МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)
INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 35117— 2024

ФЕРМЕНТНЫЕ ПРЕПАРАТЫ МИКРОБНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ДЛЯ ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

Определение острой токсичности

Издание официальное

Москва
Российский институт стандартизации
2024

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели, основные принципы и общие правила проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

1 РАЗРАБОТАН Ассоциацией «Технологическая платформа БиоТех2030» (Ассоциация «ТП БиоТех2030») совместно с Федеральным государственным бюджетным учреждением науки Федеральным исследовательским центром питания, биотехнологии и безопасности пищи (ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»)

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 30 сентября 2024 г. № 177-П)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Армения	AM	ЗАО «Национальный орган по стандартизации и метрологии» Республики Армения
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт
Узбекистан	UZ	Узбекское агентство по техническому регулированию

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 22 октября 2024 г. № 1481-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 35117—2024 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 апреля 2025 г. с правом досрочного применения

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация о введении в действие (прекращении действия) настоящего стандарта и изменений к нему на территории указанных выше государств публикуется в указателях национальных стандартов, издаваемых в этих государствах, а также в сети Интернет на сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации.

В случае пересмотра, изменения или отмены настоящего стандарта соответствующая информация будет опубликована на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации в каталоге «Межгосударственные стандарты»

© Оформление. ФГБУ «Институт стандартизации», 2024

В Российской Федерации настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Термины, определения, обозначения и сокращения 3
4 Общие положения 4
5 Описание метода определения острой токсичности 7
6 Данные исследования и отчет 10
Приложение А (справочное) Информация о применяемых технических регламентах и нормативных правовых актах в государствах — участниках СНГ 12
Приложение Б (обязательное) Порядок классифицирования острой токсичности ферментных препаратов на основании данных проведенного исследования 13

М Е Ж Г О С У Д А Р С Т В Е Н Н Ы Й С Т А Н Д А Р Т

ФЕРМЕНТНЫЕ ПРЕПАРАТЫ МИКРОБНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ДЛЯ ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

Определение острой токсичности

Enzyme preparations for the food industry of microbial origin. Acute toxicity test

Дата введения — 2025—04—01
с правом досрочного применения

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на ферментные препараты микробного происхождения, применяемые в пищевой промышленности в качестве технологических вспомогательных средств, получаемых с использованием микроорганизмов (штаммов — продуцентов): природных, полученных методами традиционной селекции и мутагенеза, а также генетически-модифицированных (рекомбинантных, трансгенных) штаммов, таксономически принадлежащих как к прокариотам (бактерии, археи, микроводоросли, стрептомицеты), так и к эукариотам (микроскопические дрожжеподобные и плесневые грибы), и устанавливает общие требования к определению острой пероральной токсичности указанных видов продукции в тестах на лабораторных животных.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие межгосударственные стандарты:

ГОСТ 12.1.008 Система стандартов безопасности труда. Биологическая безопасность. Общие требования

ГОСТ 10444.12 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Методы выявления и подсчета количества дрожжей и плесневых грибов

ГОСТ 10444.15 Продукты пищевые. Методы определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов

ГОСТ 15113.8 Концентраты пищевые. Методы определения золы

ГОСТ 20264.1 Препараты ферментные. Методы определения органолептических, физико-химических и микробиологических показателей

ГОСТ 20264.2 Препараты ферментные. Методы определения протеолитической активности

ГОСТ 20264.4 Препараты ферментные. Методы определения амилолитической активности

ГОСТ 22967 Шприцы медицинские инъекционные многократного применения. Общие технические требования и методы испытаний

ГОСТ 26669 Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов

ГОСТ 26929 Сырье и продукты пищевые. Подготовка проб. Минерализация для определения содержания токсичных элементов

ГОСТ 30178 Сырье и продукты пищевые. Атомно-абсорбционный метод определения токсичных элементов

ГОСТ 30726 Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий вида Escherichia coli

ГОСТ 31487 Препараты ферментные. Методы определения ферментативной активности фитазы

ГОСТ 31488 Препараты ферментные. Методы определения ферментативной активности ксиланазы

Издание официальное

ГОСТ 31659 Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода Salmonella

ГОСТ 31662 Препараты ферментные. Методы определения ферментативной активности целлюлазы

ГОСТ 31747 Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий)

ГОСТ 31886 Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP). Применение принципов GLP к краткосрочным исследованиям

ГОСТ 31890 Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP). Организация и управление исследованиями, проводимыми на нескольких испытательных площадках

ГОСТ 31904 Продукты пищевые. Методы отбора проб для микробиологических испытаний

ГОСТ 32296 Методы испытаний по воздействию химической продукции на организм человека. Основные требования к проведению испытаний по оценке острой токсичности при внутрижелудочном поступлении методом фиксированной дозы

ГОСТ 32644 Методы испытаний по воздействию химической продукции на организм человека. Острая пероральная токсичность — метод определения класса острой токсичности

ГОСТ 32891 Сычуги телят, ягнят, козлят-молочников для молокосвертывающих ферментных препаратов. Технические условия

ГОСТ 33044 Принципы надлежащей лабораторной практики

ГОСТ 33215 Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур

ГОСТ 33216 Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами

ГОСТ 34140 Продукты пищевые, корма, продовольственное сырье. Метод определения микотоксинов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием

ГОСТ 34176 Препараты ферментные. Методы определения ферментативной активности эндо-бета-глюканазы

ГОСТ 34353 Препараты ферментные молокосвертывающие животного происхождения сухие. Технические условия

ГОСТ 34430 Ферментные препараты для пищевой промышленности. Метод определения протеолитической активности

ГОСТ 34566 Комбикорма полнорационные для лабораторных животных. Технические условия

ГОСТ ISO 7886-1 Шприцы инъекционные однократного применения стерильные. Часть 1. Шприцы для ручного использования

ГОСТ ISO 11815 Молоко. Определение общей молокосвертывающей активности говяжьего сычужного фермента

ГОСТ ISO 15163 Молоко и молочные продукты. Сычужный фермент из сычугов телят и ферментный препарат из сычугов крупного рогатого скота. Определение содержания химозина и говяжьего пепсина методом хроматографии

ГОСТ ISO/IEC 17025 Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов и классификаторов на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации (gost.e-ecolog.ru по указателям национальных стандартов, издаваемым в государствах, указанных в предисловии, или на официальных сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации. Если на документ дана недатированная ссылка, то следует использовать документ, действующий на текущий момент, с учетом всех внесенных в него изменений. Если заменен ссылочный документ, на который дана датированная ссылка, то следует использовать указанную версию этого документа. Если после принятия настоящего стандарта в ссылочный документ, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение применяется без учета данного изменения. Если документ отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины, определения, обозначения и сокращения

3.1 Термины и определения

В настоящем стандарте применены термины в соответствии с техническими регламентами и нормативными правовыми актами, действующими на территории государства, принявшего стандарт*, а также следующие термины с соответствующими определениями:

3.1.1

доза: Количество вводимого тестируемого вещества. Доза выражает соотношение единицы массы тестируемого вещества на единицу массы тела подопытного животного, мг/кг.

[Адаптировано из ГОСТ 32296—2013, пункт 2.2]

3.1.2 **генетически модифицированные микроорганизмы;** ГММ: Микроорганизмы, генетический материал которых изменен с использованием методов генной инженерии (рекомбинирования и/или трансгенеза).

3.1.3 **мутантные микроорганизмы:** Наследственно измененная форма микроорганизмов, генетический материал которых изменен при помощи методов индуцированного (направленного) мутагенеза с использованием физических или химических факторов.

3.1.4 **общие органические вещества;** ООВ: Вещества, входящие в состав ферментного препарата, за вычетом содержания в нем влаги, золы и добавляемых при производстве вспомогательных органических веществ — носителей.

3.1.5

острая пероральная токсичность: Эффекты, проявляющиеся в течение 24 ч после однократного или многократного перорального введения дозы.

[Адаптировано из ГОСТ 32296—2013, пункт 2.4]

3.1.6 **отчет об исследовании:** Документ, содержащий результаты исследования и их анализ в соответствии с требованиями правил надлежащей лабораторной практики, включая любые изменения и/или отклонения, их причины и обоснования и соответствующее результатам исследования заключение об исследуемом продукте.

3.1.7 **стандартные операционные процедуры;** СОП: Подробные письменные инструкции, содержащие описание процессов проведения испытаний или другой деятельности, как правило, не представленные детально в планах исследования или руководствах по проведению испытаний и предназначенные для достижения единообразия при осуществлении определенной деятельности.

3.1.8 **ферментные препараты:** Очищенные и концентрированные продукты, содержащие определенные ферменты или комплекс ферментов, растительного, животного и микробного (продуцент) происхождения, необходимых для осуществления биохимических процессов, происходящих при производстве продуктов.

3.1.9

***LD_{50}* (средняя смертельная доза, перорально):** Одиночная статистически полученная доза вещества, которая предположительно в 50 % случаев может вызвать смерть животного. При введении перорально LD_{50} выражается в отношении единицы массы испытываемого вещества к единице массы подопытного животного, мг/кг.

[Адаптировано из ГОСТ 32296—2013, пункт 2.10]

Примечание — Информация о технических регламентах и нормативных правовых актах приведена в приложении А.

3.2 Обозначения и сокращения

В настоящем стандарте применены следующие обозначения и сокращения:

БГКП — бактерии группы кишечной палочки;

ГММ — генетически модифицированные микроорганизмы;

* В Российской Федерации также применяют термины в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях (Directive on the protection of animals used for scientific purposes).

КМАФАнМ — количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов;

ООВ — общие органические вещества;

СОП — стандартные операционные процедуры;

LD_{50} — средняя смертельная доза.

4 Общие положения

4.1 Определение острой токсичности ферментных препаратов микробного происхождения, используемых в качестве технологических вспомогательных средств, проводят с целью оценки их возможного неблагоприятного действия на организм человека при поступлении в организм в составе пищевой продукции, в которой ингредиенты ферментных препаратов не элиминируются, а производится только инактивация ферментативной активности. Результаты определения острой токсичности учитывают в ходе государственной регистрации ферментных препаратов, полученных из ранее не применявшихся в пищевой промышленности штаммов микроорганизмов продуцентов и рассматриваемых в качестве пищевой продукции нового вида в соответствии с требованиями технических регламентов и нормативных правовых актов, действующих на территории государства, принявшего стандарт.

Примечание — Информация о технических регламентах и нормативных правовых актах приведена в приложении А.

4.2 Определение острой токсичности ферментных препаратов проводят в специализированных лабораториях, оснащенных подразделениями по работе с лабораторными животными (виварииями) в соответствии с принципами надлежащей лабораторной практики и правилами по уходу за лабораторными животными и их содержанию по ГОСТ 31886, ГОСТ 31890, ГОСТ 33044, ГОСТ 33215, ГОСТ 33216[*].

Лаборатории для проведения испытаний должны соответствовать критериям компетентности по ГОСТ ISO/IEC 17025. На все операции, выполняемые в ходе исследований (испытаний) острой токсичности, должны быть установлены СОП.

Сотрудники, проводящие исследования на животных, должны обладать необходимыми для этого компетенциями (наличие базового медицинского, ветеринарного или биологического образования).

4.3 Ввиду возможного наличия в ферментных препаратах микробного происхождения живых клеток штаммов — продуцентов и их ДНК, т. е. компонентов, представляющих биологическую опасность, в ходе работы с ферментными препаратами обязательным является соблюдение правил биологической безопасности по ГОСТ 12.1.008 и другим нормативным документам, действующим на территории государства, принявшего стандарт[**] (в части микроорганизмов III и IV групп патогенности).

4.4 Ферментные препараты, подлежащие определению острой токсичности, должны быть охарактеризованы и иметь прослеживаемое происхождение и сопровождаться спецификацией, раскрывающей наличие определенного(ых) вида(ов) ферментативной активности, наличие примесей химического и биологического происхождения, ограничиваемых (нормируемых) согласно требованиям; данные о стабильности в течение срока годности; информацию об активности (в единицах активности); условия, необходимые для проявления активности ферментного препарата (оптимум pH и температуры и др.); условия инактивации ферментного препарата (условия отсутствия остаточной активности фермента в пищевой продукции), данные об отсутствии антибиотической активности, характеристика второстепенной ферментативной активности (при наличии); описание метода определения активности фермента в ферментном препарате; наименование и количественное содержание вносимого органического вещества — носителя и/или иммобилизующего агента.

При обоснованной необходимости показатели, характеризующие ферментный препарат, включая требования безопасности в соответствии с требованиями технических регламентов и нормативных правовых актов, действующих на территории государства, принявшего стандарт, могут быть определены

[*] В Российской Федерации также применяют Директиву 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях (Directive on the protection of animals used for scientific purposes).

[**] В Российской Федерации также действуют Санитарные правила СП 1.2.731-99 1.2. «Эпидемиология. Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности и гельминтами».

в аккредитованной лаборатории, проводящей исследования (испытания), перед определением острой токсичности на лабораторных животных, в частности:

- содержание свинца по ГОСТ 26929, ГОСТ 30178;
- микробиологические показатели (содержание КМАФАнМ, БГКП, *E. coli*, патогенных микроорганизмов, в том числе сальмонелл) по ГОСТ 10444.15, ГОСТ 31904, ГОСТ 26669, ГОСТ 31747, ГОСТ 31659, ГОСТ 30726;
- содержание микотоксинов по ГОСТ 34140;
- наличие антибиотической активности — по нормативным документам, действующим на территории государства, принявшего стандарт*;
- наличие жизнеспособных клеток продуцентов (плесневых и дрожжевых грибов) по ГОСТ 10444.12;
- наличие жизнеспособных клеток продуцентов микроорганизмов других таксономических групп (не принадлежащих к плесневым и дрожжевым грибам) — по нормативным документам, действующим на территории государства, принявшего стандарт;
- ферментативную протеолитическую активность по ГОСТ 20264.2, ГОСТ 34430;
- ферментативную амилолитическую (амилазную) активность по ГОСТ 20264.4;
- ферментативную активность ксиланазы по ГОСТ 31488;
- ферментативную активность фитазы по ГОСТ 31487;
- ферментативную активность целлюлазы по ГОСТ 31662;
- ферментативную активность эндо-бета-глюказаны по ГОСТ 34176;
- ферментативную активность молокосвертывающих ферментных препаратов по ГОСТ 32891;
- ферментативную активность сухих молокосвертывающих ферментных препаратов животного происхождения по ГОСТ 34353;
- молокосвертывающую активность говяжьего сычужного фермента по ГОСТ ISO 11815;
- содержание химозина и говяжьего пепсина по ГОСТ ISO 15163;
- другие виды ферментативной активности — при наличии стандартизованных методов их определения.

Примечание 1 — Выбор метода анализа активности ферментного препарата, продуцируемого генетически измененными микроорганизмами, осуществляют с учетом данных о встроенной в ДНК последовательности нуклеотидов (генов животного, растительного или синтетического происхождения) на основании технической спецификации на ферментный препарат (указанных единиц активности, нормативного документа на метод анализа). При анализе активности ферментного препарата, его качества и безопасности могут быть использованы другие методы контроля, установленные нормативными документами, действующими на территории государства, принявшего стандарт.

Примечание 2 — Информация о технических регламентах и нормативных правовых актах приведена в приложении А.

4.5 Если ферментный препарат получен из генетически модифицированных штаммов, в лабораторию кроме документов на ферментный препарат предоставляют сведения о штамме-продуценте, включающие данные:

- о таксономической принадлежности штамма, установленной до уровня рода (вида, штамма) по фенотипическим и генотипическим свойствам, подтвержденной с использованием воспроизводимых молекулярно-генетических методов, источнике выделения штамма или штамма, полученного с использованием синтетических генов;
- об индивидуальном номере (коде) штамма-продуцента, присвоенном изготовителем;
- о депонировании в официальных коллекциях микробных культур национального или международного уровня (на условиях контрольного хранения);
- об отсутствии патогенности, токсигенности, антибиотикорезистентности, аллергенных свойств у штаммов-продуцентов (при наличии);
- о виде целевого использования штамма-продуцента и характеристике основного метаболита — ингредиента (компонента);
- для мутантных микроорганизмов (в случае получения дополнительной мутации) — сведения о характере мутации, безопасности и стабильности генотипических и фенотипических характеристик;

* В Российской Федерации действуют МУК 4.2.3143—13 «Метод определения антибиотической активности ферментных препаратов микробного (бактериального и грибного) происхождения, предназначенных для использования в пищевой промышленности».

- для генетически модифицированных микроорганизмов: описание генетической модификации ДНК (сведения о трансформационном событии), нуклеотидной последовательности встроенного (сконструированного) локуса ДНК в виде однобуквенных кодов по номенклатуре IUPAC*; сведения о его регуляторных элементах (при наличии), целях модификации; сведения о происхождении штамма-реципиента и штамма-донора, их таксономическом положении на уровне рода (вида, штамма) и описание их свойств; данные о векторных последовательностях, использовании транспозонов при конструировании ГММ продуцентов, о средствах доставки целевого гена в клетки реципиента, селективных маркерах ГММ штаммов, стабильности генотипических и фенотипических характеристик; сведения о профиле внехромосомных элементов (плазмид, транспозонов, бактериофагов и др.) штаммов-продуцентов (при наличии внехромосомных элементов функциональная роль последних должна быть охарактеризована и доказана их неспособность к генному трансферу); сведения о стабильности технологических характеристик;

- для ферментных препаратов, полученных с использованием мутантных и/или ГММ штаммов микроорганизмов, дополнительно представляют данные о наличии изменений в их структуре по сравнению с применяемыми и размещенными на рынке Евразийского экономического союза (Таможенного союза) ингредиентами.

4.6 Ферментный препарат передают в подразделение лаборатории, выполняющей исследование на животных, в обезличенном (закодированном) виде с присвоением внутрилабораторного номера (шифра). Отбор проб ферментного препарата на исследование — по нормативным документам, действующим на территории государства, принявшего стандарт. По окончании исследования (испытания) на лабораторных животных данные о ферментном препарате декодируются при составлении отчета о проведенном исследовании (испытании).

4.7 При определении острой токсичности ферментных препаратов соблюдают принципы гуманного обращения с лабораторными животными. Для этого необходимо сведение к минимуму общего числа лабораторных животных, используемых в исследованиях (испытаниях). При проведении исследований (испытаний) следует прилагать все возможные усилия к тому, чтобы в ходе выполнения экспериментальных процедур избегать действий, способных привести к долговременным повреждениям, боли, страданиям или тревоге, а в случае их неизбежности следует стремиться к тому, чтобы такие последствия были сведены к минимуму. При выведении выживших животных из исследования (испытания) следует использовать гуманные методы эвтаназии.

Примечание — Предпочтительным методом эвтаназии при выведении животных из исследования (испытания) является ингаляция летальной дозы диоксида углерода (CO_2). Возможно также применение других гуманных методов эвтаназии.

В целях сокращения общего числа животных, используемых в определении острой токсичности ферментных препаратов, при составлении плана исследования (испытания) следует руководствоваться подходом, использующим последовательное введение фиксированной дозы ферментного препарата по ГОСТ 32296.

4.8 Определения острой токсичности ферментных препаратов микробного происхождения проводят с использованием лабораторных грызунов: мышей (*Mus musculus, Mus domesticus*) или крыс (*Rattus rattus, Rattus norvegicus*). Допускается использование лабораторных животных указанных видов, принадлежащих к стандартизованным линиям или породам, поступающим из авторизованных питомников или содержащихся в лабораторной колонии и являющихся прослеживаемыми. Линии лабораторных животных, применяемые в определении острой токсичности, могут быть как инбредными (генетически гомогенными), так и аутбредными. Для проведения исследований (испытаний) острой токсичности следует использовать здоровых молодых половозрелых животных в возрасте от 8 до 12 недель. Предпочтительным является проведение определений острой токсичности на самках животных указанных видов, ввиду большей чувствительности, в общем случае, самок животных к разнообразным токсическим воздействиям по сравнению с самцами. Самки животных должны быть не беременными и не рожавшими. Дополнительное проведение исследований (испытаний) на самцах животных должно быть отдельно обосновано имеющимися данными литературы о возможном более выраженном токсическом действии, подлежащей исследованиям (испытаниям) продукции для самцов, что необходимо отражать в отчете о проведении исследования. Животные, вводимые в исследования (испытания) по определе-

* International Union of Pure and Applied Chemistry — Международный союз теоретической и прикладной химии.

нию острой токсичности в составе всех экспериментальных групп, получающих различные дозы ферментного препарата, должны принадлежать к одному и тому же полу и линии. Масса тела животных, получающих различные дозы ферментного препарата, должна различаться в пределах не более ±20 % внутри групп и между ними.

4.9 Животных в ходе определения острой токсичности содержат в специализированных виварiях (клиниках лабораторных животных). Размещение, содержание и уход за лабораторными животными должны соответствовать ГОСТ 33215, ГОСТ 33216. В помещении, где содержатся животные, следует поддерживать физиологически оптимальные условия внешней среды (для крыс и мышей большинства линий — это температура от 21 °С до 23 °С и относительная влажность от 45 % до 65 %). Животные должны содержаться в клетках из нетоксичного биологически инертного материала на нетоксичной подстилке из натуральных (природных) материалов по две—четыре особи или индивидуально (по одному). Минимальную площадь, приходящуюся на одно животное в клетке (крысу, мышь), устанавливают в соответствии с ГОСТ 33216. Агрессивных животных (в частности, мышей некоторых линий) содержат по одному в клетке. Режим освещенности в помещении, где находятся животные, должен соответствовать чередованию светлых и темных периодов продолжительностью 12 ч каждый. Обогащение среды обитания (environmental enrichment) по ГОСТ 33216, включающее устройство укрытий для животных, является желательным (рекомендуемым).

4.10 Кормление животных следует осуществлять сбалансированными рационами по ГОСТ 34566, обеспечивающими физиологические потребности животных во всех основных пищевых веществах и энергии. На протяжении всего периода исследований (испытаний) по определению острой токсичности животные получают рацион в режиме неограниченного свободного доступа, за исключением периодов, указанных в 5.5.

4.11 Качество воды, предоставляемой лабораторным животным, должно соответствовать гигиеническим требованиям. Для животных используют воду, полученную методом обратного осмоса, сбалансированную по минеральному составу, или бутилированную питьевую столовую воду, соответствующую требованиям технических регламентов и нормативных правовых актов, действующих на территории государства, принявшего стандарт. Для питья животных не допускается использовать дистиллированную, деионизованную воду, а также воду из централизованных источников водоснабжения без дополнительной подготовки (очистки). Питьевую воду на протяжении всего периода исследований (испытаний) по определению острой токсичности предоставляют животным в режиме неограниченного доступа.

Примечание — Информация о технических регламентах и нормативных правовых актах приведена в приложении А.

5 Описание метода определения острой токсичности

5.1 Принцип метода состоит в установлении наличия патологических проявлений — летальности (смертности) или других признаков токсичности у животных в первые 24 ч и в последующие как минимум 13 сут после однократного или многократного (в случае введения по частям на протяжении 2—6 ч) введения животным фиксированной дозы ферментного препарата в виде жидкости (водного раствора) внутрижелудочно через зонд. В результате проводимых наблюдений оценивают среднюю смертельную дозу (LD_{50}) и на основании этих данных ферментный препарат классифицируют по величине острой пероральной токсичности (классы I—V) по ГОСТ 32644.

5.2 Дозу ферментного препарата, вводимого животным, выражают в миллиграммах на килограмм массы тела в расчете на количество ООВ в препарате. Содержание ООВ, выраженное в процентах, рассчитывают как 100 % минус влажность препарата (содержание воды) в процентах, минус содержание золы в процентах, минус содержание добавленных при производстве ферментного препарата органических веществ — носителей в процентах. Отбор проб ферментного препарата на определение ООВ проводят, как указано в 4.6. Определение влажности ферментных препаратов проводят термогравиметрическим методом по ГОСТ 20264.1. Проведение определения содержания золы в ферментном препарате — путем минерализации (прокаливания) образца ферментного препарата в муфельной печи гравиметрическим методом по ГОСТ 15113.8. Количество добавленных при производстве ферментного препарата органических веществ — носителей устанавливают в соответствии со спецификацией на ферментный препарат.

Примечание — Для ферментных препаратов, в зависимости от состава добавляемого при производстве носителя, допускается использование также других стандартизованных и валидированных методов опреде-

ления влажности и золы*, а также, в отдельных случаях, использование спецификации, предоставляемой производителем ферментного препарата.

5.3 Ферментные препараты поступают для определения острой токсичности в виде сухих продуктов (порошков) или в виде водных растворов. В первом случае ферментный препарат перед введением животным растворяют или диспергируют в дистиллированной или другой воде, соответствующей 4.11; количество растворителя подбирают с учетом влажности используемого порошка для достижения требуемой фиксированной дозы ферментного препарата ООВ. Во втором случае ферменный препарат вводят животным непосредственно в объеме, соответствующем необходимой вводимой дозе в расчете на ООВ. В случае недостаточного содержания ООВ в предоставленном растворе ферментного препарата для обеспечения требуемой дозы в расчете на ООВ ферментный препарат может быть сконцентрирован (обезвожен) одним из способов, исключающих его физико-химические изменения или снижение ферментативной активности.

5.4 В случае плохой растворимости или диспергируемости ферментного препарата в воде допускается использование при его растворении физиологического раствора (0,15 М NaCl) или фосфатно-солевого буфера (0,01 М фосфат натрия или калия pH 7,3 ± 0,2 с 0,15 М NaCl). Не допускается при введении ферментного препарата его растворение в концентрированных растворах солей, щелочах, кислотах (в том числе органических), а также в органических растворителях (включая этиловый спирт).

5.5 Перед введением ферментного препарата животным их лишают корма: крыс — за 12—16 ч, мышей — за 3—4 ч; корм также не предоставляют в течение всего времени введения ферментного препарата (при использовании дробного дозирования — по 5.7), а также на протяжении 2 ч по окончании введения.

5.6 При введении ферментных препаратов животным используют шприц объемом 1—10 $см^3$ по ГОСТ ISO 7886-1 или ГОСТ 22967, оснащенный внутрижелудочным зондом (трубкой с оливой на конце). Геометрические размеры зонда должны соответствовать анатомическим параметрам животного данного вида, пола и возраста и исключать, с одной стороны, травматизацию животного, а с другой — обеспечивать количественное внутрижелудочное поступление дозы ферментного препарата. При введении ферментного препарата крысам длина зонда не должна превышать 90—100 мм, диаметр оливы — 4 мм; при введении мышам — 30—40 мм и 1 мм соответственно.

Примечание — В процессе введения раствора ферментного препарата животным особое внимание следует уделять недопустимости его поступления в дыхательные пути (аспирации). Это связано с тем, что многие ферментные препараты (главным образом, обладающие протеолитической активностью) обладают выраженным повреждающим действием на эпителий верхних и нижних дыхательных путей, что может значительно исказить результаты исследований (испытаний). Для исключения аспирации ферментного препарата следует тщательно фиксировать (удерживать) животное в вертикальном положении и обеспечивать плавное введение препарата, убедившись, что зонд находится в желудке.

5.7 Максимально допустимый однократно вводимый объем водного раствора ферментного препарата животным не должен превышать 20 $см^3$/кг массы тела. Если в указанном объеме жидкости невозможно разместить необходимую дозу ферментного препарата (вследствие его малой растворимости или недостаточного содержания в растворе), доза может быть разделена на две-три порции, вводимые с интервалом не менее 2 ч на протяжении не более 6 ч после первого введения.

Примечание — Для концентрирования ферментных препаратов допускается использование процессов вакуумного концентрирования (упаривания при пониженном атмосферном давлении) при температуре не выше 37 °С и лиофильной (сублимационной) сушки.

5.8 Показатель pH перорально вводимого водного раствора или суспензии ферментного препарата должен составлять pH 6,0 ± 2,0. При значительном отклонении pH ферментного препарата за пределы указанного интервала величина pH может быть отрегулирована путем добавления разбавленных водных растворов кислоты (HCl) или щелочи (NaOH) квалификации не ниже «ХЧ».

5.9 Определение острой пероральной токсичности ферментных препаратов методом фиксированной дозы проводят в два этапа. Принцип метода соответствует ГОСТ 32296. Цель первого, пред-

* Перечень рекомендуемых методов исследований для оценки показателей качества пищевой продукции, включая определение золы, приведен в МР 2.3.7.0168-20 «Оценка качества пищевой продукции и оценка доступа населения к отечественной пищевой продукции, способствующей устранению дефицита макро- и микронутриентов».

варительного, этапа исследования (испытания) состоит в подборе подходящей начальной дозы для основного исследования, проводимого на репрезентативной по численности группе животных (обычно общей численностью шесть особей). Предварительное исследование (испытание) считают завершенным, если может быть принято решение о величине начальной дозы для основного исследования (испытания) или если при минимальной вводимой дозе ферментного препарата (5 мг/кг массы тела) происходит смерть животного.

5.10 При проведении предварительного исследования (испытания) в начале одному животному (одномоментно или по частям, см. 5.7) вводят ферментный препарат в дозе 300 мг/кг массы тела в расчете на ООВ, что соответствует верхней границе класса острой токсичности III по ГОСТ 32644. После этого проводят наблюдение за состоянием животного в течение 24 ч во временные интервалы по 5.11. В случае наступления смерти животного переходят к введению следующему животному меньшей дозы (50 мг/кг) и далее, в случае смертельного исхода, 5 мг/кг с соответствующим наблюдением за последствиями этих введений, также на протяжении 24 ч. В случае, если животное после введения фиксированной дозы остается живым, но в течение 24 ч отмечается развитие выраженных признаков токсичности, проявляющихся в изменении со стороны его поведения и внешнего вида (атаксия, летаргия, судороги, диарея, нарушения состояния кожного и шерстяного покрова и слизистых оболочек), предварительное испытание считают завершенным и установленную дозу затем используют в основном исследовании. В случае, если животное умирает в течение 24 ч после введения минимальной дозы ферментного препарата (5 мг/кг массы тела), данный результат подтверждают введением той же дозы дополнительно еще одному животному, после чего исследование считают завершенным и ферментному препарату присваивают класс острой токсичности I по ГОСТ 32644. Если каких-либо патологических изменений во внешнем виде и поведении животного, получившего дозу 300 мг/кг массы тела, не происходит в течение 24 ч, переходят к введению этому же животному дозы 2000 мг/кг массы тела. Далее, независимо от результатов тестирования, последнюю указанную дозу используют в основном исследовании.

После установления начальной дозы на предварительном этапе исследования (испытания) осуществляют переход на основной этап исследования (испытания), когда определенную фиксированную начальную дозу препарата вводят репрезентативной группе животных.

Примечание 1 — Животное, участвовавшее в предварительном этапе исследования (испытания) и получившее выбранную начальную фиксированную дозу, прибавляют к группе животных, участвующих в основном исследовании (испытании) (например, если общая численность животных в группе составляет шесть особей, то введение выбранной на предварительном этапе дозы ферментного препарата проводят пяти (шесть минус один) животным.

Примечание 2 — Временной интервал между введением первой и второй (последующей) дозы ферментного препарата должен составлять не менее 24 ч.

5.11 При проведении основного исследования (испытания) группе пяти животных того же вида, линии, пола и возраста, что и животные, использованные в предварительном этапе исследования (испытания), внутрижелудочно вводят дозу ферментного препарата, установленную на предварительном этапе исследования (испытания). Наблюдение за состоянием животных проводят в следующие временные интервалы после введения дозы: 30 мин, 60 мин, 90 мин, 120 мин, 3 ч, 4 ч, 5 ч, 6 ч, 24 ч, далее ежесуточно на протяжении последующих 13 сут. В ходе наблюдений фиксируют массу тела (до введения ферментного препарата, на первые, седьмые и четырнадцатые сутки), состояние кожного и шерстяного покрова, слизистых оболочек, появление симптомов циркуляторного расстройства (цианоз конечностей), диарею, слюноотделение, тремор, судороги, атаксию, летаргию, сон и кому, смертельный исход. Если животное остается живым, но очевидно испытывает сильные страдания (например, при неспособности дотянуться до источника корма или воды), оно должно быть подвергнуто гуманной эвтаназии по 4.7, и такой исход эксперимента засчитывают как смертельный (летальный). По истечении 14 сут после введения дозы ферментного препарата выживших животных подвергают гуманной эвтаназии по 4.7. Всех павших животных и животных, подвергнутых эвтаназии, подвергают обзорному патологоанатомическому исследованию в как можно более короткие сроки после гибели (умерщвления) по схеме: органы брюшной полости (печень, почки, надпочечники, селезенка, поджелудочная железа, желудок, тонкая кишка, слепая кишка, толстая кишка, желчный пузырь (у мышей), органы репродуктивной системы); органы грудной клетки: легкие, сердце, пищевод, тимус; щитовидная железа; головной мозг. Отдельно фиксируют наличие воспаления, асцита, плеврального и краниального экссудатов, абсцессов, новообразований и других патологических изменений. Ткани новообразований (при их наличии) отбирают и

фиксируют в 3,7 %-ном растворе нейтрального формальдегида для последующего гистопатологического исследования. Гистологическое исследование других органов и тканей проводят при наличии показаний, определяемых результатом патологоанатомического исследования или присутствием в ферментном препарате примесей с известным токсическим действием. При наличии сомнений в нормальном анатомическом строении органов и тканей животных проводят сравнение результатов наблюдений со справочной информацией по животным данного вида.

Примечание 1 — Если введение дозы ферментного препарата проводят по частям по 5.7, то наблюдение за состоянием животных проводят с интервалом 30 мин в период введения дозы и далее — во временные интервалы по 5.11 по окончании последнего введения.

Примечание 2 — Животное из предварительного этапа исследования (испытания), получившее выбранную для основного исследования (испытания) дозу ферментного препарата, добавляют к основной группе, и за его состоянием наблюдают в те же временные периоды после введения, что и за остальными животными этой группы.

5.12 В исключительных случаях при отсутствии патологических изменений в течение 14 сут у всех животных, получивших дозу 2000 мг/кг массы тела, возможен переход к введению следующей группе животных дозы 5000 мг/кг массы тела (что соответствует верхней границе класса острой токсичности V по ГОСТ 32644), однако последнее должно быть обосновано особыми условиями планируемого применения изучаемого ферментного препарата (например, если его используют при производстве продуктов для детского питания, специализированных продуктов диетического лечебного и диетического профилактического питания).

6 Данные исследования и отчет

6.1 Определение класса острой токсичности ферментного препарата проводят в соответствии с ГОСТ 32296, ГОСТ 32644 на основании данных предварительного и основного этапов исследования (испытания) острой токсичности.

6.2 При общей численности животных в группе основного исследования (испытания) шесть особей [включая животное, использованное в предварительном исследовании (испытании)] гибель не более двух и не менее одного животного (при наличии, в последнем случае, выраженных признаков токсичности не менее, чем у двух других животных) свидетельствует о принадлежности ферментного препарата к классу токсичности, соответствующему примененной фиксированной дозе (см. приложение Б, таблицу Б.1). Если в течение 14 сут после введения фиксированной дозы ферментного препарата отмечается гибель трех и более животных в группе, исследование по 5.11 должно быть повторено со сниженной дозой препарата (см. приложение Б, таблицу Б.1). В случае отсутствия гибели животных в группе (за исключением группы, получившей ферментный препарат в дозе 2000 мг/кг массы тела) исследование по 5.11 должно быть повторено с увеличенной дозой препарата. Если в группе животных, получавших ферментный препарат в дозе 2000 мг/кг, отмечаются гибель или выраженные признаки токсичности не более, чем у одного животного, или гибель животных и/или признаки токсичности отсутствуют, ферментный препарат характеризуется как имеющий класс токсичности V (LD_{50} > 2000 мг/кг). Если исследование проводят с дозой ферментного препарата 5000 мг/кг и гибель животных при этом отсутствует, ферментный препарат характеризуется как нетоксичный, не классифицируемый (LD_{50} > 5000 мг/кг).

6.3 Отчет об определении острой токсичности ферментного препарата должен содержать следующую информацию:

а) вводная часть:

1) наименование заказчика исследования, его адрес,

2) наименование лаборатории, проводящей исследования, ее адрес, сведения об аккредитации (при наличии),

3) даты начала и окончания проведения исследования,

4) наименование ферментного препарата,

5) ингредиентный состав ферментного препарата,

6) вид ферментативной активности(ей), представленной(ых) в ферментном препарате, величина активности в стандартизованных единицах (при их наличии),

7) реквизиты штамма-продуцента: видовая принадлежность; наименование или номер штамма; трансформационное(ые) событие(я), использованное(ые) при получении штамма (при наличии); сведения о депонировании в национальной коллекции микроорганизмов (при наличии),

8) сведения о государственной регистрации ферментного препарата и/или штамма продуцента как пищевой продукции нового вида (при наличии),

9) физическое состояние ферментного препарата (жидкий/сухой),

10) данные исследования показателей безопасности ферментного препарата в соответствии с требованиями технических регламентов и нормативных правовых актов, действующих на территории государства, принявшего стандарт.

Примечание — Информация о технических регламентах и нормативных правовых актах приведена в приложении А;

б) условия дозирования ферментного препарата:

1) содержание ООВ в ферментном препарате,

2) растворитель (если использовался),

3) метод концентрирования жидкого ферментного препарата (если проводилось),

4) дозы ферментного препарата, вводимые животным в предварительном и основном исследовании, мг/кг массы тела в расчете на ООВ;

в) подопытные животные:

1) род/вид,

2) линия/порода (при наличии сведений),

3) микробиологический статус животных, если известен (обычные, свободные от специфических патогенов животные),

4) пол животных, возраст,

5) количество животных в группе, условия содержания, применяемый рацион;

г) результаты испытания:

1) представление в виде таблицы данных о реакции каждого подопытного животного на пероральное введение ферментного препарата для каждой введенной дозы на предварительном и основном этапе исследования (испытания), включая наличие смертельного (летального) исхода, наличие, длительность и обратимость (необратимость) выраженных признаков токсичности по 5.11, данные патологоанатомического исследования, данные гистопатологического исследования (при наличии),

2) представление в виде таблицы результатов измерения массы тела каждого животного до введения ферментного препарата, через одну неделю (при наличии) и при выведении из исследования,

3) срок гибели животного, если она произошла до запланированного выведения из исследования,

4) указание летальных доз в исследовании;

д) обсуждение и истолкование результатов:

1) установление LD_{50} в соответствии с классификатором (см. приложение Б) для исследуемого ферментного препарата на основе полученных данных,

2) классификация ферментного препарата в соответствии с классом острой токсичности (см. приложение Б),

3) другие положения, имеющие значение для интерпретации полученных данных;

е) выводы.

Приложение А
(справочное)

Информация о применяемых технических регламентах и нормативных правовых актах в государствах — участниках СНГ

Таблица А.1

Технический регламент или нормативный правовой акт	Государство — участник СНГ
Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции»	AM, BY, KZ, KG, RU
Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 029/2012 «Требования безопасности пищевых добавок, ароматизаторов и технологических вспомогательных средств»	AM, BY, KZ, KG, RU
Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 044/2017 «О безопасности упакованной питьевой воды, включая природную минеральную воду»	AM, BY, KZ, KG, RU

Приложение Б
(обязательное)

Порядок классифицирования острой токсичности ферментных препаратов на основании данных проведенного исследования

Таблица Б.1 — Схема классифицирования ферментного препарата по его острой токсичности

Перорально вводимая доза ферментного препарата, мг/кг массы тела	Данные наблюдения за группой животных в течение 14 сут	Исход исследования (испытания)	Класс острой токсичности по ГОСТ 32644
5	А	LD_{50} < 5 мг/кг	I
	Б	5 мг/кг < LD_{50} < 50 мг/кг	II
	В	Повторить исследование с дозой 50 мг/кг	—
50	А	Повторить исследование с дозой 5 мг/кг	—
	Б	50 мг/кг < LD_{50} < 300 мг/кг	III
	В	Повторить исследование с дозой 300 мг/кг	—
300	А	Повторить исследование с дозой 50 мг/кг	—
	Б	300 мг/кг < LD_{50} < 2000 мг/кг	IV
	В	Повторить исследование с дозой 2000 мг/кг	—
2000	А	Повторить исследование с дозой 300 мг/кг	—
	Б	2000 мг/кг < LD_{50} < 5000 мг/кг	V
	В	Завершить исследование (испытание) *	

Данные наблюдения:

А — гибель трех и более животных в группе.

Б — гибель двух животных или гибель одного животного плюс выраженные признаки токсичности не менее чем у двух других животных в группе.

В — гибель или выраженные признаки токсичности не более чем у одного животного в группе или гибель животных и/или признаки токсичности в группе отсутствуют.

* Повторение исследования (испытания) с дозой 5000 мг/кг должно быть дополнительно обосновано по 5.12.

УДК 57.044:57.084.1:577.15:613.2:616-092.9:006.354

МКС 07.080
07.100

Ключевые слова: ферментные препараты, технологические вспомогательные средства, доклинические испытания, острая токсичность, лабораторные животные

Редактор *З.А. Лиманская*
Технический редактор *И.Е. Черепкова*
Корректор *О.В. Лазарева*
Компьютерная верстка *И.Ю. Литовкиной*

Сдано в набор 29.10.2024. Подписано в печать 07.11.2024. Формат 60×84⅛. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 2,32. Уч-изд. л. 1,90.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Создано в единичном исполнении в ФГБУ «Институт стандартизации»
для комплектования Федерального информационного фонда стандартов,
117418 Москва, Нахимовский пр-т, д. 31, к. 2.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru