсиколого-гигиенические аспекты изучения многокомпонентных микробиологических препаратов. Сб. материалов Всероссийской конференции с международным участием "Профилактическая медицина вчера, сегодня, завтра". РНИМУ им. Н.И. Пирогова, 2023:71 - 72.
5. Королик В.В., Шеина Н.И., Мялина Л.И., Сазонова Л.П., Другова Е.Д. Первичная санитарно-гигиеническая оценка микроорганизмов, применяемых в биотехнологиях. Гигиена и санитария. 2023; 102(1):135 - 140.
6. Пивоваров Ю.П., Королик В.В. Санитарно-значимые микроорганизмы (таксономическая характеристика и дифференциация). М., 2000. - 268 с.
7. Федосеева В.Н., Порядин Г.В., Ковальчук Л.В., Чередееев А.Н. и др. Руководство по иммунологическим и аллергологическим методам в гигиенических исследованиях. М., "Промедэк", 1993. - 329 с.
8. Sheina N., Budanova E., Mialina L., Pivovarov Yu., Korolik V. e.a. A Quantitative Assessment of the Morphofunctional Activity of the Population of Mast Cells Exposed to Biotechnological Strains of Microorganisms. International Journal of Biomedicine. 2018; 8(2):150 - 154.

9. Шеина Н.И., Буданова Е.В., Колесникова В.В., Мялина Л.И., Сазонова Л.П. Состояние микробиоты кишечника крыс при воздействии биотехнологических микроорганизмов различного таксономического положения. Гигиена и санитария. 2021; 100 (3):234 - 239.

10. Шеина Н.И., Иванов Н.Г., Жолдакова З.И. Проблема гигиенического нормирования содержания биотехнологических штаммов микроорганизмов в воде. Гигиена и санитария, 2010; 5:39 - 42.

11. Девин Б.А. Перенос микроорганизмов в почве и его количественное описание. Автореферат на соискание ученой степени канд. биол. наук. - М., МГУ - 2004 - 23 с.

12. J. Vanderpitte, K. Engbaek, P. Piot, C.C. Heuck. Основные методы лабораторных исследований в клинической бактериологии/ВОЗ, Женева, Швейцария. Из-во "Медицина" - 1994, 136 с.

13. Батаева Д.С., Панфилова Е.П. Качество питательных сред - залог достоверности и воспроизводимости результатов микробиологических исследований. Все о мясе. 2018; 2:41 - 42.

СПРАВОЧНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

В настоящих МУ используются следующие термины и определения:

Биотехнологические (промышленные) штаммы микроорганизмов - это живые штаммы-продуценты биологически активных веществ разного назначения, которые применяются в различных отраслях народного хозяйства <42>. Биотехнологические штаммы являются сапрофитными (непатогенными) микроорганизмами (DL_{50} более 10^6 КОЕ/мышь), которые выделяют из объектов окружающей среды (почва, вода, растения) и/или получают с помощью селекции или генно-инженерным способом с целью синтеза целевого продукта.

<42> ГОСТ Р 57095-2016 "Биотехнологии. Термины и определения", введенный приказом Росстандарта от 21.09.2016 N 1180-ст (далее - ГОСТ Р 57095-2016).

Линия штаммов - совокупность штаммов, полученных на основе общего штамма предшественника и отличающихся от него генетическими изменениями, не влияющими на биобезопасность <43>.

<43> ГОСТ Р 57095-2016.

Генно-инженерно-модифицированный микроорганизм (ГММ) - микроорганизм, генотип которого был изменен с целью синтеза целевого продукта при помощи методологии генетической инженерии, в результате чего в генетическом материале содержатся последовательности генетического материала из таксономически неродственных видов, за исключением регуляторных последовательностей (операторы, промоторы, терминаторы, точки начала репликации) <44>.

ИС МЕГАНОРМ: примечание.
В официальном тексте документа, видимо, допущена опечатка: имеется в виду Федеральный закон N 86-ФЗ

<44> Федеральный закон от 05.06.1996 N 86-ФЗ.

Вирулентность - степень патогенности штамма микроорганизма в отношении животных или человека в стандартных условиях естественного или искусственного заражения. Показателем вирулентности является средняя смертельная доза (DL_{50}) - минимальное количество микроорганизмов или их токсинов, вызывающее гибель 50% экспериментальных животных; измеряется в колониеобразующих единицах (КОЕ) на единицу массы тест-объекта.

Токсигенность - способность микроорганизма к продукции токсина и к выделению его в окружающую среду, т.е. наличие экзотоксина.

Токсичность - способность микроорганизма к продукции эндотоксина, выделяющегося в окружающую среду только при разрушении клеток микроорганизма.

"Пороговая" доза (Lim_{bact}) - минимальное количество микроорганизмов на животное, вызывающее бактериемию через 30 мин после внутрибрюшинного введения взвеси изучаемых микроорганизмов.

"Ферменты патогенности" - ферменты, выделяемые микроорганизмами, которые способны оказывать повреждающее действие на различные ткани в зависимости от механизма их действия. К ним относятся, например, гиалуронидаза, желатиназа, коллагеназа, лецитиназа, декарбоксилаза, гемолизины.

Гиалуронидаза - фермент, разлагающий гиалуроновую кислоту, структурно входящую в состав соединительной ткани, и способствующий проникновению в организм самих микроорганизмов.

Желатиназа (коллагеназа) - фермент, расщепляющий коллаген и желатин. Желатиназа совместно с гиалуронидазой способствует внедрению в организм микроорганизмов.

Лецитиназа - фермент, разрушающий лецитин и способствующий гемолизу эритроцитов.

Декарбоксилазы - ферменты микроорганизмов, отщепляющие карбоксильную группу от аминокислот с образованием аминов. Амины могут принимать участие в патологическом процессе в организме, способствуя проявлению вирулентных свойств этих микроорганизмов.

Гемолизины - ферменты, вызывающие лизис эритроцитов.

Гемолизины термостабильные - гемолизины, активность которых не снижается после нагревания до 90 °C в течение 10 мин.

Гемолизины термолабильные - гемолизины, активность которых снижается после нагревания до 56 °C в течение 10 мин.

Микробиологические препараты - это различные препаративные формы субстрата-носителя (например, вода, почва), содержащего достаточное для обеспечения заданных функций количество (концентрацию, титр) культуры биотехнологических (полезных) микроорганизмов и (или) жизнеспособных спор, а также продукты их метаболизма.

Средняя смертельная доза (DL_{50}, мг/кг и КОЕ/кг) микробиологического препарата при введении в желудок - доза препарата, вызывающая гибель 50% подопытных животных при однократном введении в желудок <45>.

<45> ГОСТ Р 56997-2016 "Химические дезинфицирующие средства и антисептики. Средства для дезинфекции на объектах общественного питания и торговли. Показатели токсичности и опасности", введенный приказом Росстандарта от 30.06.2016 N 751-ст.

Примечание: обозначения средней смертельной дозы в научной литературе различны: ЛД$_{50}$ (*русс.*), DL_{50} (от *греч.* δόσις; и *лат.* lētālis), также LD_{50} (от *англ. lethal dose*).

Средняя смертельная концентрация препарата (CL_{50}, мг/м^3 и КОЕ/м^3) в воздухе - концентрация микробиологического препарата, вызывающая гибель 50% подопытных животных при 2 - 4-часовом ингаляционном воздействии (рассчитывается в модельном эксперименте при интратрахеальном введении микробиологического препарата).

Предельно допустимая концентрация (ПДК$_{рз}$) биотехнологических микроорганизмов и препаратов на их основе в воздухе рабочей зоны - максимальная концентрация биотехнологических микроорганизмов и препаратов на их основе, которая при ежедневной (кроме выходных дней) работе в течение 8 ч в день, но не более 40 ч в неделю, в течение всего рабочего стажа не должна вызывать заболеваний или отклонений в состоянии здоровья, обнаруживаемых современными методами исследований, в процессе работы или в отдаленные сроки жизни настоящего и последующих поколений. Воздействие на уровне ПДК не исключает нарушение здоровья лиц с повышенной чувствительностью <46>.

<46> ГОСТ 12.1.005-88.

Предельно допустимая концентрация среднесуточная (ПДК$_{сс}$) биотехнологических микроорганизмов и препаратов на их основе в атмосферном воздухе городских и сельских поселений - максимальная концентрация биотехнологических микроорганизмов и препаратов на их основе в атмосферном воздухе населенных мест, которая не должна оказывать на человека прямого или косвенного вредного воздействия при неограниченно долгом (годы) вдыхании <47>.

<47> ГОСТ Р 59059-2020.

Предельно допустимая концентрация (ПДК$_{вв}$) биотехнологических микроорганизмов и препаратов на их основе в воде водоемов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования - максимальная концентрация биотехнологических микроорганизмов и препаратов на их основе в воде, которая не должна оказывать прямого или косвенного влияния на организм человека в течение всей его жизни и на здоровье последующих поколений, не должна ухудшать гигиенические условия водопользования и экологическое благополучие водного объекта <48>.

<48> МУ 2.1.5.720-98.

Предельно допустимая концентрация (ПДК$_{пп}$) биотехнологических микроорганизмов и препаратов на их основе в пахотном слое почвы - максимальная концентрация биотехнологических микроорганизмов и препаратов на их основе в верхнем слое почвы, которая не должна оказывать прямого или косвенного отрицательного влияния на здоровье человека, плодородие почвы, ее самоочищающую способность и соприкасающиеся с ней среды.