МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
по установлению и обоснованию гигиенических нормативов содержания химических примесей, биологических агентов в пищевой продукции по критериям риска для здоровья человека

1. Настоящий документ разработан в целях унификации исходной информации, способов ее обработки и методического обеспечения процедуры разработки новых и планового пересмотра существующих гигиенических нормативов содержания химических примесей, биологических агентов в пищевой продукции по критериям риска для здоровья человека, включенных в Единые санитарно-эпидемиологические и гигиенические требования к продукции (товарам), подлежащей санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю), и технические регламенты Таможенного союза (Евразийского экономического союза).

Установление максимально допустимых уровней пестицидов осуществляется с учетом данных согласно подразделу 4 «Критерии оценки безопасности пестицидов и их действующих веществ» раздела 15 «Требования к пестицидам и агрохимикатам» Единых санитарно-эпидемиологических и гигиенических требований к продукции (товарам), подлежащей санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю), и в соответствии с законодательством государства – члена Евразийского экономического союза.

2. Общие положения.

2.1. Установление по итогам разработки или пересмотра гигиенических нормативов содержания химических примесей, биологических агентов в пищевой продукции по критериям риска и его эволюции производится с соблюдением следующих принципов:

gost.e-ecolog.ru

- приоритет безопасности, сохранения здоровья над любыми другими элементами качества жизни – один из ключевых принципов как системы гигиенического нормирования, так и методологии анализа риска здоровью;

- научное обоснование методов и критериев – оценка риска должна основываться на всех доступных научных данных, количественная информация должна быть использована в максимально возможной степени;

- использование всей релевантной информации предполагает необходимость проведения максимально полного использования данных, в том числе содержащихся в международно признанных источниках и базах данных с приоритетом результатов эпидемиологических исследований;

- реалистичность сценариев экспозиции – формирование сценариев, отражающих в максимальной степени сложившуюся ситуацию, позволяющих избежать как недооценки, так и переоценки риска. В то же время должны рассматриваться сценарии, учитывающие особенности групп населения с высокой чувствительностью и наиболее подверженных риску;

- этапность процедуры – оценка риска должна предусматривать четыре стадии оценки риска (идентификацию опасности, оценку зависимости «экспозиция – эффект (ответ)» (характеристику опасности), оценку воздействия (экспозиции) и характеристику риска);

- транспарентность оценки риска – описание всех процедур, исходных и промежуточных данных, результатов оценки риска, а также логическое обоснование, логика развития, ограничивающие факторы, исходные допущения, оценочные суждения, решения, недостатки и неопределенности представленного заключения полностью

и систематически констатируются, документируются и доступны для ознакомления;

- документальное оформление процедуры и результатов – итоговый документ по оценке риска должен содержать указания на любые ограничения, неопределенности, допущения и их влияние на оценку риска. Заключение по оценке риска следует представлять в форме, легкой для понимания лиц, принимающих решение по управлению риском;

- пересмотр результатов оценки риска здоровью в свете вновь полученных научных данных – основанием для пересмотра могут служить сведения из релевантных источников об обосновании новых параметров для оценки риска здоровью (референтных уровнях факторов опасности, моделях зависимости «экспозиция – эффект», существенных уточнениях сценариев экспозиции и пр.), научно обоснованном включении/исключении дополнительных факторов риска.

2.2. Гигиенические нормативы содержания химических примесей, биологических агентов в пищевой продукции по критериям риска устанавливаются для отдельных групп (или отдельных видов) пищевой продукции.

2.3. Гигиенические нормативы содержания химических примесей, биологических агентов в пищевой продукции должны обеспечивать безопасность (отсутствие недопустимого (неприемлемого) риска) для здоровья человека при разумном потреблении пищевой продукции.

2.4. Методические подходы к установлению гигиенических нормативов содержания химических примесей, биологических агентов в пищевой продукции не должны противоречить основным международным документам («Рабочие принципы проведения анализа риска в области безопасности продуктов питания для применения

правительствами. CAC/GL 62-2007», Директива 2001/95/ЕС об общей безопасности продукции, Регламент ЕС 2002/178/ЕС об общих принципах и требованиях пищевого права и установлении процедур в области безопасности пищи) и методологии, рекомендованной Евразийской экономической комиссией (Методология оценки рисков здоровью населения при воздействии химических, физических и биологических факторов для определения показателей безопасности продукции (товаров)/ Евразийская экономическая комиссия. – М.: Книжный формат, 2014. – 115 с.).

2.5. До установления уровней допустимого риска загрязнителей пищевой продукции для здоровья человека в качестве критерия безопасности используются уровни приемлемого риска здоровью.

2.6. При установлении гигиенических нормативов содержания химических примесей, биологических агентов в пищевой продукции результаты оценки риска, выполненные по результатам эпидемиологических исследований, рассматриваются как приоритетные.

2.7. Установление гигиенических нормативов содержания химических примесей, биологических агентов в пищевой продукции по критериям риска для здоровья производится при помощи последовательного выполнения следующих действий (рисунок 1):

- сбор и анализ информации о результатах проведенных ранее исследований по оценке воздействия содержания химических примесей и/или биологических агентов в пищевой продуции на здоровье человека;

- при недостаточности информации, необходимой для установления допустимой суточной дозы (далее – ДСД)/уровня условно

переносимого потребления (далее – УПП) - проведение лабораторных и/или эпидемиологических исследований;

- выбор отправных точек и обоснование модифицирующих факторов для расчета ДСД;

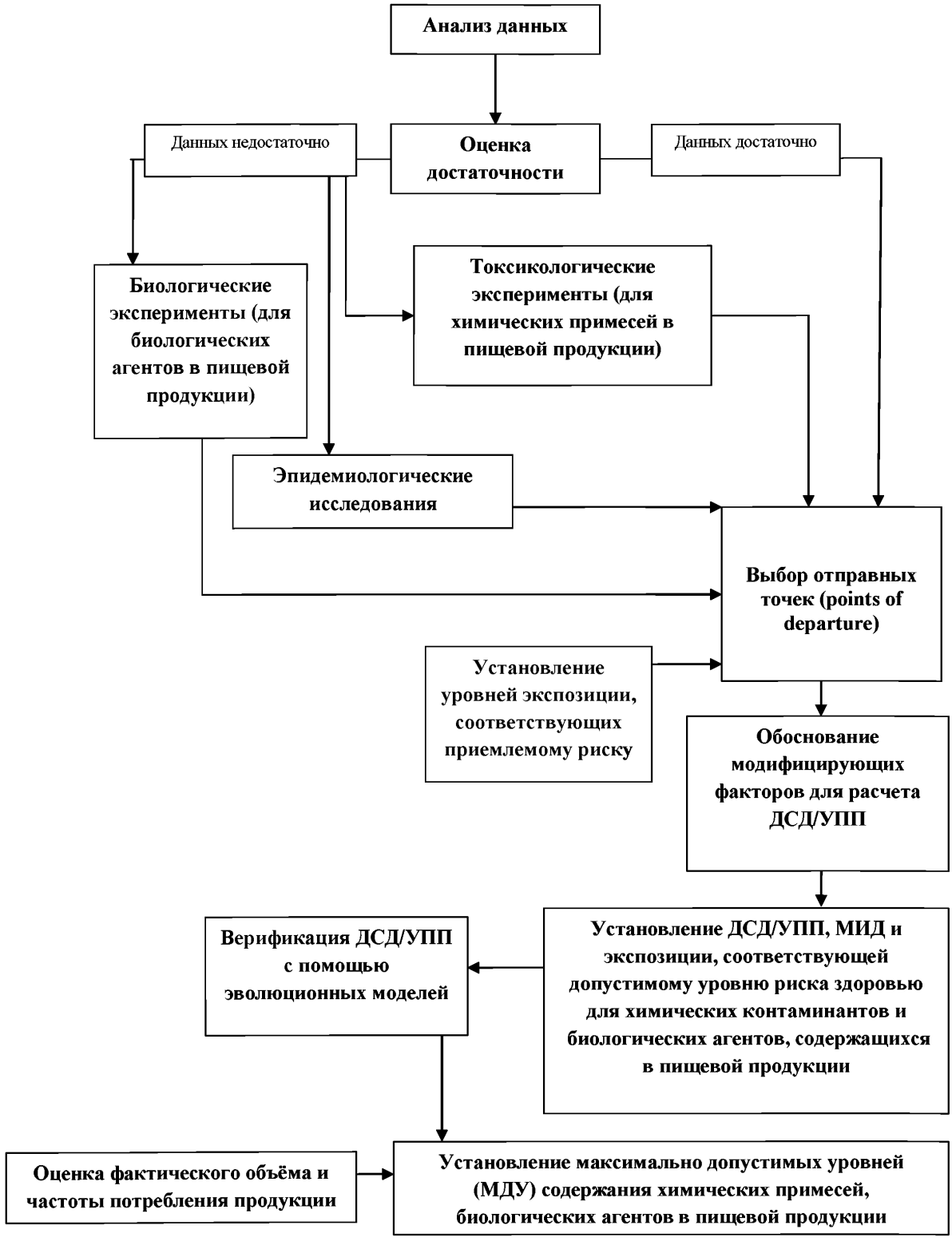
- установление ДСД и, для химических веществ, способных накапливаться в организме, УПП и/или уровней экспозиции, соответствующих приемлемому риску;

- верификация ДСД/УПП химических контаминантов и биологических агентов в пищевой продукции с помощью эволюционных моделей;

- оценка фактического объёма и частоты потребления пищевой продукции;

- установление максимально допустимых уровней (далее – МДУ) содержания химических примесей, биологических агентов в пищевой продукции.

Рисунок 1. Алгоритм установления гигиенических нормативов содержания химических примесей, биологических агентов в пищевой продукции по критериям риска для здоровья



2.8. Пересмотр гигиенических нормативов содержания химических примесей, биологических агентов в пищевой продукции осуществляется при обосновании новых параметров для оценки риска здоровью и научно обоснованном включении/исключении дополнительных факторов риска, а также в связи с существенным изменением потребления отдельных групп (или отдельных видов) пищевой продукции.

2.9. Если по результатам токсиколого-гигиенической оценки и идентификации опасности для здоровья выявлена низкая токсичность химических примесей или низкая вирулентность биологических агентов и их незначительный уровень потребления с пищевой продукцией, может быть принято решение о нецелесообразности разработки такого гигиенического норматива по критериям риска здоровью.

3. Выбор релевантной информации для установления гигиенических нормативов содержания химических примесей, биологических агентов в пищевой продукции по критериям риска.

При выборе релевантной информации применяется система критериев:

- адекватность источников информации (рецензирование, документированность);

- достоверность (подтверждение из других источников, корректные методы математической обработки и пр.);

- описание условий получения информации (обзор, эксперимент, эпидемиологическое исследование);

- наличие количественных характеристик экспозиции и эффектов (ответов);

- наличие сведений о контингентах риска.

3.1. Оценка адекватности источников информации производится в зависимости от вида информации: документированная на бумажных и электронных носителях и недокументированная (базы данных).

Оценка релевантности источников документированной информации осуществляется по показателям наличия рецензирования и необходимых реквизитов.

Источник документированной информации признается адекватным, если включен в общепризнанные системы цитирования, предполагающие обязательное рецензирование публикуемой информации (например, Web of Science, Scopus, РИНЦ и пр.). Дополнительным показателем адекватности может служить наличие необходимых реквизитов (например, DOI для печатных изданий, регистрационный номер для нормативно-правовых документов).

Для недокументированных источников (базы данных) показателем их адекватности будет являться принадлежность к международным и национальным государственным структурам (например, Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), Комиссии Кодекс Алиментариус, Агентству по охране окружающей среды США и пр.). Признаком адекватности недокументированных источников является также включение их в перечень источников информации, рекомендуемых для использования при оценке риска здоровью национальными органами государственного управления.

3.2. Источник информации считается достоверным, если методы математической обработки соответствуют массиву исходных данных и его характеристикам (объему, распределению). Признаками достоверности источника являются также результаты оценки обоснованности применяемых методов обработки данных, наличия математической постановки или ссылок на нее, обоснования вида

и выбора моделей, оценка массива данных. Для установления корректности методов математической обработки данных требуется оценка результатов статистической обработки экспериментальных данных, (определение среднего арифметического, дисперсии, моды и медианы и пр.). Подтверждение аналогичной информации из других источников (не менее двух) является одним из дополнительных важных признаков достоверности.

Кроме того, оценка достоверности источников информации проводится с помощью определения статуса ученого и его репутации в научном мире. Статус ученого определяется характеристиками: научная степень, звание, премии и награды, индекс цитируемости.

3.3. Источник информации признается адекватным, если в нем присутствует информация об условиях ее получения. Если источник носит характер научного обзора, признаком его адекватности является наличие ссылок на другие релевантные источники информации, обобщения опубликованных результатов оригинальных исследований. Если источник содержит результаты оригинальных исследований, в нем должна быть приведена полная информация о цели этих исследований, количественное описание условий их проведения, первичных данных и статистической обработки результатов.

3.4. Для задач установления гигиенических нормативов содержания химических примесей, биологических агентов в пищевой продукции по критериям риска важным критерием релевантности информации является наличие количественных характеристик экспозиции и эффектов (ответов) со стороны здоровья на эту экспозицию.

Как правило, количественной характеристикой экспозиции является доза химических примесей и отдельных биологических

агентов. В качестве количественной характеристики экспозиции биологических агентов, для которых не установлена зависимость величины ответа от количества микроорганизмов и/или дозы токсинов рассматривается вероятность потребления контаминированной пищевой продукции. Количественной характеристикой эффекта химических примесей следует считать негативное изменение клинико-лабораторных показателей, а ответа – распространенность нарушений здоровья в виде заболеваний, их симптомов или результатов клинико-лабораторных показателей, свидетельствующих о нарушении функций организма. В отношении ответов на воздействие биологических агентов количественной характеристикой является распространенность инфекционных и паразитарных заболеваний.

3.5. Для задач установления гигиенических нормативов содержания химических примесей, биологических агентов в пищевой продукции по критериям риска еще одним важным критерием релевантности информации является наличие сведений о контингентах риска. В качестве контингентов риска могут быть выделены группы с наибольшим потреблением отдельных групп (или отдельных видов) пищевой продукции, наиболее чувствительные к воздействию химических примесей и биологических агентов субпопуляции населения (дети, беременные и кормящие женщины, лица с иммунными нарушениями и др.).

Для этих контингентов должны быть отдельно выделены количественные характеристики экспозиции с описанием ее сценария и эффектов с расшифровкой их содержания при различных уровнях экспозиции.

Для обоснования источников информации производятся следующие действия:

- изучение цитируемости и рейтинга источников информации;

- анализ статуса источника, рецензентов;

- проверка актуальности и обновляемости источника;

- оценка наличия математической постановки или ссылок на нее;

- оценки обоснованности применяемых методов обработки данных;

- обоснования вида и выбора моделей;

- оценка массива данных;

- проверка наличия результатов оригинальных исследований;

- проверка наличия результатов первичных данных и статистической обработки результатов;

- проверка наличия количественных характеристик экспозиции и эффектов (ответов);

- проверка наличия сведений о контингентах риска.

Таким образом, источник информации является релевантным при соответствии этим критериям.

4. Требования к проведению токсикологических экспериментов и необходимого набора тестов и методик проведения токсикологических экспериментов для обоснования ДСД/УПП, что необходимо для установления гигиенических нормативов содержания химических примесей в пищевой продукции по критериям риска здоровью человека и его эволюции.

4.1. Алгоритм изучения токсикологических профилей идентифицированных в пищевой продукции веществ, содержащихся в химических примесях.

Аналитическо-информационный поиск об исследуемом веществе, включающий сведения о составе и химическом строении, физико-химических свойствах, результатах токсикологических испытаний

in vivo и *in vitro*, токсикологические данные о структурно родственных (подобных) веществах, позволяет определить перечень необходимых для проведения токсикологических экспериментов и способствует выбору адекватных доз (таблица 1).

Таблица 1

Алгоритм анализа результатов информационного поиска данных о чужеродных химических веществах в составе пищевой продукции

Показатель	Содержание анализа
1.Физико-химическая характеристика	
Наименование вещества	Указывается номер CAS RN, наименование вещества, его синонимы
Химический класс	Определяется химический класс, к которому относится соединение, что необходимо для оценки возможной токсичности вещества по сравнению с его химическими аналогами и планирования объема дальнейших экспериментальных исследований
Область применения	Необходимо для определения возможных путей поступления химического вещества
Назначение вещества	Необходимо для определения видов пищевой продукции, являющихся приоритетными источниками
Эмпирическая и структурная формула	Анализ структуры вещества позволяет сделать предварительные выводы о токсичности вещества
Молекулярная масса	Анализ молекулярной массы в гомологическом ряду позволяет прогнозировать токсичность вещества, при котором с увеличением его молекулярного веса возрастает токсичность, т.е. каждый последующий член гомологического ряда токсичнее предыдущего
Пути поступления в среду обитания	Позволяет определить группы пищевой продукции, являющиеся потенциальными источниками химического вещества в рационе
2. Физико-химические показатели	
Агрегатное состояние	Определяет токсичность вещества
Растворимость в различных средах (вода, масло).	Позволяет определить закономерности поступления токсикантов в организм и его распределение в органах и тканях
pH	Мера активности ионов водорода в растворе, которая количественно выражает кислотность
Реакционная способность, стабильность, трансформация в объектах окружающей среды	Определяет стойкость, гидролиз, окисляемость; способность к полимеризации, разложению вещества и т. д.
3. Токсиколого-гигиеническая характеристика	
DL_{50} перорально	Доза, вызывающая гибель 50% мышей или крыс при однократном внутрижелудочном введении вещества (срок

	наблюдения за животными – 14 суток), выражается в миллиграммах вещества на 1 килограмм массы животного (мг/кг)
DL_{50} дермально	Доза вещества, вызывающая гибель 50% животных при однократном эпикутанном нанесении (срок наблюдения за животными – 14 суток), выражается в миллиграммах вещества на 1 килограмм массы животного (мг/кг)
CL_{50} ингаляционно	Вызывает гибель 50% животных при ингаляционном воздействии в течение двух часов для мышей и четырех часов для крыс (срок наблюдения за животными – 14 суток), выражается в миллиграммах вещества на 1 метр кубический воздуха (мг/м^3)
Раздражающее действие на кожу и слизистые оболочки глаза	Способность вещества в условиях однократного или повторного воздействия оказывать раздражающее действие на кожные покровы или слизистые
Субхроническая и хроническая токсичность	Неблагоприятные эффекты, установленные в субхронических и хронических экспериментах
Специфические и отдаленные эффекты в тестах *in vivo* и *in vitro* (аллергенность, тератогенность, эмбриотоксичность, репродуктивная токсичность, мутагенность, канцерогенность)	Специфические и отдаленные эффекты, установленные в тестах *in vivo* и *in vitro*
Гигиенические нормативы в различных объектах среды обитания: воздух рабочей зоны, атмосферный воздух, питьевая вода, уровень загрязнения кожных покровов	Необходимы для учета поступления в организм вещества с учетом различных путей

Для идентификации и характеристики химических контаминантов целесообразно использовать данные из профилей опасностей (токсикологических профилей), приведенных в базах данных и информационных ресурсах, включающих информацию о физико-химических свойствах и токсиколого-гигиенической характеристики веществ (таблица 2).

Таблица 2

Перечень наиболее распространенных баз данных и информационно-поисковых ресурсов для токсикологической оценки химических контаминантов

№	Наименование и краткое описание ресурса	Ссылка
1	Федеральный регистр потенциально опасных хим. и биол. веществ. Включает общую информацию о химическом веществе: идентификационные данные, область применения, агрегатное состояние, форму выпуска, СИЗ, клиническую картину острого отравления, наиболее поражаемые органы и системы, раздражающее действие на кожу и глаза и первую помощь при отравлениях	gost.e-ecolog.ru
2	GENE-TOX - база данных с информацией о мутагенности химических веществ. Входит в TOXNET Databases.	gost.e-ecolog.ru ewtoxnet/genetox.htm
3	База данных Объединенного исследовательского центра ЕС веществ, обладающих канцерогенным и/или мутагенным потенциалом	gost.e-ecolog.ru ecvam.irc.ec.euroDa.eu/databases/genotoxicitv-carcinogenicitv-db
4	База данных свойств химических веществ GESTIS	gost.e-ecolog.ru
5	Банк данных свойств опасных веществ HSDB (Hazardous Substances Data Bank), включает общирную информацию о свойствах химических веществ, в том числе данные по токсикологии, экотоксикологии, отдаленных последствиях, физико-химических свойствах, воздействии на человека и др. Входит в TOXNET Databases	gost.e-ecolog.ru
6	ChemlDplus – база данных химических веществ с указанием их наименования, синонимов, структуры (в т.ч. 3D), сведений по токсичности и физико-химических свойств. Входит в TOXNET Databases	gost.e-ecolog.ru emidplus/
7	База данных Международного агентства по изучению рака (МАИР)	gost.e-ecolog.ru gents-classified-by-the-iarc/
8	База данных по канцерогенности Carcinogenic Potency Database (CPDB). Содержит резюме с результатами испытаний, в том числе на органы-мишени	gost.e-ecolog.ru ewtoxnet/cpdb.htm
	Поисковые системы	
9	TOXNET Databases (Национальная медицинская библиотека США) – ресурс по поиску баз данных по токсикологии, опасным химическим веществам, воздействию на здоровье и выбросам токсичных веществ. Осуществляется поиск по следующим ресурсам: HSDB, TOXLINE, ChemlDplus, LactMed, DART, TOXMAP, TRI, CTD, Household Products Database, Haz-Map, IRiS, ITER, ALTBIB, CCRIS, CPDB, GENE-TOX.	gost.e-ecolog.ru
10	Информация о безопасности химических веществ от межправительственных организаций INCH EM. Осуществляется поиск по следующим ресурсам: Concise International Chemical, Concise International	gost.e-ecolog.ru

	Chemical Assessment Document (CICADS), Environmental Health Criteria (EHC) monographs,Harmonization Project Publications, Health and Safety Guides (HSGs), International Agency for Research on Cancer (IARC) - Summaries and Evaluations, International Chemical Safety Cards (ICSCs), IPCS/CFC Evaluation of Antidotes Series,Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA), Monographs and evaluations, Joint Meeting on Pesticide Residues (JMPR) - Monographs and evaluations, Keml-Riskline, Poisons Information Monographs (PIMs), Screening Information Data Set (SIDS) for High Production Volume Chemicals, UK Poison Information Documents (UKPID)	
11	Портал ChemAgora Объединенного исследовательского центра Европейского союза. Осуществляется поиск по следующим ресурсам: NCI/CADD Chemical Identifier Resolver, PubChem's PUG REST Service, ChEMBL Data Web Services, Ketcher, eChemPortal, ChEMBL, ChEBI, ChemSpider, PubChem, ToxNet, ConsensusPathDB, CompTox Chemistry, Comparative Toxicogenomics Database (CTDbase), Common Chemistry; CREST; AOP Wiki.	http://chemagora.jrc.ec.europa.eu/chemagora/

Могут использоваться иные источники информации, надежность и достоверность данных в которых должна быть подтверждена ссылками на опубликованные источники.

В базах данных может быть получена дополнительная информация, которая необходима для оценки риска здоровью, ассоциированного с химическими веществами – NOAEL, LOAEL, Benchmark Dose (BMD), угол (фактор) наклона при пероральном поступлении (Slope Factor, SFo).

4.2. Изучение общетоксического действия.

Изучение общетоксического действия вещества позволяет определить зависимость «доза – ответ» и «время – ответ» и сопоставить связь между воздействующей дозой исследуемого химического вещества и токсическими эффектами.

Токсикологические эксперименты проводятся на лабораторных животных (грызунах – линейных/нелинейных белых крысах и/или

мышах, и/или животных, не являющихся грызунами), которые являются наиболее чувствительными к воздействию вещества по результатам аналитическо-информационного поиска. Исследование контаминанта на лабораторных животных, не являющихся грызунами, должно быть детально обосновано.

Изучение общетоксического действия включает определение острой, подострой, субхронической и хронической токсичности. Длительность токсикологического эксперимента определяется в зависимости от физико-химических свойств и токсикологической оценки химического вещества.

4.2.1. Изучение общетоксического действия на грызунах. Определение острой токсичности.

Используются экспериментальные животные обоего пола (мыши и/или крысы). Для выяснения возможных различий в половой резистентности животных к изучаемому веществу формируются равновеликие экспериментальные группы самцов и самок. При выявлении в процессе эксперимента тенденции к увеличению смертности особей одного пола суммарно во всех группах более чем на 20%, то различия считают существенными. В таком случае проводят дополнительные исследования по установлению параметров острой токсичности вещества отдельно для самок и самцов.

Число животных в группе должно быть не менее 6, путь введения: пероральный и парентеральный. Используется 4-5 доз, достаточных для расчета DL_{50} (интервал между дозами зависит от используемого в дальнейшем метода статистического расчета); если вещество обладает малой токсичностью, то следует ввести максимально возможную дозу при изучении острой токсичности с учетом технических возможностей. Если вещество находится в растворителе/носителе, то проводится

исследование острой токсичности растворителя/носителя (если не известны их токсикологические характеристики). Частота введения – однократно, период наблюдения за животными 14 суток. Среднесмертельная доза DL_{50} рассчитывается общепринятыми методами, например, пробит-анализом.

Экспериментальная программа: ежедневное наблюдение общего состояния, взвешивание животных 3 раза в течение периода наблюдения, вскрытие павших животных и всех выживших в конце эксперимента, макроскопическое описание, определение относительной массы органов и изучение гистологической структуры органов с выраженными макроскопическими изменениями.

4.2.2. Изучение подострой и субхронической токсичности.

Эксперимент проводится на одном виде взрослых животных обоего пола. Число животных в группе не менее чем по 10 особей обоего пола. Основной путь введения внутрижелудочный, используется три дозы с обязательным формированием контрольных групп самок и самцов; меньшая из исследуемых доз не должна вызывать интоксикацию животных, максимальная может вызывать признаки интоксикации у животных, средняя выбирается между ними (обычно используются 1/5 – 1/20 от установленной в исследованиях LD_{50}). Продолжительность введения вещества лабораторным животным – ежедневно в течение всего эксперимента. В случае, если для введения вещества требуется растворитель, то, наряду с интактным контролем, необходим контроль, получающий соответствующий растворитель.

Экспериментальная программа: ежедневная регистрация общего состояния, взвешивание 1 раз в неделю. До введения вещества и в течение эксперимента проводятся гематологические,

биохимические, физиологические исследования, анализ мочи, а при необходимости дополнительные исследования.

Погибшие в течение эксперимента животные подлежат вскрытию, макроскопическому описанию, органы взвешиваются и подвергаются гистологическому исследованию. По окончании опыта все животные в каждой группе подвергаются вскрытию, макроскопическому описанию, внутренние органы взвешиваются.

По завершении эксперимента проводятся гематологические и биохимические исследования. Гистологическому исследованию подвергаются, как правило, все контрольные животные и те, которые подвергались воздействию наибольшей дозы вещества. Внутренние органы животных остальных групп подвергаются гистологическому исследованию только при наличии в них макроскопических изменений.

4.2.3. Изучение хронической токсичности.

Используется один наиболее чувствительный вид животных с учетом их половой резистентности. Число животных в каждой группе должно быть не менее чем 20, путь введения внутрижелудочный, продолжительность введения составляет до 12 месяцев и более (при наличии существенной кумуляции или отнесении к высокотоксичным по LD_{50} веществам) при ежедневном введении.

В случае, если для введения вещества требуется растворитель, то, наряду с интактным контролем, необходим контроль, получающий соответствующий растворитель.

Выбор изучаемых доз в хроническом эксперименте базируется на результатах изучения острой, подострой и субхронической токсичности изучаемого химического вещества. Используется три дозы вещества с обязательным формированием контрольной группы: как правило, меньшая из исследуемых доз не должна вызывать

интоксикацию животных, максимальная может вызывать признаки интоксикации животных, средняя выбирается между ними.

Экспериментальная программа включает интегральные тесты, исследования мочи, гематологические, биохимические и физиологические исследования, а при необходимости дополнительные исследования (например, нагрузочные пробы).

Интегральные тесты: прирост массы тела, потребление пищи, общее поведение, осмотр, ректальная температура и иные тесты.

Физиологические исследования: тест «открытое поле», суммация подпороговых импульсов, электрокардиография и др.

Гематологические исследования: показатель гематокрита, гемоглобин, количество эритроцитов, цветовой показатель, скорость оседания эритроцитов, средний объем эритроцитов, количество лейкоцитов, лейкограмма, тромбоциты, ретикулоциты, миелограмма и иные.

Биохимические исследования сыворотки крови: аспартатаминотрансаминаза, аланинаминотрансаминаза, лактатдегидрогеназа, билирубин, глюкоза, натрий, калий, общий белок, мочевина, креатинин, щелочная фосфатаза, общие липиды, общий холестерин и иные, а также, при необходимости, изучение биохимических показателей органов (система ферментов метаболизма ксенобиотиков, стабильность мембран лизосом клеток печени, система регуляции апоптоза, система антиоксидантной защиты, воспалительной реакции и др.).

Исследование мочи: суточный диурез, pH мочи, белок, билирубин, сахар, мочевина, натрий, калий и иные.

Возможно использовать нагрузочные пробы: бромсульфалеиновая проба, длительность «гексеналового сна», оценка секреторной функции почек по экскреции фенолового красного и др.

Общее состояние всех животных регистрируется ежедневно; взвешивание проводится 1 раз в неделю в первые 3 месяца эксперимента, затем – 1 раз в месяц; потребление пищи каждым животным или группой должно измеряться 1 раз в неделю; у части животных каждой группы необходимо провести анализ мочи, гематологические, биохимические и физиологические исследования, а при необходимости дополнительные исследования.

После прекращения введения вещества часть животных оставляется для изучения в восстановительный период (не менее 30 суток в случае, если не предусматривается изучение хронической токсичности в течение всей жизни экспериментальных животных), если установлены функциональные изменения; остальные животные подвергаются вскрытию, макроскопическому описанию, органы взвешиваются. Гистологическому исследованию подвергаются внутренние органы животных с макроскопическими изменениями.

4.2.4. Изучение общетоксического действия на лабораторных животных, не являющихся грызунами. Определение острой токсичности.

Используется один вид животных. Число животных в группе должно быть не менее двух, путь введения внутрижелудочный. Изучаются две дозы для ориентировочного определения летальной дозы. Частота введения – однократно, длительность наблюдения 14 суток.

Экспериментальная программа: ежедневное наблюдение за общим состоянием, взвешивание не менее трех раз за период наблюдения,

лабораторные исследования по мере необходимости, в конце периода наблюдения или после гибели все животные каждой группы вскрываются, описываются макроскопически, органы взвешиваются, при необходимости подвергаются гистологическому исследованию.

Изучение подострой и субхронической токсичности проводится по следующей схеме. Используется один вид животных с числом особей не менее трех в группе каждого пола. Путь введения внутрижелудочный, изучаются три дозы вещества. Срок введения составляет от 28 дней и до 90 дней при ежедневном введении.

Обязательно формирование интактной группы; при использовании растворителей/носителей необходима дополнительная контрольная группа с введением вышеназванного компонента.

Экспериментальная программа: ежедневное наблюдение за общим состоянием; взвешивание и контроль потребления пищи 1 раз в неделю; гематологические, биохимические, физиологические исследования по мере необходимости проводятся у всех животных в каждой группе.

Погибшие животные подлежат вскрытию, макроскопическому обследованию, органы взвешиваются и исследуются гистологически.

В конце эксперимента у животных проводятся гематологические, биохимические исследования, анализ мочи, при необходимости и другие лабораторные исследования. Эксперимент завершает макроскопическое обследование, взвешивание, гистологическое изучение органов.

4.2.5. Изучение хронической токсичности.

Используются животные одного вида обоего пола. Количество животных не менее, чем по четыре обоего пола в каждой группе. Путь введения внутрижелудочный, изучаются три дозы и контроль для животных обоего пола. Контрольная группа: интактный контроль

и контроль с введением соответствующего растворителя, если он используется в эксперименте. Длительность введения составляет от 6 до 12 месяцев при введении вещества 7 дней в неделю.

Экспериментальная программа: ежедневное обследование; взвешивание и определение потребления пищи 1 раз в неделю в первые 3 месяца, а затем 1 раз каждый месяц; гематологические, биохимические, физиологические исследования, анализ мочи и при необходимости другие лабораторные исследования должны проводиться у всех животных каждой группы.

Погибшие животные в течение эксперимента подлежат вскрытию, макроскопическому описанию, органы взвешиваются и подвергаются гистологическому изучению.

По завершении эксперимента у всех выживших животных при необходимости проводятся гематологические, биохимические исследования, анализ мочи и другие лабораторные исследования (см. п. 4.2.3); животные вскрываются, обследуются макроскопически, органы взвешиваются и подвергаются гистологическому исследованию.

4.3. Изучение специфических и отдаленных последствий. Предварительное изучение иммунотоксичности и аллергенности.

Проводится предварительное изучение с целью определения наиболее чувствительной мишени для ксенобиотика и определения его минимально действующей дозы. Наиболее оптимальным является испытание 2-х уровней доз. Минимальная доза должна находиться ниже пороговой дозы, максимальная – на порядок выше.

Изучение проводится на линейных животных обоего пола. При выборе животных следует учитывать особенности генного контроля. Поскольку у высоко- и низкоотвечающих линий под влиянием ксенобиотиков наблюдается различная модуляция иммуногенеза,

в эксперимент следует включать обе оппозитивные группы животных. Желательно проводить исследования на животных 6-8 недельного возраста.

В иммунологическом эксперименте используются нелинейные или линейные животные. Например, рандомбредные крысы ОИ – продуцирующие IgE; морские свинки Hardy; рандомбредные мыши следующих линий:

C57BL/H-2^{B}/ – низкореагирующие на эритроциты барана (ЭБ);

CBA/H-2^{K}/; BALB/c/H-2^{d}/ — высокореагирующие на ЭБ;

CBA; DBA/2J/H-2^{d}/; BALB/c – высокая цитотоксическая активность естественных киллеров (ЕК);

A/S и /H-2^{d}/; AKP/J/H-2^{K} – слабая цитотоксическая активность ЕК;

/CBAxC57BL/F_1 – используют в реакции трансплантат против хозяина;

BALB/c; C57BL; C3H/He/H-2^{K} – содержат высокий уровень комплемента; и др.

Группы животных должны состоять не менее чем из 10 животных. Основной путь введения внутрижелудочный, желательно использовать не менее двух уровней доз, продолжительность введения вещества подбирается индивидуально, исходить следует из литературных данных и сроков, необходимых для получения оптимального иммунного ответа или аллергической реакции в эксперименте.

Экспериментальные исследования: перед введением тест-препаратов у животных снимаются фоновые показатели, которые подлежат изучению в опыте (фагоцитоз, хемотаксис, содержание IgA, IgG, IgM, IgE); если тестируемое вещество обладает выраженной реакционной способностью, в экспериментах на животных определяют

его влияние на вес и клеточность центральных и периферических органов иммунитета и формулу крови.

4.3.1. Оценка сенсибилизирующей способности вещества. Тест опухания лапы мыши (ТОЛМ).

В подушечку задней лапы (под апоневроз) животных контрольной и опытной групп (не менее 10 животных в каждой группе) вводят разрешающую дозу изучаемого вещества. О величине отека (показатель ТОЛМ), т.е. о развитии гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ), судят по разнице в толщине лапы, измеряемой до и через 24 часа после перкутанного тестирования инженерным микрометром в миллиметрах. У животных контрольной группы показатель ТОЛМ, как правило, не должен превышать 10. Для исключения неспецифического токсико-раздражающего эффекта (для веществ 3-5 классов раздражающего действия обязательно) разрешающую дозу вещества предварительно испытывают на 3-х интактных животных. При установлении запредельного неспецифического эффекта концентрацию вещества снижают при увеличении вводимого объема.

Сравнивают среднегрупповые показатели ТОЛМ животных опытной и контрольной групп в абсолютных (мм) и относительных (балл) единицах. Оценку ТОЛМ в баллах проводят по следующей шкале: 0 баллов – ТОЛМ до 0,1 мм; 1 балл – 0,11-0,20 мм; 2 балла – 0,21-0,30 мм; 3 балла – 0,31-0,40 мм; 4 балла – 0,41-0,50 мм; 5 баллов – 0,51 мм и более.

4.3.2. Тест опухания уха мыши (ТОУМ).

Разрешающую дозу вещества в оптимальной концентрации наносят пипеточным дозатором на кожу обеих сторон уха, фиксированного у основания глазным пинцетом. Показатель ТОУМ определяют по разнице в толщине уха, измеряемой микрометром

до и через 24 часа после эпикутанного тестирования. Оптимальная концентрация вещества не должна вызывать неспецифического раздражения кожи (абсолютный показатель ТОУМ не более 3 мкм) и предварительно подбирается на 3-х интактных мышах. Чаще всего применяются для эпикутанного тестирования 0,1-10% концентрации, а в качестве растворителей используют ацетон, 70% спирт, диметилсульфоксид, петролейный эфир.

Оценивают ГЗТ по абсолютному (мкм) и относительному (балл) показателю ТОУМ по специальной шкале. Относительный показатель ТОУМ (балл) соответствует величине отека уха (мкм): 0 баллов – 1-2 мкм, 1 балл – 3-7 мкм, 2 балла – 8-12 мкм, 3 балла – 13-17 мкм, 4 балла – 18-22 мкм, 5 баллов – 23 и более мкм и/или наличие геморрагий, некроза. Сравнивают среднегрупповые абсолютные и относительные показатели ТОУМ животных контрольной и опытной групп. Причем последний показатель более жесткий и объективный, позволяет проводить ориентировочную оценку аллергенной активности вещества по частоте (%) животных с положительными реакциями ГЗТ в баллах.

4.3.3. Основное изучение иммунотоксического и аллергенного действия.

Используется не менее двух видов животных обоего пола. Экспериментальные группы должны состоять не менее чем из 10 животных обоего пола. Если иммунотоксическое и аллергенное действие изучается в динамике, необходимо увеличивать количество животных в группе для забоя их в определенные сроки исследования. Каждая группа должна быть рандомизирована по весовым показателям.

Для исследования должен быть обоснован и использован тот путь введения вещества, который может вызвать наиболее сильный иммунный ответ или аллергенное действие. С учетом того, что

чувствительность иммунной системы человека к ксенобиотикам на несколько порядков выше, чем у животных, целесообразно (возможно) введение тест-вещества вместе с полным или неполным адъювантом Фрейнда.

Подопытные животные должны получать не менее 2-х уровней доз для каждого пола, контрольные животные получают в том же объеме и кратности используемый растворитель.

В исследования может быть включена группа позитивного контроля на иммуноактивность при обязательном интактном контроле. Продолжительность введения определяется в зависимости от изучаемых иммунологических и аллергологических показателей с учетом получения оптимального иммунного ответа.

Изучение функционального состояния иммунной системы может продолжаться в течение 1 месяца после окончания эксперимента для выяснения обратимости нарушений, вызванных тестируемым веществом.

Методы оценки аллергенного действия тестируемого вещества: оценка анафилактогенной активности в реакции общей анафилаксии (анафилактический шок); активная кожная анафилаксия; реакция гиперчувствительности «замедленного» типа на мышах; реакция иммунных комплексов; метод накожных аппликаций.

Методы *in situ*: методы оценки чувствительности гладких мышц трахеобронхиальной цепочки к исследуемым веществам в эксперименте на морских свинках.

Тесты *in vitro*: реакция непрямой дегрануляции тучных клеток; реакция торможения миграции макрофагов; псевдоаллергические реакции (тест Шор).

4.3.4. Оценка иммунотоксичности.

Оценка иммунотоксичности проводится в два этапа.

Первый этап оценки позволяет получить минимум интегральных характеристик, охватывающих практически все функции иммунной системы и включает:

суммарную оценку состояния гуморального иммунитета (реакция гемагглютинации);

определение содержания антителообразующих клеток (АОК); иммунизация эритроцитами барана;

суммарную оценку состояния Т-клеточного иммунитета – пролиферации в аллосмешанной культуре лимфоцитов (СКЛ) и генерирование Т- киллеров в СКЛ;

суммарную оценку состояния клеточной естественной резистентности (фагоцитоз, хемотаксис).

Тесты второго этапа позволяют оценить содержание и функцию субпопуляций клеток иммунной системы. На этом этапе оценивают:

- функциональную активность регуляторных лимфоцитов (определение активности Т-хелперов по продукции интерлейкина-2;

- определение активности Т-супрессоров по торможению реакции бласттрансформации лимфоцитов и смешанной культуры лимфоцитов;

- функциональную активность эффекторных лимфоцитов (определение активности Т-лимфоцитов – реакция бласттрансформации лимфоцитов с Т-митогенами, определение количества Т-лимфоцитов – цитотоксический тест, определение Т-киллеров и естественных киллеров – узнавание, летальный удар;

- определение эффекторов гиперчувствительности «замедленного» типа; определение; активности В-лимфоцитов – пролиферация В-лимфоцитов В-митогенами, определение количества В-лимфоцитов (цитотоксический тест), продукция антител IgA; JgM; IgG по Манчини;

- функциональную активность макрофагов (определение подвижности макрофагов - тест ингибиции миграции макрофагов, определение продукции иптерлейкина-1).

Второй этап испытаний химических контаминатов на иммунотоксическое действие проводят в случае, если на первом этапе оценки выявлено иммунотоксическое действие вещества.

Тестирование на иммунотоксическое и аллергизирующее действие проводят обычно на 7-14-21 сутки после последнего введения вещества. Если изучают развитие иммунных и аллергических реакций в динамике или определяют возможность обратимости этих нежелательных эффектов, то эксперименты продолжаются до 2-3-х месяцев.

4.3.5. Изучение эмбриотоксического действия и влияния на репродуктивную функцию. Изучение эмбриотоксического действия на крысах.

Исследования на эмбриотоксические свойства должны включать как изучение состояния потомства к концу антенатального периода развития (I этап исследования), так и состояние потомства в постнатальном периоде жизни (II этап исследования). Испытания ограничиваются I этапом, если препарат является очень сильным или сильным тератогеном.

I этап исследования.

Используются линейные, гибридные или рандомбредные крысы. В подопытной и контрольной группах должно быть не менее 20 беременных животных. Первым днем беременности считается день нахождения сперматозоидов в вагинальном мазке.

Основной путь введения внутрижелудочный. Целесообразно испытание трех доз. В качестве высшей используется максимальная доза, при которой не отмечается гибели самок и развития видимых

признаков интоксикации при избранном режиме введения. При испытании высшей дозы малотоксичных веществ объем жидкости, вводимый подопытным животным, не должен превышать максимально-допустимое количество для данного вида животных и конкретного пути введения.

В эксперимент должны быть включены группы негативного, позитивного и интактного контроля. Негативному контролю вводят растворитель или добавки, используемые для введения испытуемого вещества.

Вещество вводят один раз в сутки различным группам с 1 по 6, с 6 по 16 и с 16 по 19 дни беременности. Изучаемое вещество вводят с 6 по 16 дни беременности в трех дозах, в остальные сроки – в высшей дозе. Если при введении вещества в высшей дозе отмечен эмбриотоксический эффект, то проводят дополнительные исследования для установления пороговой дозы. Сроки введения изучаемого вещества должны охватывать весь период беременности самок, поскольку чувствительность зародыша к веществу зависит от стадии его развития.

Методика оценки: ежедневное наблюдение за состоянием и поведением беременных самок; еженедельное взвешивание животных; эвтаназия и вскрытие самок на 20-й день беременности для оценки результатов; в качестве показателей эмбриотоксического действия определяется пред- и постимплантационная эмбриональная смертность, морфологические (анатомические) пороки развития, общая задержка развития плодов.

Предимплантационную смертность определяют по разности между количеством желтых тел в яичниках и количеством мест имплантации в матке; постимплантационную смертность – по разности между количеством мест имплантации и числом живых плодов.

Для оценки тератогенного действия подсчитывается число плодов с аномалиями при внешнем осмотре, а затем общее число плодов делится на две группы. У ⅓ плодов исследуют состояние внутренних органов, у другой (⅔) – состояние скелета. Все плоды взвешиваются и определяется их краниокаудальный размер. За единицу наблюдения принимают результаты, полученные при вскрытии одной самки.

II этап исследования.

Исследования проводятся на виргильных самках, гибридах или рандомбредных животных. В подопытных и контрольных группах должно быть получено потомство не менее чем от 15 самок. Основной путь введения внутрижелудочный. Испытывается эффективная доза или в несколько раз увеличенная доза. Введение вещества проводят один раз в сутки, с первого до последнего дня беременности.

Контрольная группа служит негативным контролем, подвергается воздействию растворителей, используемых при введении вещества.

Методика оценки: ежедневное наблюдение за общим состоянием и поведением беременных самок; ежедневное взвешивание, анализ прироста массы тела; изучение поведения потомства в постнатальном периоде жизни; изучение у потомства нарушений со стороны репродуктивной функции, состояния основных функциональных систем (печени, нервной, эндокринной, иммунной и др.).

За 3 - 4 дня до родов беременные самки должны быть размещены в индивидуальных клетках. В каждом помете оставляют по 8 новорожденных с одинаковым количеством самцов и самок, по возможности. На 23 - 25 день после рождения крысят отсаживают от матери.

Исследования потомства начинают не ранее, чем через 24 часа после рождения и продолжают до 2 - 3-месячного возраста. Оценка

поведения проводится по следующим показателям: общее наблюдение за физическим развитием потомства; скорость созревания сенсорно-двигательных рефлексов в период вскармливания самкой; двигательное и эмоциональное поведение и способность к координации движений у потомства после окончания вскармливания; выработка условных рефлексов с положительным и отрицательным подкреплением, сохранение полученных навыков (обучаемость и память).

Экспериментальная программа оценки состояния основных систем потомства зависит от биологической активности изучаемого контаминанта и аналогична методам, используемым в токсикологии. При технических трудностях длительного введения вещества, можно вводить его 3 - 5 дней подряд, но при этом необходимо предусмотреть увеличение числа групп животных, чтобы охватить весь период беременности.

При статистической обработке за среднее значение соответствующего показателя принимается величина для отдельного помета, желательно предусмотреть возможность раздельного анализа результатов для самок и самцов.

4.3.6. Изучение эмбриотоксического действия на кроликах.

Исследования проводятся на виргильных самках. Каждая группа должна состоять не менее чем из 12 беременных крольчих. Первым днем беременности считается день нахождения сперматозоидов в вагинальном мазке. Основной путь введения внутрижелудочный. Исследования проводятся на уровне высшей дозы.

В эксперимент должны быть включены группы негативного, позитивного и интактного контроля. Испытуемое вещество рекомендуется вводить с 6 по 18 день беременности один раз в сутки.

Методика оценки: эвтаназию и вскрытие самок проводят на 27 - 28 день беременности; показателями эмбриотоксичности является пред- и постимплантационная эмбриональная смертность, морфологические пороки развития, общая задержка развития плодов.

Лаборатории, ведущие тестирование тератогенности, должны иметь данные «обобщенного» контроля об уровне спонтанного возникновения аномалии развития, полученные на интактных контрольных животных.

4.3.7. Изучение влияния химических контаминантов на репродуктивную функцию.

Виды и линии животных для изучения влияния химических контаминантов на репродуктивную функцию отбираются с учетом информации об их репродуктивном статусе, уровня врожденных уродств и чувствительности к известным гонадотоксическим агентам. Исследования проводятся на животных с низким уровнем спонтанных уродств.

Исследования проводят на животных обоего пола, как правило, крысах и мышах. Рекомендуется иметь в каждой группе не менее 20 самцов и 40 самок. Основной путь введения внутрижелудочный. Вещество испытывают в 3-х дозах. Используются группы негативного, позитивного и интактного контроля; самцам препарат вводят на протяжении 60 - 70 дней, самкам – 15 - 30 дней до спаривания.

Методика оценки: ежедневное наблюдение, еженедельное взвешивание и определение количества потребляемой пищи.

Самок подсаживают к самцам в стадии проэструса и соотношении 2:1 сроком на 2 эстральных цикла. Оплодотворение регистрируют с помощью вагинальных мазков. Половину ссаженных самок умерщвляют на 17 - 21 день беременности, вторую половину самок

оставляют до родов и наблюдают за физическим развитием потомства до окончания периода вскармливания.

Критерии оценки: учет уровня пред- и постимплантационной смертности; величин индекса плодовитости и беременности.

4.3.8. Изучение мутагенности.

Учет генных мутаций на индикаторных бактериях (тест Эймса). Используются штаммы *Salmonella typhimurium* TA1537, TA98, TA100 и др.

Необходимо испытание 5 доз веществ. Максимальная доза должна соответствовать 1 мг на чашку. В случае наличия у вещества антибактериальных свойств, максимальная доза должна соответствовать дозе, вызывающей антибактериальный эффект.

Необходимо включение в эксперимент групп негативного и позитивного контроля. Как правило, группа, получающая растворитель, служит негативным контролем, известные мутагены – позитивным контролем в группах с наличием и отсутствием микросомальной активирующей смеси (S9). Фракция S9 должна быть приготовлена из печени млекопитающих, как правило крыс, с предварительной индукцией метаболических ферментов.

Метаболическая активация. Тест должен выполняться отдельно с наличием и отсутствием микросомальной активирующей смеси.

Оцениваются следующие показатели: среднее число ревертантов Xср.±d, ответ штамма на стандартный мутаген (положительный контроль), число колоний тест-штамма в отсутствие стандартного мутагена (чистый контроль).

4.3.9. Тест хромосомных аберраций в клетках костного мозга грызунов.

Используется один из видов грызунов, как правило, мыши. Животные, используемые для исследования мутагенности, должны быть генетически однородны. Допускается использование мышей-тетрагибридов или рандомбредных животных. Каждая группа должна содержать не менее 5-ти животных. Основной путь введения внутрижелудочный.

Испытывается 1 доза при 1-ой контрольной группе. Как правило, используется доза ½ от DL_{50} при однократном введении (для опытов с длительным введением максимальная доза составляет 2000 мг/кг массы тела при длительности введения до 14 дней и 1000 мг/кг тела в день при длительности введения более 14 дней).

Тестирование мутагенности должно включать негативный и позитивный контроли. Негативный контроль (растворитель) используется для анализа ответных реакций на действие всех возможных переменных, кроме тестируемого соединения. В качестве позитивного контроля используются известные мутагены. Для позитивного контроля предпочтительнее использовать мутаген, сходный по характеру биотрансформации с тестируемым соединением. Если это невозможно, следует использовать модельные мутагены.

Используется, как правило, однократное введение, в случае необходимости число введений может быть увеличено.

Все животные экспериментальной группы должны быть умерщвлены в соответствующее время после введения испытуемого соединения с последующим приготовлением гистопрепаратов на стадии метафазы. Используются 2 срока экспозиции испытуемого соединения у животных – 6 и 24 часа. Анализу подвергаются 100 метафазных клеток у каждого животного.

Представление результатов: общее число проанализированных клеток; процентное соотношение из них аберрантных; спектр аберраций и процентное соотношение их; значение χ^2 статистики соотношения нормальных и аберрантных метафазных клеток в подопытных и контрольных группах.

4.3.10. Метод «ДНК-комет» в клетках млекопитающих *in vivo*.

Исследования проводят на мелких лабораторных грызунах – половозрелых мышах или крысах. Во избежание большого разброса в оцениваемых показателях необходимо использовать генетически однородных животных, отклонение по массе тела и возрасту которых на момент эксперимента не превышает ±10%. Ни одна из инбредных линий не выделяется как предпочтительная. Каждая контрольная и получающая испытуемое соединение группа должна содержать не менее 5 особей. В токсических эффектах исследуемого соединения эксперименты проводят на животных одного пола.

Исследуемые соединения растворяют в деионизированной воде или физиологическом растворе. Водонерастворимые соединения вводят с Твином-80 или используют в качестве растворителя 1% раствор этилового спирта или диметилсульфоксида (ДМСО). Для перорального введения водонерастворимых соединений предпочтительно использовать 1% водную суспензию крахмала или растительное масло (оливковое). Применение иных растворителей допускается только при надлежащем обосновании и при условии отсутствия у них в применяемых концентрациях токсических эффектов и химического взаимодействия с исследуемым соединением. Все растворы и суспензии необходимо готовить непосредственно перед применением.

Препарат исследуют в дозах, соответствующих, как правило, 1/10 DL_{50} и 1/100 DL_{50}, но не выше 1/2 DL_{50}. В случае если токсичность исследуемого соединения мала и дозу DL_{50} невозможно определить по техническим причинам, в качестве максимальной дозы определяется 2000 мг/кг.

Оценка проводится при внутрибрюшинном способе введения, а также при введении с кормом или питьевой водой. Максимальный одновременный объем вводимого раствора или соответствующего растворителя зависит от массы тела животного и определяется из расчета не более 20 мл/кг. За исключением соединений, обладающих раздражающим действием или едких при высоких концентрациях, разница во вводимых объемах растворов для всех используемых доз соединения должна быть минимальна. Эксперименты проводят при однократном введении исследуемого препарата с эвтаназией животных через 3–6 и 18–24 ч после введения. Более короткая экспозиция (<3 ч) оправдана для нестабильных, быстро абсорбируемых и метаболизируемых соединений, более длительная экспозиция (>24 ч) – для соединений, требующих большего времени для биотрансформации. При получении позитивного результата при одном из сроков экспозиции эксперименты далее не проводятся. Целью многократного введения может явиться оценка генотоксического действия соединений, обладающих кумулятивным эффектом. В этом случае исследуемое соединение вводится ежедневно в течение 7 - 14 дней. Животные подвергаются эвтаназии через 3 ч после последнего введения.

При выборе органов/тканей для анализа в первую очередь необходимо ориентироваться на данные о токсикокинетических и токсикодинамических свойствах исследуемого соединения, а также

на планируемый путь поступления вещества в организм человека. Исследования проводят в следующих органах/тканях:

а) в печени, являющейся основным органом биотрансформации ксенобиотиков;

б) в костном мозге, являющемся активно пролиферирующей тканью, клетки которой находятся на разных стадиях клеточного цикла;

в) в клетках крови, осуществляющей транспорт ксенобиотиков и/или их метаболитов;

г) в толстой кишке – органе-мишени для веществ и/или их метаболитов, выводимых из организма через желудочно-кишечный тракт (ЖКТ);

д) в головном мозге, являющемся высокочувствительным к действию непрямых генотоксикантов;

е) в мочевом пузыре – органе, в котором ксенобиотики и/или их метаболиты задерживаются перед выведением из организма и могут подвергаться биотрансформации.

4.3.11. Тест доминантных летальных мутаций у грызунов.

Используется один вид грызунов, как правило, мыши. Каждая группа должна содержать не менее 15 самцов, к каждому самцу подсаживается по 3 самки еженедельно в течение 3 недель. Основной путь введения внутрижелудочный.

Испытывается одна доза и одна контрольная группа. Как правило, используется доза ½ от DL_{50}. Когда во вводимом веществе имеется растворитель, контрольная группа должна получать этот растворитель.

Как правило, используется однократное введение, в случае необходимости, число введений может быть увеличено.

Обработанные самцы еженедельно в течение 3 недель спариваются с интактными самками; все подопытные самки должны

быть умерщвлены и соответствующее время после спаривания с самцами; после вскрытия самок подсчитывается число живых и мертвых эмбрионов у каждой беременной самки.

Представление результатов: процент фертильных самок; число желтых тел; суммарное число живых и мертвых эмбрионов в группах; значение χ^2 статистики соотношения живых и мертвых эмбрионов в подопытных и контрольных группах на каждой стадии сперматогенеза (неделе).

4.3.12. Учет генных мутаций на индикаторных бактериях с использованием млекопитающего в качестве промежуточного хозяина.

Используются штаммы *Salmonella typhimurium* TA1950, TA1534. Испытывается одна доза препарата на мышах. Как правило, используется доза ½ от DL_{50}. Препараты с антибактериальным действием целесообразно использовать в дозах: ½ DL_{50}, 1/10 DL_{50}, 1/100 DL_{50} и 1/1000 DL_{50}, чтобы уровень гибели индикаторных бактерий не превышал 90%.

Основной путь введения внутрижелудочный. Необходимо включение в эксперимент групп негативного и позитивного контроля.

Режим введения: 1 мл культуры бактерий вводится внутрибрюшинно, сразу же после введения культуры вводят изучаемое вещество. Внутрибрюшинное введение изучаемого препарата делают через 30 минут после введения культуры животному.

После 3-х часовой инкубации животное умерщвляют разрывом шейного отдела позвоночника, вводят внутрибрюшинно буфер, вскрывают брюшную полость и отбирают из нее бактериальную суспензию. Рассевают суспензию на чашки с селективным агаром для

получения числа ревертантов и, после предварительного разведения, на чашки с питательным мясопептонным агаром.

Представление результатов: исходные данные, включающие число ревертантов на число выживших бактерий; титр бактериальной суспензии; показатель числа ревертантов на мл. по данному варианту; показатель частоты индуцированных мутаций с использованием статистического анализа с помощью критерия Уилкоксона.

4.3.13. Учет ДНК-повреждающего действия.

Используются штаммы: *E. coli* WP2 дикого типа и *polA*, *recA*-мутантные. Необходимо испытание 6 доз препарата. Для антибактериальных препаратов в качестве минимальной концентрации используют концентрацию, при которой наблюдается рост мутантных штаммов, а максимальной концентрации – ингибирующую рост бактерий. Промежуточными являются концентрации в 2 и 4 раза меньше максимальной.

Негативный контроль (растворитель) и позитивный контроль – введение соединения, вызывающего ДНК-повреждающий эффект.

Культуру жизнеспособных бактерий добавляют к испытуемому химическому соединению и инкубируют при 37°С и течение 18 час. Для лучшей видимости роста бактерий в суспензию добавляют индикатор бромкреозол пурпуровый, который изменяет свой цвет от голубого к желтому при изменении pH среды за счет роста бактерий.

Представление результатов: регистрация наличия или отсутствия роста штамма дикого типа и мутантных бактерий проводится в таблице знаками «+» или «–».

4.3.14. Изучение канцерогенности.

Виды и линии лабораторных животных должны выбираться с учетом их устойчивости к инфекционным заболеваниям,

продолжительности жизни, спонтанного выхода опухолей, чувствительности к известным канцерогенам. Животные различных видов и линий могут быть использованы в предварительных испытаниях и в хроническом эксперименте с учетом свойств исследуемого препарата.

Предварительное изучение, указанное ниже, проводится с целью определения уровней доз для хронического эксперимента.

4.3.15. Оценка потенциальной канцерогенности веществ в краткосрочных тестах (КСТ).

При оценке результатов тестирования исходят из того, что положительный эффект имеет преимущество перед отрицательным, а данные, полученные в экспериментах *in vivo*, более весомы, чем аналогичные, полученные *in vitro*. Согласно этому правилу, интегральный положительный результат системы КСТ с гораздо большей степенью вероятности свидетельствует о потенциальной канцерогенной опасности вещества, чем общий отрицательный результат – о ее полном отсутствии.

С точки зрения прогноза канцерогенности существенное значение имеют результаты, полученные в системе мутагенной оценки при учете генных мутаций (на бактериях) и/или хромосомных аберраций (в клетках костного мозга мышей). При этом могут встречаться 4 варианта сочетаний результатов (таблица 3).

Таблица 3

Интерпретация результатов при изучении канцерогенности в краткосрочных тестах

№ варианта	Положительные (+) и отрицательные ответы при использовании методов учета	
	Генных мутаций на бактериях	Хромосомных аберраций в клетках костного мозга мышей
1	+	+

2	+	-
3	-	+
4	-	-

В случае варианта 1 делается заключение о канцерогенной опасности и препарат не подвергается дальнейшим исследованиям. В остальных трех случаях ставятся уточняющие эксперименты, среди которых наиболее информативен полиорганный учет повреждений ДНК (ДНК-комет) методом щелочного электрофореза *in vivo*. Допустимо также использование репарационного теста на *E. coli* или индукции SOS-ответа у бактерий, регистрация внепланового синтеза ДНК в культуре клеток млекопитающих или повреждений ДНК с помощью щелочной элюции. С учетом результатов 1 этапа исследований могут получиться следующие варианты сочетаний ответов (таблица 4).

Таблица 4

Интерпретация результатов при изучении канцерогенности в краткосрочных тестах

№ варианта	Положительные (+) и отрицательные ответы (-) при использовании методов учета		
	Генных мутаций	Хромосомных аберраций	Повреждений ДНК
1	+	-	+
2	+	-	-
3	-	+	+
4	-	+	-
5	-	-	+
6	-	-	-

В случае вариантов 1, 3 и 6 дальнейшие исследования прекращают. В случаях 1 и 3 делается заключение о наличии, а в случае 6 – об отсутствии канцерогенной опасности. Для отдельных групп химических веществ (например, гормоноподобного действия), несмотря на отрицательные ответы во всех трех группах использованных тестов (вариант 6), может оказаться необходимым применение одного

из прямых экспресс-тестов на опухолеобразование: трансформацию клеток в культуре или индукцию опухолей у гидробионтов.

В случаях 2, 4 и 5 переходят к следующему этапу исследований. Стратегия работы на этом этапе связана с подтверждением или отрицанием способности исследуемого препарата индуцировать определенный тип генетических эффектов.

В случае варианта 2 проводится дополнительный учет генных мутаций с помощью альтернативного метода, способного зарегистрировать этот тип эффектов. Если на первом этапе был использован, например, учет генных мутаций на бактериях, на данном (третьем) этапе работы применяется метод тестирования генных мутаций в культуре соматических клеток млекопитающих и наоборот.

В случае варианта 4 эффект, полученный путем индукции перестроек хромосом или в клетках костного мозга мышей, проверяется на клетках костного мозга крыс.

В случае варианта 5 эффект, полученный с использованием бактерий (репарационный тест на E.coli или индукция SOS-ответа), проверяется с помощью методов учета повреждений ДНК в клетках млекопитающих *in vitro* и *in vivo* (метод «ДНК-комет», индукция внепланового синтеза ДНК или учет повреждений ДНК с помощью щелочной элюции).

При получении на данном этапе работы положительного результата в вариантах 2, 4 и 5 делается заключение о возможности наличия у исследуемого агента канцерогенной активности, связанной с индукцией определенного типа генетических эффектов. При получении отрицательного результата переходят к заключительному этапу исследований, связанному с использованием одного из прямых экспресс-тестов определения канцерогенной активности: учет

опухолевой трансформации клеток в культуре или индукции опухолей у гидробионтов. Заключение об отсутствии или наличии канцерогенной активности у исследуемого вещества делается на основании соответственно отрицательного или положительного ответа, полученного в одном из этих методов.

4.3.16. Прямой экспресс-тест: учет опухолевой трансформации клеток в культуре.

Используются первичные и иммортализированные культуры соматических клеток грызунов. Клетки, не обладающие собственной системой метаболической активации, выращивают на монослое облученных клеток с высокой активностью метаболизирующих ферментов, или обрабатывают смесью S9 из постмитохондриальной фракции печени крыс.

Для изучения канцерогенности испытуемое вещество добавляют в концентрациях с шагом 1/2, в качестве максимальной используется минимальная ингибирующая концентрация.

Негативный контроль: необработанная культура и растворитель, позитивный - известный канцероген, предпочтительно того же ряда, что и тестируемое соединение, испытанный ранее в культуре клеток.

В чашки высевают от 300 до 1000 клеток-мишеней, через 24 часа добавляют испытуемое вещество. Первичную культуру эмбриональных клеток выращивают в течение 9 суток без замены среды. При работе с клетками иммортализированных клеточных линий культуру отмывают от канцерогена через 24 - 48 ч или позже, а затем клетки культивируют 4 - 6 недель без пересева, сменяя среду 1 - 2 раза в неделю. По окончании эксперимента культуру отмывают и окрашивают принятым в лаборатории методом.

Оценка и представление результатов: данные представляют в виде количества трансформированных колоний на чашку. О трансформирующем действии испытуемого вещества судят по характеру колоний клеток или очагов роста. Клеточные штаммы, полученные из клеток таких линий, обладают пониженной чувствительностью к концентрации сыворотки в культуральной среде, образуют колонии в полужидком агаре, при прививке сингенным животным приводят к развитию опухолей. Критериями позитивного результата являются статистически значимое, зависимое от дозы, увеличение количества трансформированных колоний, или воспроизводимый и статистически значимый позитивный ответ по крайней мере для одной экспериментальной точки.

4.3.17. Изучение канцерогенности в хроническом эксперименте.

Используются не менее двух видов животных обоего пола 6-8 недельного возраста. Группы должны состоять не менее чем из 50 животных обоего пола. Каждая группа должна быть рандомизирована в соответствии с массой тела.

Путь введения должен быть адекватен использованному в хроническом эксперименте. Пероральное введение препарата может проводиться зондом. Возможно смешение исследуемого вещества с пищей или водой. Содержание изучаемого вещества в пище не должно превышать 5%. Введение изучаемого контамината с пищей или питьевой водой должно быть рассчитано индивидуально на каждое животное после предварительного изучения стабильности вещества в указанных условиях.

Подопытные группы должны получать не менее 3-х уровней доз для самцов и самок на фоне соответствующих контрольных групп. Максимальная доза определяется по результатам предварительного

эксперимента. Минимальная доза должна соответствовать среднеэффективной дозе для конкретного вида животных, используемого в хроническом эксперименте. Желательно определение средней дозы по принципу геометрической прогрессии.

Контрольные группы делятся на негативный и интактный контроль.

Продолжительность введения не менее 24 месяцев и не более 30 месяцев для крыс, не менее 18 месяцев и не более 24 месяцев для мышей и хомячков при ежедневном введении.

Изучение должно быть закончено через 2-3 месяца после окончания введения препарата. Если смертность от кумуляции превышает 75% от малой дозы, то все выжившие животные умерщвляются, и изучение прекращается. Смертность от интеркуррентных заболеваний должна быть в пределах 50% после 24 месяцев введения вещества для крыс и 18 месяцев для мышей и хомячков.

Экспериментальные исследования: ежедневный осмотр всех животных в каждой группе; еженедельное взвешивание в первые 3 месяца ведения, в последующие сроки 1 раз в 4 недели; вскрытие, макроскопическое изучение и гистологическое исследование органов и тканей всех павших животных.

Обязательно макроскопическое исследование всех органов и тканей. Гистологическому исследованию подвергаются следующие органы и ткани: молочные железы, лимфатические узлы, грудина, костный мозг, тимус, трахея, легкие, сердце, щитовидная и паращитовидная железа, язык, пищевод, желудок, печень, поджелудочная железа, селезенка, почки, надпочечники, мочевой пузырь, семенные пузырьки, яичники, матка, глаза, мозг, гипофиз,

спинной мозг и другие органы и ткани с выраженными макроскопическими изменениями.

Больные животные должны быть изолированы, умерщвлены, вскрыты, описаны макроскопически, органы и ткани подвергнуты гистологическому исследованию. Выявленные изменения в виде опухолей должны быть включены в описание повреждений, исследованы макроскопически и гистологически. По возможности, желательно провести анализ крови.

При окончании исследования все выжившие в каждой группе умерщвляются, подвергаются вскрытию, макроскопическому обследованию. Гистологическое изучение всех органов проводится для всех животных, получавших большую дозу, и контрольной группы. При обнаружении существенных различий в частоте возникновения опухолей под влиянием большой дозы по сравнению с контролем, гистологическому исследованию подвергаются все органы и ткани животных других подопытных групп.

По результатам экспериментов (общетоксическое, канцерогенное, мутагенное, гонадотоксическое действие и др.) определяется пороговый уровень доз по лимитирующему показателю вредности, который выражается в мг/кг массы тела животного.

4.4. Методические подходы к оценке безопасности в отношении остаточных количеств антибактериальных препаратов.

Общая схема оценки антибактериальных препаратов (АБ) с точки зрения обеспечения безопасности пищевой продукции включает:

- базовые исследования, необходимые для оценки безопасности остаточных количеств АБ;

- дополнительные тесты, проводимые исходя из токсикологических характеристик, ассоциированных со структурой, классом и видом действия изучаемого вещества.

Оценку безопасности остаточных количеств ветеринарных препаратов проводят в зависимости от одного из трех типов воздействия: токсическому, фармакологическому и/или антимикробному.

Базовые тесты включают определение:

- токсичных эффектов, ассоциированных с повторяющейся или кумулятивной экспозицией АБ и/или их метаболитов, частоту и тяжесть дозо- и время-зависимых эффектов, дозы, ассоциированные с токсичными и биологическими ответами, NOAEL;

- репродуктивной токсичности;

- тератогенности и эмбриотоксичности;

- генотоксичности.

Дополнительные тесты включают определение:

- влияния на микрофлору кишечника человека;

- фармакологического действия;

- иммунотоксичности;

- нейротоксичности и канцерогенности.

Для интерпретации данных, полученных в дополнительных тестах, в зависимости от выявленных эффектов могут использоваться специальные тесты.

Подходы к проведению отдельных тестов приведены в соответствующих разделах настоящих методических указаний. Фармакологическое действие заключается в определении фармакологического NOAEL, которое принимается во внимание при установлении ADI/МДУ ВП.

Нормативами допустимых уровней воздействия остаточных количеств АБ в пищевой продукции являются допустимая суточная доза (ДСД/Acceptable daily intake (ADI)), микробиологическая допустимая суточная доза (мДСД/microbiological Acceptable daily intake (mADI)), на основе которых устанавливается максимально допустимый уровень содержания в пищевой продукции (МДУ/Maximum residue limit (MRL)).

Необходимость проведения оценки влияния АБ на микрофлору кишечника человека обосновывается на основе оценки микробиологического риска с использованием экспериментальных или литературных данных.

При наличии данных о воздействии остаточных количеств антибактериальных препаратов на кишечную микрофлору человека, то есть при наличии микробиологического риска, необходимо определить:

- являются ли остаточные количества АБ или его метаболита активными по отношению к кишечной микрофлоре человека;

- каковы особенности фармакокинетики препарата – проходит ли через толстый кишечник большая часть остаточных количеств антибактериального препарата или его метаболита;

- теряют ли антибактериальные препараты свою микробиологическую активность при метаболизме в кишечнике.

4.4.1. Определение активности АБ по отношению к кишечной микрофлоре человека.

Для определения потенциальной активности остаточных количеств антибактериального препарата или его метаболита по отношению к кишечной микрофлоре человека рекомендуется использовать минимальные концентрации антибиотика, ингибирующие рост 50% культур определенного микроорганизма (MIC50), полученные

стандартными методами испытаний, для следующих соответствующих родов кишечных бактерий (E. Coli, видов Bacteroides, Bifidobacterium, Clostridium, Enterococcus, Eubacterium (Collinsella), Fusobacterium, Lactobacillus, Peptostreptococcus и Peptococcus) с учетом современных научных знаний.

При отсутствии полной информации о влиянии на микроорганизмы исследуемого препарата, предполагается, что АБ и (или) его метаболиты являются микробиологически активными.

4.4.2. Определение особенностей фармакокинетики.

Для определения особенностей фармакокинетики препарата или его метаболита используется информация о поглощении, распределении, экскреции, биодоступности и иная информация, дающая представление о проценте остаточного количества препарата или его метаболита, поступающего в толстый кишечник.

Для определения фармакокинетики рекомендуется использовать данные экспериментальных исследований на человеке или лабораторных животных. При отсутствии доступной информации о фармакокинетике антибиотика, рекомендуется предположить, что 100% остаточного количества антибиотика проходит через толстый кишечник.

4.4.3. Определение потери микробиологической активности АБ при метаболизме в кишечнике.

Информация может быть получена при исследовании инактивации препарата *in vitro*, инкубированного с фекалиями, или исследований *in vivo*, при оценке микробиологической активности препарата или его метаболита в экскрементах.

При получении отрицательного ответа на любой из трех вышеуказанных тестов микробиологический риск отсутствует,

установление микробиологической допустимой суточной дозы (мДСД/mADI) нецелесообразно и ADI следует определять с учетом применения токсикологического подхода.

При наличии микробиологического риска для определения mADI учитывают основные неблагоприятные эффекты, возникающие под действием остаточных количеств АБ в кишечнике:

- нарушение соотношения аэробных и анаэробных форм;

- развитие антибиотикорезистентных микроорганизмов.

При отсутствии точных данных для определения основного неблагоприятного эффекта исследуются оба варианта неблагоприятного действия.

На основании микробиологических исследований (*in vivo* или *in vitro*) устанавливается NOAEL или максимально недействующая концентрация (No-observable adverse effect concentration (NOAEC), которые используются для определения mADI.

Если основным неблагоприятным эффектом является изменение колонизации кишечника, mADI устанавливается на основании следующих формул для проведенных исследований *in vitro* (1, 2) и *in vivo* (3):

$$mADI = \frac{MIC_{50} \times M}{C \times F \times m} \quad (1)$$

$$mADI = \frac{\mathrm{NOAEC} \times M}{C \times F \times m} \quad (2)$$

$$mADI = \frac{\mathrm{NOAEL}}{F} \quad (3)$$

где: mADI - микробиологическая допустимая суточная доза поступления остаточных количеств антибиотика (мг/кг);

MIC_{50} – минимальная концентрация антибиотика, ингибирующая рост 50% культур определенного микроорганизма (мкг/кг массы тела);

NOAEC - максимально недействующая концентрация (мг/л);

NOAEL - максимально недействующая доза (мг/кг);

M – масса выделяемого кишечного содержимого (220 г в день);

C – фракция дозы, ингибирующая рост микроорганизмов в кишечнике при пероральном введении;

F – коэффициент запаса;

m – масса индивидуума (60 кг).

Если основным неблагоприятным эффектом считается развитие антибиотикорезистентной микрофлоры, mADI устанавливается на основании следующих формул (4) – для исследований *in vitro*, (5) - для исследований *in vivo*:

$$mADI = \frac{\text{NOAEC} \times M}{C \times F \times m} \ldots \quad (4)$$

$$mADI = \frac{\text{NOAEL}}{F} \quad (5)$$

На основании ADI/ДСД или mADI/мДСД устанавливается МДУ АБ в пищевой продукции с использованием общепринятых подходов.

5. Требования к проведению экспериментов и необходимого набора методик проведения экспериментов для обоснования гигиенических нормативов содержания биологических агентов в пищевой продукции по критериям риска здоровью человека.

5.1. Требования к перечню микробиологических исследований (тестов) для обоснования гигиенических нормативов содержания биологических агентов в пищевой продукции по критериям риска здоровью человека.

Основным критерием выбора микробиологических исследований (тестов) для обоснования гигиенических нормативов содержания биологических агентов в пищевой продукции служит целевая направленность этапа оценки микробного риска (ОМР):

- идентификация биологического агента как опасного фактора;

- оценка воздействия (экспозиции) опасного фактора на восприимчивый организм);

- оценка реакции «доза-ответ» (характеристика опасного фактора).

Оценка воздействия в минимальном варианте должна дать оценку либо количества патогенных бактерий, либо уровня бактериального токсина, потребляемого в пищу.

Соответственно, в перечень микробиологических исследований (тестов) для обоснования гигиенических нормативов содержания биологических агентов в пищевой продукции по критериям риска здоровью человека включают:

5.1.1 При идентификации биологического агента:

изучение уровней загрязнённости инкриминируемой продукции бактериями, вирусами, микробными токсинами, обусловливающими характерный для заболевания симптомокомплекс;

определение таксономической характеристики на уровне род/вид/подвид/серотип/фаготип (для бактерий); род/вид/подвид (для вирусов); секция/род/вид (для микроскопических грибов); нуклеотидной последовательности (сиквенса), характерной для фактора патогенности или трансмиссивной резистентности (для бактерий, мицелиальных грибов, дрожжей), а также химической структуры/хемотипа/иммунотипа (для токсинов и токсических метаболитов бактерий или грибов);

изучение профиля чувствительности штамма к противомикробным препаратам из числа употребляемых в медицине и ветеринарии современных фармакологических средств и трансмиссивной природы выявленной резистентности;

изучение вирулентности биологических агентов и наличия у них факторов патогенности (оценка токсичности, токсигенности, адгезивности, инвазивности, иммунотропной активности, продукции ферментов, нарушающих физиологические защитные барьеры макроорганизма) в моделях *in vivo, in vitro, ex vivo*;

изучение антимикробного действия биологических агентов и их способности к колонизации в кишечнике или репродуцированию в ЖКТ в моделях *in vivo, in vitro, ex vivo*.

5.1.2 При оценке экспозиции восприимчивого организма биологическим агентом:

- изучение экологии биологических агентов в пищевой продукции (степень выживания, роста и размножения, патогенный/токсигенный потенциал);

- при необходимости – изучение наличия связи между содержанием патогенных биологических агентов с индикаторными (санитарно-показательными) микроорганизмами в пищевой продукции.

Основными требованиями к микробиологическим исследованиям для целей оценки экспозиции являются:

а) получение только количественных результатов для характеристик воздействия биологических агентов, которые должны быть выражены в сопоставимых единицах измерения (численность в колониеобразующих единицах (КОЕ) на 1 г (порцию); количество токсина в мкг/г (порции) пищевой продукции; частота контаминации изучаемым биологическим агентом пищевой продукции на каждом

этапе по ходу пищевой цепи и в конечной точке потребления; частота потребления заражённой пищи в популяции, группе и на индивидуальном уровне);

б) использование в экспериментах только парной комбинации «один биологический агент – одна пищевая продукция» в соответствии с профилем риска, установленным на старте ОМР. Любое отступление от данного принципа должно иметь соответствующее обоснование;

в) использование санитарно-показательных микроорганизмов (как в виде групп и популяций, так и отдельных штаммов) в качестве биологических агентов, включаемых в перечень для обоснования гигиенических нормативов содержания биологических агентов в пищевой продукции по критериям риска здоровью человека, только для изучения наличия их коррелятивной связи с присутствием трудно культивируемых патогенных биологических агентов.

5.1.3. При оценке реакции доза-ответ (характеристике опасного фактора) в перечень тестов включают проведение экспериментов разного типа на специально созданных моделях *in vivo* на животных, *in vitro*, *ex vivo* для изучения ответа восприимчивого организма на воздействие биологического агента, поступающего с пищевой продукцией.

Основными требованиями к микробиологическим исследованиям для целей оценки реакции доза-ответ являются:

а) выбор животных, пригодных для экстраполяции получаемых данных об иммунном ответе и восприимчивости к инфекциям на человека;

б) использование только оральных способов заражения животных биологическими агентами (пероральное, внутрижелудочное введение или естественное кормление инфицированной продукцией);

в) максимальное стремление к получению количественных показателей для характеристик ответа организма на воздействие биологического агента;

г) использование минимального количества животных, необходимых для получения статистически достоверных результатов;

д) использование современных допущенных способов анестезии при умерщвлении экспериментальных животных.

При проведении микробиологических исследований (тестов) для обоснования гигиенических нормативов их содержания в пищевой продукции по критериям риска здоровью человека используемые процедуры и методики должны выполняться в соответствии с требованиями принципов надлежащей лабораторной практики с учётом ГОСТ 33647-2015 «Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP). Термины и определения», ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики», ГОСТ 31886-2012 «Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP). Применение Принципов GLP к краткосрочным исследованиям».

Для исследований должны быть использованы воспроизводимые аттестованные стандартизованные методы микробиологического, иммунологического, биохимического, молекулярно-генетического анализа. Допускается использование альтернативных методик, валидированных в установленном порядке.

5.2. Алгоритм создания профилей риска биологических агентов, идентифицированных в пищевой продукции.

Профили риска разрабатываются с целью идентификации связи микроорганизма или микробного токсина (метаболита), способного вызвать отрицательный эффект для здоровья, с конкретной продукцией или группой продукции и с факторами, при которых эти патогены будут

концентрироваться именно в них, а также собрать научные и практические данные, подтверждающие значимость этой комбинации.

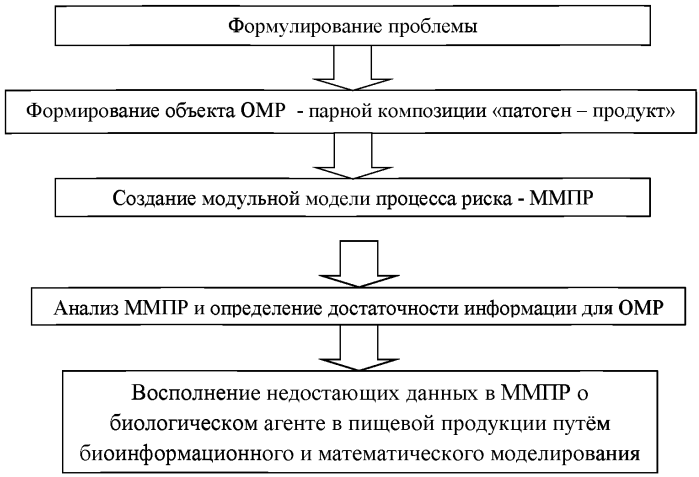
На этапе создания профилей риска должна быть сформулирована проблема, несущая существенную угрозу для здоровья населения. Для этого должны быть собраны и обобщены сведения о заболеваемости определенными инфекциями и/или токсикоинфекциями с алиментарным путём передачи, пищевыми отравлениями, а также сведения о социальных и экономических последствиях, обусловленных данными нозологиями, происходящие из официальных источников (органы государственного санитарно-эпидемиологического, ветеринарного надзора, государственной статистики).

При разработке профиля риска должна быть подтверждена связь целевого биологического агента с основным источником его поступления - конкретной пищевой продукцией или определенным видом пищевой продукции, то есть создана пара «патоген - продукт» для использования в ОМР. Для этого необходимо объединить сведения о заболеваемости определенной инфекцией (нозологией) и её негативных последствиях с объемами потребления, ресурсами и технологиями, существующими способами контроля, которые могут обусловливать концентрацию биологического агента в определённой пищевой продукции.

Для определения этапа, на котором происходит основное накопление возбудителя в продукции, профиль риска необходимо максимально детализировать. Для этого разрабатывают модульную модель процесса риска (ММПР) - генеральную структурную схему продвижения пищевой продукции по пищевой цепи, от сырья до конечного потребления. В ММПР включают события, оказывающие влияние на передачу любого микробного опасного фактора в любом

пищевом процессе, для оценки поведения конкретных биологических агентов на каждом этапе производства и каждой отдельной ступени продвижения продукции.

В целом, алгоритм создания профилей риска биологических агентов, идентифицированных в пищевой продукции, представлен на схеме.



Для получения объективных итоговых величин нагрузки определяется, в каком звене пищевой цепи (от сырья до конечного потребления) происходит основное накопление возбудителя. Соответственно, распространенность (частота обнаружения) и концентрация (количественные уровни содержания) биологических агентов в конкретных пищевых продуктах должны оцениваться на каждом этапе производства и продвижения продукта, с использованием допущений, учитывающих вариабельность их поведения в пищевом субстрате, изменчивость и ассоциированную неопределенность.

5.3. Принципы используемых модельных систем *in vitro* и *in vivo* и методик проведения биологических экспериментов с учётом необходимости обеспечения характеристик неблагоприятных эффектов биологических агентов в организме.

Для получения адекватных характеристик неблагоприятных эффектов на организм биологических агентов, поступающих с пищей, в моделях «доза - ответ» и выбора методик проведения биологических экспериментов следует руководствоваться информацией п. 5.1. При выборе необходимо учитывать следующие принципы:

1) Биологическая адекватность модели.

Поскольку регулирующим компонентом инфекционного процесса выступают факторы, влияющие на биологический агент в организме хозяина (восприимчивость контингента потребителей) и на путях его передачи в среде обитания, типы используемых модельных систем при проведении биологических экспериментов должны определяться их совокупностью.

2) Корреляция порога негативного эффекта (минимальной инфицирующей дозы, минимальной токсической дозы, минимального повреждающего эффекта на кишечную микробиоту и т.п.) у использованного вида животных с ответом человеческого организма.

3) Соответствие направленности эффектов, устанавливаемых в моделях *in vitro* и *ex vivo*, эффектам в моделях *in vivo*.

4) Подтверждение зависимостей, полученных в моделях *in vivo*, результатам клинических наблюдений на добровольцах (при возможности получения).

5) Использование допущений (вспомогательных данных по неопределенностям или изменчивости), полученных воспроизводимыми методами.

6) Соответствие дизайна и процедуры моделей требованиям доказательности.

7) Мультицентрический подход к модельным исследованиям.

На этапе характеристики риска определяются параметры возможных патологических исходов в ответ на воздействие количества поступивших микроорганизмов. Предварительно оценивается влияние кислотности желудка, факторов желчи, локального иммунитета (концентрация лизоцима, sIgA, интерферонов) и др.

Следует использовать модели, воспроизводящие весь комплекс влияний, которое воздействует на возбудитель в разных отделах ЖКТ. Наиболее точным является использование многосекционных моделей, позволяющих оценивать для патогена последовательно такие атрибуты, как степень кислотной инактивации в желудке, способность репродуцироваться в кишечнике, прикрепления к энтероцитам, выживание в среде, населённой кишечными симбионтами (хемостаты, SHIME-реакторы и т.п.), расчет вероятности поведения микроба в организмах с различным уровнем иммунитета. Принципы используемых модельных систем *in vitro* и *in vivo* и методик проведения биологических экспериментов приведены в таблице 5.

Таблица 5

Принципы используемых модельных систем *in vitro* и *in vivo* и методик проведения биологических экспериментов

В тестах *in vitro*:	
Степень ингибиции биологических агентов в среде желудка	Устанавливается путем изучения выживаемости в имитационной модели желудка взрослого человека или ребенка по числу колоний, вырастающих на элективной питательной среде
Устойчивость к желчи (желчным кислотам)	Устанавливается путем изучения выживаемости биологических агентов при последовательном инкубировании в имитационной модели желудка и проксимального отдела кишечника по числу колоний, вырастающих на элективной питательной среде

Способность к адгезии к эпителиальным клеткам человека и энтероцитам	Устанавливается в эксперименте
Способность к взаимодействию с клетками иммунной системы и модуляции выработки цитокинов	Анализ штаммов на способность ингибировать секрецию цитокинов мононуклеарными клетками человека (hPBMC)
Способность к противовоспалительному клеточному эффекту	Измерение уровней синтеза IL-10, IL-12, TNFα, INFγ путем ИФА-ELISA в супернатанте культуры после 24 ч инкубации в присутствии взвеси hPBMC и отбор штаммов, способных синтезировать оптимальное соотношение IL-10/ IL-12
В тестах *in vivo* на лабораторных животных	
Острая и хроническая токсичность	Устанавливается в эксперименте
Способность к адгезии патогенных микроорганизмов в кишечнике	Устанавливается в моделях инфекций у белых мышей линии Balb(c) при пероральном введении серии десятикратно возрастающих (от 1 КОЕ/голову) концентраций изучаемого штамма
Способность штамма к колонизации в кишечнике	Исследуется в моделях гнотобионтов, а также в моделях конвенциональных животных при посуточном наблюдении за выделением штамма с фекалиями после затравки
Способность к модуляции общего и локального иммунного ответа	Исследуется в моделях гнотобионтов, иммунокомпрометированных конвенциональных лабораторных животных (в моделях иммунодефицита), в том числе с различными привитыми инфекциями. Проводится измерение показателей макро- и микроскопического состояния органов иммунной системы, а также уровней выработки иммуноглобулинов, характеризующих общий и специфический иммунный ответ
Способность к транслокации во внутренние органы	Устанавливается путем посева кусочков внутренних органов (печень, селезенка, легкие) на питательные среды для выделения изучаемых штаммов
Антимикробная активность в отношении симбионтной нормальной микрофлоры в соответствующих биотопах желудочно-кишечного тракта	Устанавливается в эксперименте
Развитие трансмиссивной резистентности представителей нормальной симбионтной микрофлоры к антимикробным препаратам	Устанавливается в эксперименте

В качестве параметров для дальнейшего математического моделирования используются полученное число живых микробных клеток, вирусных частиц (по отношению к проглоченному), обладающих патогенностью.

Любые лимитирующие пороговые значения из полученных в процессе оценки вредного действия используются в качестве исходных данных для математического моделирования с ассоциированной неопределённостью.

Если пороги показателей адгезии, инвазии, транслокации во внутренние органы, иммунотропной активности, антимикробного действия (дисбиотического эффекта), колонизации в кишечнике, развития антимикробной резистентности и передачи генов трансмиссивной устойчивости представителям микрофлоры кишечника ниже порога вирулентности, токсичности, токсигенности, то они также могут служить отправными точками (биологическими конечными точками) для построения модели зависимости.

Точкой для расчёта также является число людей в популяции, употребивших с конкретным продуктом конкретную дозу патогена, у которых он вызвал либо инфицирование (адгезию в ЖКТ), либо манифестацию болезни. Для этого допускается использовать как результаты экспериментального моделирования на животных, так и результаты наблюдений за людьми-добровольцами, данные анализа реальных вспышек заболеваний от пищи.

Для выявления зависимости «Доза микроба – отрицательный эффект» выбирают её критерии (биологические конечные точки) для прогнозирования, по какому пути пойдет процесс при вариабельности обоих живых объектов - патогена и макроорганизма.

Для выявления общих механизмов и детерминант пищевой заболеваемости в случае расследования вспышек применяют эпидемиологические методы анализа заболеваемости населения, обусловленной пищевым фактором, в том числе ретроспективный или

оперативный (в реальном времени) анализ заболеваемости, число потерянных лет жизни и т.д.

Существенным вопросом при оценке риска является оценка тяжести инфекционных заболеваний как биологических ответов воздействия микробных агентов. До проведения более детальных исследований, посвященных оценке тяжести инфекционных заболеваний целесообразно использовать результаты экспертной оценки тяжести (серьезности) инфекционных и паразитарных заболеваний, вероятно связанных с биологическим загрязнением среды обитания человека.

Для характеристики неблагоприятных эффектов остальных вариантов поступления биологических агентов в организм доступным методом для оценки степени тяжести и вероятности наступления неблагоприятного эффекта являются качественная или полуколичественная оценка микробиологического риска с ассоциированной неопределённостью. В частности, с этой целью для сравнительных исследований по уровням биологической опасности и качественным оценкам вероятных последствий для здоровья человека (измерение уровня опасности) на определенных этапах продвижения продукта допускается использование эпидемиологической информации об уровнях минимальных инфицирующих доз (МИД). В случае, если значение МИД не установлена, ответ на дозу поглощенных с пищей микробов в характеризуется не в виде порога МИД возбудителя, а как показатель вероятности присутствия биологического агента в пищевой продукции, вероятности ее употребления и вероятности развития инфекции независимо от степени её тяжести.

6. Требования к проведению эпидемиологических исследований для обоснования гигиенических нормативов содержания химических

примесей, биологических агентов в пищевой продукции по критериям риска здоровью человека и его эволюции.

Эпидемиологическое исследование должно состоять из трех основных этапов: организационно-подготовительного; сбора информации; заключительного с формулированием выводов.

Организационно-подготовительный этап должен включать в себя:

- формулирование окончательной и промежуточной целей;

- формулирование рабочей гипотезы;

- выбор объекта исследования. Определение пищевого продукта, а также фактора экспозиции и его влияние на состояние здоровья исследуемой группы населения;

- первичное описание планируемого исследования, включая описание дизайна эпидемиологического исследования с указанием объема выборки.

На втором этапе сбор информации осуществляется двумя методами:

- метод постоянного (текущего, динамического) сбора. Постоянный сбор данных по мере их возникновения, в течение необходимого промежутка времени;

- метод одномоментного (единовременного, одновременного) сбора. Отражает состояние изучаемого явления только на определенный момент времени.

Требуемая для проведения эпидемиологического исследования информации собирается посредством:

- анализа баз данных (статистические формы, медицинские осмотры и исследования, социальные обследования, инструментальные и лабораторные исследования и т.д.);

- выкопировки – предусматривает извлечение необходимых данных из различной медицинской и не медицинской документации;

- опроса – предусматривает очную/заочную (по телефону) беседу с получением ответов на вопросы;

- анкетирования – заочный вариант опроса с заполнением специального бланка с вопросами – анкеты;

- непосредственного сбора (наблюдения) – регистрация сведений при непосредственном участии.

В качестве исходных сведений для получения необходимой информации для задач проведения эпидемиологического исследования анализируются:

1) Информация о контингенте для подбора групп исследования. При подборе групп для проведения эпидемиологического исследования необходимо избегать влияния мешающих факторов: наличия сопутствующих заболеваний различных органов и систем, вредных привычек (курение, употребление алкоголя и др.), особых пищевых привычек (в том числе, связанных с возрастом) или нестабильного иммунно-аллергологического статуса на пищевую продукцию, низкого социального статуса и уровня образованности;

2) Данные об экспозиции химических примесей/биологических агентов, содержащихся в пищевой продукции, которые предусматривают информацию о частоте потребления пищевой продукции и количественном содержании (уровне) в ней химических примесей/биологических агентов (концентрация/доза);

3) Вероятные эффекты/ответы, как результат воздействия на популяцию (смертность, заболеваемость, донозологические состояния, изменения лабораторных показателей, и т.д.). В качестве

ответа со стороны здоровья при проведении эпидемиологического исследования рассматриваются:

- для задач установления гигиенических нормативов содержания химических агентов в пищевой продукции – заболевания согласно Международной классификации болезней 10-го пересмотра, соответствующие критическим органам и системам при пероральной экспозиции (приложение 1);

- для задач установления гигиенических нормативов содержания биологических агентов в пищевой продукции - наличие/отсутствие инфекционного заболевания;

- отклонения от нормы клинико-лабораторных показателей, характеризующих работу органов и систем человека.

Время сбора необходимых данных определяется программой эпидемиологического исследования. Для задач проведения эпидемиологического исследования вся полученная информация должна быть упорядочена, сведена, сгруппирована и представлена в табличном виде:

название таблицы должно отражать её содержание. Необходимо указать исследуемую пищевую продукцию (группу продукции), экспозиционный фактор (химические примеси/биологический агент), исследуемую целевую группу (например, дети 3-7 лет), указать территорию и временной период сбора данных (например, Москва, 2017 г. или Пермь, 2013-15 гг. и т.д.);

таблицы должны содержать количественную информацию о:

- численности исследуемого населения/группы/выборки;

- уровнях экспозиции содержания химических примесей, биологических агентов в пищевой продукции;

- проведенных клинико-лабораторных исследованиях (отдельно для каждого показателя) с отклонениями относительно нормы (уменьшение/превышение);

- уровне заболеваемости (интенсивные/абсолютные показатели) по исследуемой нозологии/классу болезни в отдельности.

Заключительный этап включает в себя объединение полученных результатов исследования в единый текстовый документ с табличным и графическим отображением и формулирование выводов (заключения). Выводы должны содержать информацию в виде установления отправных точек (реперный уровень, BMD, BMDL) для установления ДСД и МДУ химических примесей и биологических агентов, поступающих с пищевыми продуктами и показатели для формирования эволюционных моделей (RR, параметры моделей зависимости «экспозиция – вероятность ответа»).

6.1. Определение дизайна эпидемиологических исследований и объема выборки.

Критериями, определяющими выбор дизайна эпидемиологического исследования для задач установления гигиенических нормативов содержания химических примесей, биологических агентов в пищевой продукции по критериям риска здоровью человека являются:

- природа контаминирующего фактора (химические примеси/биологический агент);

- распространенность контаминанта. В случае широкой распространенности фактора применяется наблюдательное исследование; низкой – экспериментальное;

- характер ответа (при средней тяжести и тяжелых последствиях – эпидемиологическое исследование должно носить наблюдательный характер; при легкой – возможно проведение эксперимента).

- объем информации о факторе экспозиции: при широкой изученности фактора возможно проведение ретроспективного анализа данных (в случае их достаточности); при недостаточном для исследования объеме информации проводится проспективное исследование, которое позволяет более точно и четко определить необходимые параметры для проведения исследования;

- время возникновения неблагоприятного эффекта на здоровье. Для изучения отдаленных эффектов воздействия неблагоприятных факторов на здоровье применяются продольные эпидемиологические исследования; при неотдаленных эффектах – поперечные;

- длительность воздействия контаминирующего фактора: в случае необходимости длительного воздействия изучаемого фактора для формирования нарушений со стороны здоровья целесообразно проведение продольного эпидемиологического исследования; в остальных случаях – поперечное;

- уровень заболеваемости. При невысоких уровнях заболеваемости, получение информации об экспозиции для выборки из исследуемого населения является менее дорогим и более информативным при эпидемиологическом исследовании «случай-контроль», так как необходимо исследовать меньшее число людей;

- объем выборки. При большом объеме выборки исследуемой группы населения применяется исследование «случай-контроль». При небольших группах исследования предпочтительным вариантом является когортное исследование.

Приоритетными вариантами эпидемиологического дизайна для задач установления гигиенических нормативов в пищевой продукции по критериям риска здоровью человека являются:

- для химических примесей - экспериментальное, выборочное, поперечное, проспективное эпидемиологическое исследование «случай-контроль»;

- для биологических агентов - наблюдательное, выборочное, поперечное, ретроспективное эпидемиологическое исследование «случай-контроль».

Определение объема выборки для исследования.

Определение объема выборки для проведения эпидемиологических исследований для обоснования и установления гигиенических нормативов содержания химических примесей, биологических агентов в пищевой продукции необходимо проводить с применением статистического метода расчета на основе данных о численности исследуемого населения.

Необходимые параметры для определения точного объема выборки:

- частота заболеваний;

- численность целевой группы.

Размер выборки рассчитывается по формулам (6, 7):

1) при *неизвестной* численности целевой группы:

$$n=(t^2*(I*(R-I))/\Delta^2 \quad (6)$$

2) при *известной* численности целевой группы:

$$n=(I*(R-I)*t^2*N)/((N*\Delta^2)+(I*(R-I)*t^2) \quad (7)$$

где n – искомая численность выборки;

N – численность целевой группы;

t – критерий достоверности (равен 1,96 для точности 95%);

I – предполагаемая частота заболеваний;

R – показатель размерности заболеваемости (например, на 1000 населения и т.д.);

Δ - выбранная предельно допустимая ошибка показателя (максимально допустимая ошибка составляет не более 25% от величины показателя I).

Критерий достоверности (t) отражает точность объема выборки. Объем выборки считается достоверным от 95%, что соответствует показателю критерия достоверности равному 1,96.

Определение объема выборки, необходимого для изучения клинико-лабораторных показателей, характеризующих работу органов и систем человека, проводится на основе затратного метода.

При планировании клинико-лабораторных исследований для обоснования гигиенических нормативов содержания химических примесей, биологических агентов в пищевой продукции по критериям риска здоровью человека необходимый объем выборки определяется затратным методом в соответствии с суммой расходов, запланированной на проведение исследования. Минимальный объем выборки при применении затратного метода должен составлять не менее 5% от объема выборки, рассчитанной статистическим методом, но не менее 50 человек.

6.2. Требования к сценариям экспозиции при проведении эпидемиологического анализа.

При оценке воздействия химических контаминантов пищевой продукции сценарий экспозиции должен включать в себя:

- возможность поступления контаминантов в пищевую продукцию из упаковочных материалов (включая данные о накоплении со временем);

- информацию о возможности образования контаминантов в пищевой продукции с течением времени;

- данных о содержании в пищевой продукции метаболитов контаминанта;

- возможность поступления контаминантов пероральным путем с питьевой водой;

- частоту потребления пищевой продукции, в том числе чувствительными группами населения;

- региональные, сезонные и этнические различия в потреблении пищевой продукции.

При оценке воздействия биологических агентов пищевой продукции сценарий экспозиции должен включать в себя:

- данные о контаминировании продукции биологическими агентами в рамках пищевой цепи (перекрестное загрязнение в процессе обработки, хранения, транспортировки);

- информацию об источнике и пути передачи, данные о сохранении и размножении в пищевой продукции;

- региональные, сезонные и этнические различия в потреблении пищевой продукции;

- данные о наличии устойчивости биологических агентов к противомикробным препаратам и устойчивости в окружающей среде;

- данные о проведении и эффективности мер предупреждения возникновения микробиологического загрязнения.

6.3. Установление эпидемиологических показателей при проведении исследований для обоснования гигиенических нормативов

содержания химических примесей, биологических агентов в пищевой продукции.

Для оценки связи влияния изучаемого фактора экспозиции на состояние здоровья группы исследуемого населения рассчитывается:

- отношение шансов (OR), которое показывает, во сколько раз выше в исследуемой группе шансы заболеть при воздействии изучаемого фактора экспозиции в сравнении с группой без воздействия фактора экспозиции;

- 95% доверительный интервал (DI) для оценки достоверности наличия связи «экспозиция-ответ». Оценка доверительного интервала дает информацию о достоверности результатов исследования;

- отношение рисков (RR или OP) вместе с результатами моделирования зависимости «экспозиция – ответ» используется для верификации ДСД с помощью эволюционного моделирования.

6.4. Методические подходы к моделированию зависимости «экспозиция – ответ» с использованием эпидемиологических показателей.

При построении математических моделей зависимости «экспозиция – ответ» необходимо учитывать наличие порогового действия у фактора экспозиции при поступлении химических веществ.

6.4.1. Моделирование зависимости «экспозиция – ответ».

Построение парной математической модели включает последовательное выполнение следующих шагов:

1) Формирование таблицы данных сопряжённых значений «экспозиция — ответ»;

2) Расчет эффекта как вероятности отклонения ответа от нормы для каждого наблюдения в таблице данных;

3) Оценка параметров математической модели, отражающей зависимость вероятности отклонения ответа от нормы экспозиции.

Необходимо представить сопряжённые значения «экспозиция – ответ» и «вероятность экспозиции – вероятность ответа» в табличной форме.

Расчет вероятности отклонения ответа от нормы для каждого наблюдения в таблице данных необходимо проводить с использованием технологии «скользящего окна» с определением его ширины (δ).

Оценка вероятности отклонения ответа от нормы производится по формуле 8:

$$p_i = \frac{m_i}{n_i}, \tag{8}$$

где m_i — число исследований, отклоняющихся от нормы для диапазона x_i — $\delta < x \leq x_i\text{-} + \delta$;

n_i — общее число исследований для диапазона x_i — $\delta < x \leq x_i\text{-} + \delta$.

Оценка параметров парной модели, отражающей зависимость «экспозиция — вероятность ответа» проводится методом построения логистической регрессионной модели (формула 9):

$$p = \frac{1}{1 + e^{-(b_0 - b_1 x)}}, \tag{9}$$

где p — вероятность отклонения ответа от нормы;

x — уровень экспозиции;

b_0, b_1 — параметры математической модели

Определение параметров математической модели (b_0, b_1) производится методом наименьших квадратов с применением пакетов программ по статистическому анализу данных (Statistica, SPSS, SAS и др.). Алгоритм расчета реперного уровня основан на построении регрессионных моделей, отражающих влияние уровня экспозиции

на показатель «отношение шансов» (OR). Отношение шансов для каждого наблюдения в таблице данных определяется из соотношения (формула 10):

$$OR = \frac{\frac{p_i^+}{1 - p_i^+}}{\frac{p_i^-}{1 - p_i^-}}, \quad (10)$$

где i — индекс, отражающий номер наблюдения.

p_i^- – вероятность отклонения маркера ответа ниже нормы

p_i^+ – вероятность отклонения маркера ответа выше нормы

Оценка параметров зависимости показателя отношения шансов от значения экспозиции проводится методом построения регрессионной модели в виде экспоненциальной функции (формула 11):

$$OR = e^{a_0 - a_1 x}, \text{ где} \quad (11)$$

a_0, a_1 — параметры модели, определяемые методом регрессионного анализа.

x — уровень экспозиции

Для построения модели используются информация из таблицы данных и соответствующие им значения отношения шансов.

Расчет реперного уровня (нижней доверительной границы) экспозиции фактора (x_0) по отношению к виду ответа проводится исходя из условия OR = 1, по формуле 12:

$$x_0 = \frac{a_0}{a_1}. \quad (12)$$

a_0, a_1 — параметры модели, определяемые методом регрессионного анализа.

x — уровень экспозиции

6.4.2. Моделирование зависимости «экспозиция – вероятность ответа».

При отсутствии литературных данных о реперной концентрации/дозе такие уровни устанавливаются по результатам эпидемиологических исследований. В ходе проведения данных исследований производится вычисление показателей «отношение шансов» (OR) для исследованного диапазона уровней экспозиции. Реперный уровень определяется исходя из условия OR=1.

Парные модели, отражающие зависимость «экспозиция – ответ», позволяют получать оценку вероятности развития конкретных ответов (заболеваний и смерти) от воздействия химического вещества или биологического агента. Для построения парных моделей разрешается применять методы математического моделирования, основанные на использовании статистических и токсикологических данных с учетом биологической адекватности модели.

Метод эволюционного моделирования риска здоровью используется для верификации разработанных гигиенических нормативов с учетом сценария потребления пищевой продукции в течение всей жизни человека. Эволюционная модель накопления риска здоровью математически описывает процесс изменения состояния здоровья потребителей, находящихся под действием комплекса вредных факторов, свойственных продукции (товарам), в течение длительного времени.

Риск здоровью представляется в виде комбинации (произведения) тяжести на вероятность возникновения негативного эффекта (формула 13):

$$R_j(t) = g_j(t) \cdot P_j(t) \qquad (13)$$

где $R_j(t)$ – риск возникновения *j*-ого негативного ответа со стороны здоровья,

t – переменная времени (возраст), лет,

$g_j(t)$ – тяжесть j-ого негативного ответа со стороны здоровья,

$P_j(t)$ – вероятность возникновения j-ого негативного ответа со стороны здоровья.

7. Установление максимально допустимых уровней содержания химических примесей и биологических агентов в пищевой продукции.

Установление МДУ химических примесей и биологических агентов в пищевой продукции производится посредством последовательного выполнения обоснования допустимых суточных доз химических веществ, поступающих с пищевой продукцией, по критериям риска здоровью человека, уровней экспозиции химических веществ, не имеющих порогов воздействия, и биологических агентов, соответствующих приемлемому риску, с последующей их верификацией с использованием методологии оценки рисков здоровью населения при воздействии химических, физических и биологических факторов для определения показателей безопасности продукции (товаров), определения объема потребления пищевой продукции и расчетов МДУ. Обоснование ДСД/УПП химических веществ, поступающих с пищевой продукцией, по критериям риска здоровью человека производится на базе результатов токсикологических, биологических и эпидемиологических исследований, математического моделирования зависимости «экспозиция–эффект (ответ)», с учетом модифицирующих факторов и величины потребления пищевых продуктов.

В ходе токсикологических, биологических и эпидемиологических исследований должны быть получены результаты в виде отправных точек для обоснования допустимых суточных доз (ДСД) и условно

переносимого поступления (УПП) химических примесей и биологических агентов, параметров зависимости «экспозиция–эффект (ответ)» для верификации этих величин. Кроме того, сведения о проведении исследований используются при обосновании модифицирующих факторов.

7.1. Определение отправных точек (уровней воздействия) для установления ДСД/УПП химических примесей и биологических агентов, поступающих с пищевой продукцией.

В качестве отправных точек могут быть использованы следующие величины:

1) NOAEL (недействующий уровень) – максимальная доза (концентрация), при которой в токсикологических экспериментах не обнаруживается токсический или побочный вредный эффект.

2) LOAEL (пороговый уровень) – минимальная доза, при которой в токсикологических экспериментах наблюдается токсический или побочный вредный эффект.

3) BMD – статистическая нижняя доверительная граница экспозиции, установленная, чаще всего в эпидемиологических исследованиях, вызывающей установленный негативный эффект. При этом уровне экспозиции предполагается 10% (1%, 5%) превышение риска.

4) BMDL предлагается в качестве отправной точки для использования в оценке риска для здоровья и определяется как точка кривой зависимости доза-реакция, полученная из экспериментальных данных, обычно соответствующая низкому уровню воздействия (от 1 до 10%).

Отправные точки для установления максимально допустимых уровней содержания химических примесей в пищевой продукции могут

быть получены в результате проведения токсикологических экспериментов различной продолжительности (таблица 6).

Таблица 6

Продолжительность токсикологического эксперимента

Характер эксперимента	Продолжительность
Острый	Однократное введение; 14 суток
Подострый	2-8 недель
Субхронический	13-18 недель
Хронический	12 и более месяцев

При выборе отправных точек, приоритет отдается значениям, полученным в субхроническом и более продолжительных токсикологических экспериментах и эпидемиологических исследованиях.

При наличии данных о нескольких отправных точках выбор делается в пользу показателей, которые требуют применения меньшего количества модифицирующих факторов, а именно:

- наилучшим считается использование BMD, BMDL, т.к. данные показатели разработаны на основе математического моделирования зависимости доза-ответ, с использованием доступной релевантной информации о других экспериментах;

- при наличии данных полученных в ходе эпидемиологического анализа в человеческой популяции и данных токсикологических экспериментов на животных используются данные о воздействии на человека, таким образом, исключается модифицирующий фактор межвидовой чувствительности (подход BMD);

- при наличии данных о NOAEL и LOAEL используется NOAEL, что исключает использование дополнительного модифицирующего фактора при переходе от LOAEL к NOAEL;

- используются данные о воздействии на наиболее чувствительную группу испытуемых (при наличии) с целью исключения модифицирующего фактора внутривидовой чувствительности.

Для химических веществ с беспороговым характером действия, например генотоксических канцерогенов, в качестве отправных точек используются уровни экспозиции, соответствующие приемлемым уровням риска.

Для установления ДСД (УПП) по критерию канцерогенного риска использовалась формула 14, позволяющая рассчитать содержание вещества в продукте, обуславливающее его поступление в дозе, которая обеспечивает приемлемый уровень канцерогенного риска ($C_{пр}$):

$$C_{пр} = \frac{(CR \cdot m_m)}{(V \cdot SF)} \qquad (14)$$

где CR – приемлемый уровень канцерогенного риска;

m_m – масса тела;

V – среднесуточное потребление продукта (кг);

SF – фактор канцерогенного потенциала.

В качестве отправных точек для нормирования биологических агентов в пищевой продукции, с целью установления вирулентности микроорганизмов, используются следующие величины:

минимальная инфицирующая доза (МИД) биологического агента, количество исследуемой культуры микроорганизмов, которое не вызывает клинически проявляющуюся локальную или генерализованную инфекцию или паразитарное заболевание у взятых в опыт животных.

рассчитанная с использованием математических моделей вероятная минимальная инфицирующая доза ($МИД_{pi}$), не вызывающая инфекционное или паразитарное заболевание.

Определение вероятной минимальной инфицирующей дозы ($МИД_{pi}$) микроорганизмов, потреблённых с пищевой продукцией производится по формуле 15:

$$МИД_{pi} = -\frac{\ln[1-(R_i^{доп}/G_j)]}{r_{ij}} \quad (15)$$

где: $R_i^{доп}$ – допустимый риск для здоровья, обусловленный *i*-ым биологическим агентом;

G_j – тяжесть *j*-го заболевания, вызванного биологическим агентом

r_i – параметр, соответствующий вероятности *j*-го заболевания при воздействии единичного *i*-го биологического агента, КОЕ.

Накопленная в ходе токсикологических и эпидемиологических исследований информация о воздействии контаминантов на организм, используется для установления ДСД (УПП) с использованием модифицирующих факторов:

$$ДСД = POD/\prod MF \quad (16)$$

где *ДСД* – допустимая суточная доза / условно переносимое поступление;

POD – отправная точка (point of departure), мг/кг массы тела;

MF – величина модифицирующего фактора.

Применение модифицирующих факторов для установления ДСД (УПП) по критерию канцерогенного риска здоровью не требуется, так как модифицирующие факторы, в данном случае, учитываются при установлении фактора канцерогенного потенциала.

7.2. Выбор модифицирующих факторов для расчета ДСД/УПП.

Для обеспечения безопасности и установления ДСД/УПП, а также расчета ее величины из отправных пунктов в зависимости от типа,

объема, адекватности исследования применяются модифицирующие факторы, учитывающие:

межвидовую экстраполяцию (от 1 до 10);

внутривидовую экстраполяцию (от 1 до 10);

экстраполяцию с управляемого режима воздействия на реальные условия (от 1 до 10);

применяемые в качестве отправного пункта уровней экспозиции (от 1 до 10);

адекватность и объем данных (от 1 до 10);

экстраполяцию результатов исследований при кратковременном воздействии на сценарии постоянного воздействия (от 1 до 10).

Определение величины модифицирующих факторов производится экспертно с учетом следующих рекомендаций:

величина модифицирующего фактора, учитывающего межвидовую экстраполяцию, выбирается с учетом количества видов животных, использованных в эксперименте (таблица 7);

Таблица 7

Выбор модифицирующего фактора, учитывающего межвидовую экстраполяцию

Количество видов животных	Кратность фактора
5 и более, в том числе приматы	2-3
5 и более	3-5
2-3	6-8
1	10

величина модифицирующего фактора, учитывающего внутривидовую экстраполяцию в эпидемиологических и экспериментальных исследованиях выбирается с учетом репрезентативности выборки и включения в нее наиболее

чувствительных к действию исследуемого химического вещества или биологического агента субпопуляций (таблица 8);

Таблица 8

Модифицирующий фактор, учитывающий контингент исследования при внутривидовой экстраполяции

Контингенты исследования	Величина фактора
3 и более групп, в том числе наиболее чувствительные субпопуляции (дети, беременные, кормящие и пр.) с учетом национальных особенностей питания	1
Исследование 3-х и более групп с учетом национальных особенностей питания, но без учета наиболее чувствительного контингента	2-3
2-3 группы, без учета наиболее чувствительного контингента и без национальных особенностей питания	4-7
Исследование на наименее чувствительных группах (профессиональные группы)	8-10

величина модифицирующего фактора, учитывающая экстраполяцию с управляемого режима воздействия на реальные условия, выбирается с учетом уровня экспозиции (таблица 9);

Таблица 9

Модифицирующий фактор, учитывающий экстраполяцию с управляемого режима воздействия на реальные условия

Уровень экспозиции при изучении	Величина фактора
Высокий (более, чем в 10 раз выше реального)	7-10
Средний (отличие от реального в 5-10 раз)	3-6
Низкий (отличие от реального менее 5 раз)	2
Полное соответствие реальным условиям	1

величина модифицирующего фактора, учитывающего отправной пункт для установления ДСД/УПП, устанавливается в зависимости от применяемого в качестве отправного пункта уровня экспозиции (таблица 10);

Таблица 10

Модифицирующий фактор, учитывающий отправной пункт для установления ДСД/УПП

Отправной пункт для установления ДСД	Величина фактора
NOAEL	1
BMD	2-4
LOAEL, МИД	5-10

величина модифицирующего фактора, учитывающего адекватность и объем данных устанавливается в зависимости от количества адекватных исследований, результаты которых использовались при обосновании ДСД/УПП (таблица 11);

Таблица 11

Модифицирующий фактор, учитывающий объем исходных данных

Объем данных, число исследований	Величина фактора
Ограниченный объем данных, недостаточное число исследований (менее 2)	8-10
Ограниченный объем данных, число исследований 2-5	5-7
Полный набор данных число исследований более 6	2-4
Полный набор данных число исследований более 6, в том числе эпидемиологические	1

величина модифицирующего фактора, учитывающего экстраполяцию результатов исследований при кратковременном воздействии на сценарии постоянного воздействия, устанавливается в зависимости от кратности и продолжительности экспозиции в исследованиях, результаты которых использовались при обосновании ДСД/УПП (таблица 12).

Таблица 12

Модифицирующий фактор, учитывающий экстраполяцию результатов исследований при кратковременном воздействии на сценарии хронического воздействия

Длительность исследования	Величина фактора
Однократное воздействие	8-10
Однократное воздействие, повторяющееся до 5 раз в месяц	5-7
Воздействие в период от 1 месяца до 1 года	2-4
Воздействие более 1 года	1

Произведение величин всех модифицирующих факторов используется для корректировки величины экспозиции, принятой в качестве отправной точки для расчета ДСД/УПП по формуле 17:

$$ДСД = POD / \prod MF \quad (17)$$

где *POD* – отправная точка (point of departure), мг/кг массы тела;

MF – величина модифицирующего фактора.

Для гигиенических нормативов содержания биологических агентов в специализированной пищевой продукции (например, для детского питания) могут быть установлены модифицирующие коэффициенты (до 4), учитывающие внутривидовую экстраполяцию данных. Эти коэффициенты используются при расчете массы продукта, в которой наличие биологических агентов не допускаются.

8. Верификация ДСД/УПП, химических веществ, поступающих с пищевой продукцией, и уровней экспозиции биологических агентов, соответствующих приемлемому риску, с использованием методологии оценки рисков здоровью населения при воздействии химических и биологических факторов для определения показателей безопасности продукции (товаров).

Верификация ДСД/УПП химических веществ, поступающих с пищевой продукцией, и уровней экспозиции биологических агентов, соответствующих приемлемому риску, производится с использованием методологии оценки рисков здоровью населения при воздействии химических и биологических факторов для определения показателей безопасности продукции (товаров), предполагающей применение

метода прогнозирования риска здоровью с помощью эволюционных моделей.

Эволюционная модель накопления риска здоровью (эволюция риска нарушений функций органов и систем организма) при использовании продукции (товаров) является математическим описанием процесса изменения состояния здоровья потребителей, находящихся под действием комплекса вредных факторов, свойственных продукции (товарам), в течение длительного времени и служит для прогнозирования развития функциональных нарушений в человеческом организме, связанных с факторами среды обитания. При построении эволюционной модели учитываются процессы накопления функциональных нарушений в организме за счет естественных причин.

В соответствии с Методологией оценки рисков здоровью населения при воздействии химических, физических и биологических факторов для определения показателей безопасности продукции (товаров) риск здоровью представляется в виде комбинации (произведения) тяжести на вероятность возникновения негативного эффекта (формула 13).

Верификация величин допустимых суточных доз химических примесей по результатам прогнозирования эволюции риска здоровью выполняется с применением беспороговых математических моделей.

В качестве исходной информации для прогнозирования эволюции риска здоровью используются количественные параметры зависимости «экспозиция – эффект (ответ)», определенные в результате анализа релевантной научной литературы (пункт 3) и/или по данным токсикологических (пункт 4) и биологических экспериментов (пункт 5) и эпидемиологических исследований (пункт 6).

Для оценки вероятности негативного ответа со стороны здоровья применяется эволюционное уравнение с учетом естественных процессов (старения) и воздействия химических факторов (формула 18):

$$\frac{dP_j(t)}{dt} = \alpha_j \cdot P_j(t) + \sum_i \beta_{ji} f(F_{ji}, t), j = \overline{1, J}. \quad (18)$$

где $\alpha_j > 0$ – коэффициент, характеризующий скорость нарастания вероятности *j*-го негативного ответа со стороны здоровья за счет естественных процессов, [1/год];

β_{ji} – эмпирический коэффициент, отражающий силу влияния *i*-го химического фактора на вероятность возникновения *j*-ого негативного ответа, [1/год];

$f(F_{ji}, t)$ – функция, отражающая подмодель влияния *i* – го химического фактора со значением F_{ji} на *j*-ый негативный ответ со стороны здоровья, полученная по результатам эпидемиологических исследований или путем адаптации известных и опубликованных методов и моделей.

Верификация величин допустимых суточных доз химических примесей по результатам прогнозирования эволюции риска здоровью состоит из следующих этапов:

1) Обобщение всей доступной информации по количественным ответам на воздействие *i*–го химического фактора. По результатам выполнения этапа определяется вид функций $f(F_{ji}, t)$, отражающих подмодель влияния *i*–го химического фактора со значением F_{ji} на *j*-ое нарушение функций организма человека;

2) Идентификация параметров α_j, характеризующих скорость нарастания вероятности возникновения *j*-го негативного ответа за счет естественных процессов.

Коэффициенты α_j определяются исходя из фоновых показателей заболеваемости и смертности для классов болезней, отражающих функциональные нарушения критических органов и систем. В качестве фоновых уровней выбираются показатели здоровья, характерные для наиболее благополучных регионов с точки зрения загрязнения объектов окружающей среды.

Эмпирические значения коэффициентов учитывают как тяжесть клинического течения и исходов заболеваний, так и степень нарушения деятельности функциональных систем организма. Значения коэффициентов эволюции риска за счет естественных причин по критическим системам организма приведены в таблице 13.

Таблица 13

Значения коэффициентов эволюции риска за счет естественных причин

Критическая система	α_j
Сердечно-сосудистая система	0,0835
Дыхательная система	0,0245
Центральная нервная система	0,0106
Эндокринная система	0,0578
Органы слуха	0,0303
Мочевыделительная система	0,0046
Система пищеварения	0,0178

3) Идентификация параметров воздействия β_{ji} на основе адаптации результатов исследований данных исследований, полученных на первом этапе, к применению в соотношениях

эволюционной модели. Уравнение, определяющее коэффициент влияния фактора, можно записать в следующем виде (формула 19):

$$\beta_{ji} = \frac{\left(\frac{f(F_{ji},t)}{f(F_{0ji},t)} - 1\right) \cdot P_j(t_0) \cdot \left(e^{\alpha_j \cdot t_2} - e^{\alpha_j \cdot t_1}\right)}{f(F_{ji},t) \cdot \left(\frac{\left(e^{\alpha_j \cdot t_2} - e^{\alpha_j \cdot t_1}\right)}{e^{\alpha_j \cdot t_0} \cdot \alpha_j} - (t_2 - t_1)\right)}, \quad (19)$$

где t_0 – начальный момент времени;

t_1 – время начала воздействия фактора;

t_2 – время окончания воздействия фактора;

F_{0ji} – уровень фактора, не оказывающий воздействия.

Формула носит универсальный характер, ориентированный на произвольные функции. Частные случаи функций имеют особенности при выполнении процедуры адаптации.

4) Определение сценария экспозиции, характерного для контингента населения, потребляющего рассматриваемый вид продукции, то есть установление значения i – го химического фактора как функции от времени ($F_{ji}(t)$). Для верификации величин допустимых суточных доз значение экспозиции i – го химического фактора задается на их уровне.

5) Определение начальных условий (таблица 14) на момент времени t_0 – момент времени (возраст), с которого выполняется прогнозирование риска $P_j(t_0)$. Начальные уровни риска могут быть оценены по данным частоты и тяжести заболеваемости и смертности на момент начала расчета.

Таблица 14

Значения вероятности негативных ответов в начальный момент времени

Критическая система	$P_j(t_0)$
Сердечно-сосудистая система	0,001359
Дыхательная система	0,014177
Центральная нервная система	0,003560
Эндокринная система	0,000945
Органы слуха	0,001247
Мочевыделительная система	0,013102
Система пищеварения	0,022168

6) Идентификация коэффициентов функции тяжести возникновения негативного ответа (формула 20):

$$g(t) = (g_0 + g_1 t + g_2 t^2) e^{g_3 t}, \quad (20)$$

где g_i, $i = \overline{0,3}$ – коэффициенты зависимости тяжести от возраста, коэффициент g_0 является безразмерным, коэффициенты g_1, g_3 имеют размерность 1/год, g_2 – 1/год^2.

В таблице 15 приведены параметры зависимости тяжести некоторых заболеваний от возраста.

Таблица 15

Параметры зависимости тяжести некоторых заболеваний от возраста

Заболевание	g_0	g_1	g_2	g_3
Бронхиальная астма	9.69E-05	0.00E+00	0.00E+00	6.72E-02
Хронический бронхит	7.90E-05	0.00E+00	0.00E+00	6.72E-02
Невынашивание беременности	5.00E-01	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
Гипертензивная болезнь сердца	2.00E-06	0.00E+00	0.00E+00	1.35E-01
Атеросклероз	9.53E-05	0.00E+00	0.00E+00	1.08E-01
Вегетососудистая дистония	1.88E-06	0.00E+00	0.00E+00	1.35E-01
Ишемическая болезнь сердца	1.36E-01	0.00E+00	0.00E+00	1.99E-02
Ожирение	8.92E-05	0.00E+00	0.00E+00	5.82E-02
Сахарный диабет	7.12E-05	0.00E+00	0.00E+00	4.33E-02
Диффузный (эндемический) зоб	2.84E-05	0.00E+00	0.00E+00	9.33E-02

7) Прогнозирование риска с помощью численной схемы Рунге-Кутты (формулы 21-25) для определения вероятности негативного ответа со стороны здоровья $P_j(t)$:

$$P_j(t+K) = P_j(t) + \frac{K}{6} \cdot (k_1(t) + 2k_2(t) + 2k_3(t) + k_4(t)), \quad (21)$$

$$k_1(t) = \alpha_j P_j(t) + \sum_i \beta_{ji} f(F_{ji}, t), \quad (22)$$

$$k_2(t) = \alpha_{Lj}(P_j(t) + \frac{K}{2} k_1(t)) + \sum_i \beta_{ji} f(F_{ji}, t + \frac{K}{2}), \quad (23)$$

$$k_3(t) = \alpha_{Lj}(P_j(t) + \frac{K}{2} k_2(t)) + \sum_i \beta_{ji} f(F_{ji}, t + \frac{K}{2}), \quad (24)$$

$$k_4(t) = \alpha_{Lj}(P_j(t) + K k_3(t)) + \sum_i \beta_{ji} f(F_{ji}, t + K), \quad (25)$$

где K – шаг по времени; временной шаг, адекватный задаче прогнозирования риска, составляет 1 день (K=1/365 лет), причем на первом временном шаге расчет выполняется, основываясь на данных с временного шага, соответствующего начальному возрасту обследуемого, т.е. t на первом шаге будет равно t_0 (таблица 16);

$k_1(t)$, $k_2(t)$, $k_3(t)$, $k_4(t)$ – вспомогательные переменные.

Таблица 16

Значение коэффициента *K* для расчета риска за период *t*

Период времени, t	Час	День	Неделя	Месяц	Год
K	0,000114	0,00274	0,019231	0,83333	1

8) Рассчитать значения риска $R_j(t)$ в виде комбинации (произведения) тяжести на вероятность возникновения негативного эффекта (формула 26).

9) Расчет показателей приведенного индекса риска для интерпретации полученных результатов:

$$R_j(t) = \frac{R_j(t) - R_j^0(t)}{1 - R_j^0(t)}, \quad (26)$$

где $R_j^0(t)$ – риск возникновения *j*-ого негативного ответа со стороны здоровья при отсутствии воздействия.

Классификация уровней риска производится по оценочной шкале приведенных индексов $R_j(t)$, величина $R_j(t)$ составляет менее 0,05, что может оцениваться как риск пренебрежимо малый, слабо влияющий на состояние здоровья потребителя. В процессе характеристики рисков верхняя граница пренебрежимо малого риска рассматривается как уровень допустимого риска.

10) В том случае, если приведенный индекс риска не превышает величину верхней границы пренебрежимо малого риска на момент времени равный ожидаемой продолжительности жизни, то допустимая суточная доза соответствует уровню допустимого риска.

Для оценки вероятности негативного ответа со стороны здоровья при воздействии биологических факторов применяется эволюционное уравнение с учетом естественных процессов (старения) (формула 27):

$$\frac{dP_j(t)}{dt} = \alpha_j \cdot P_j(t) + \sum_k \gamma_{kj} \phi_{kj}(P_k^{Inf}, d_k), j = \overline{1, J}. \quad (27)$$

где γ_{kj} – эмпирический коэффициент, отражающий силу влияния *k*-го биологического фактора на вероятность возникновения *j*-ого негативного ответа со стороны здоровья, [1/год];

$\phi_{kj}(P_k^{Inf}, d_k)$ – функция, отражающая подмодель влияния микробиологического фактора со значением P_k^{Inf} на *j*-ый негативный ответ со стороны здоровья, полученная по результатам

эпидемиологических исследований или путем адаптации известных и опубликованных методов и моделей;

P_k^{Inf} – вероятность инфекционного заболевания, которая определяется дозой микробиологического фактора и состоянием барьерной функции (формула 28):

$$P_k^{Inf} = \frac{p(d_k > d_{k0})}{(1-D)}, \quad (28)$$

где d_k – значение экспозиции *k*-го микробиологического фактора;

d_{k0} – пороговое значение экспозиции *k*-го микробиологического фактора;

$p(d_k > d_{k0})$ – вероятность того, что значение экспозиции *k*-го микробиологического фактора выше минимального инфицирующего уровня;

D – параметр, характеризующий способность организма по выполнению барьерной функции, определяемой эволюционным уравнением с учетом естественных процессов (старения) и воздействия химических факторов: (формула 29)

$$\frac{dD(t)}{dt} = \alpha_D \cdot D(t) + \sum_i \beta_{Di} f(F_{Di}, t), \quad (29)$$

где $\alpha_D > 0$ – коэффициент, характеризующий скорость нарастания показателя, характеризующего нарушения барьерной функции за счет естественных процессов, [1/год];

β_{Di} – эмпирический коэффициент, отражающий силу влияния *i*-го химического фактора на скорость нарастания показателя, характеризующего нарушения барьерной функции, [1/год];

$f(F_{Di},t)$ – функция, отражающая подмодель влияния i-го химического фактора со значением F_{Di} на показатель, характеризующий нарушения барьерной функции.

Верификация гигиенических нормативов содержания биологических агентов в пищевой продукции по результатам прогнозирования эволюции риска здоровью состоит из следующих этапов:

1) Обобщение всей доступной информации по количественным ответам на воздействие k-го биологического фактора. По результатам выполнения этапа определяется вид функций $\phi_{kj}(P_k^{Inf},d_k)$, отражающих подмодель влияния микробиологического фактора со значением P_k^{Inf} на j-ый негативный ответ со стороны здоровья, а также $p(d_k > d_{k0})$ – вероятность того, что значение экспозиции k-го микробиологического фактора выше минимального инфицирующего уровня.

2) Идентификация параметров α_j, α_D, характеризующих скорость нарастания вероятности возникновения j-го негативного ответа и нарушений барьерной функции за счет естественных процессов.

3) Идентификация параметров воздействия γ_{kj} на основе адаптации результатов исследований, полученных на первом этапе, к применению в соотношениях эволюционной модели.

4) Определение сценария экспозиции, характерного для контингента населения, потребляющего рассматриваемый вид продукции, то есть установление значения k-го биологического фактора как функции от времени ($F_{Di}(t)$ и $d_k(t)$). Для верификации величин гигиенических нормативов значение экспозиции k-го биологического фактора задается на их уровне. В сценарии экспозиции необходимо

определить начальные условия на момент времени t_0 – момент времени (возраст), с которого выполняется прогнозирование риска для вероятностей возникновения негативных ответов $P_j(t_0)$ и для параметра, характеризующего способность организма по выполнению барьерной функции $D(t_0)$. Параметр, характеризующий способность организма по выполнению барьерной функции $D(t_0)$ должен учитывать степень ингибиции биологических агентов в среде желудка, устойчивость к желчи (желчным кислотам) (определяются в экспериментах *in vitro*), способность к адгезии патогенных микроорганизмов в кишечнике (определяется в экспериментах *in vivo*).

5) Идентификация коэффициентов функции тяжести $g(t)$ возникновения негативного эффекта (17). В таблице 17 приведены параметры функции тяжести некоторых заболеваний от возраста в предположении независимости от возраста $g_1 = g_2 = g_3 = 0$.

Таблица 17

Результаты экспертной оценки тяжести (серьезности) инфекционных и паразитарных заболеваний, вероятно связанных с биологическим загрязнением среды обитания человека

Название нозологической единицы	Тяжесть, g_0
Брюшной тиф	0,5
Холера	1
Острые кишечные инфекции, вызванные кампилобактериями	0,13
Острые кишечные инфекции, вызванные кишечными палочками эшерихиями	0,23
Другие сальмонеллезные инфекции	0,22
Листериоз	0,24
Амебиаз	0,14
Дизентерия, вызванная шигеллами Флекснера	0,23
Дизентерия, вызванная шигеллами Зонне	0,15
Острый гепатит А	0,22
Острые кишечные инфекции, вызванные вирусами	0,18
Острые кишечные инфекции, вызванные ротавирусами	0,17
Энтеровирусные инфекции	0,15
Шигеллез	0,16
Паратифы А, В, С и неуточненный	0,32

Аскаридоз	0,1
Энтеробиоз	0,08
Трихоцефалез	0,12
Тениоз	0,15
Дифиллоботриоз	0,13
Эхинококкоз	0,27
Описторхоз	0,13
Токсокароз	0,12
Лямблиоз	0,09

6) Прогнозирование риска с помощью численной схемы Рунге-Кутты для определения вероятности эффекта для негативного ответа $P_j(t)$ (аналогично формулам 21-25) параметра, характеризующего способность организма по выполнению барьерной функции $D(t)$ (27), вероятность инфекционного заболевания $P_k^{Inf}(t)$ (28). Рассчитать значения риска $R_j(t)$.

7) Расчет показателей приведенного индекса риска для интерпретации полученных результатов (26).

8) Для микробиологического фактора проверить соответствие приведенного индекса риска допустимому уровню. В том случае, если приведенный индекс риска для инфекционных заболеваний не превышает величину верхней границы пренебрежимо малого риска на момент времени равный ожидаемой продолжительности жизни, то гигиенический норматив соответствует уровню допустимого риска.

9. Определение объема потребления пищевой продукции для расчета МДУ.

9.1. Для задач установления гигиенических нормативов содержания химических примесей, биологических агентов в пищевой продукции по критериям риска используется информация о рекомендуемом и фактическом объеме потребления пищевой продукции.

9.2. Научно обоснованные уровни потребления пищевой продукции могут быть рекомендованы для отдельных групп потребителей. Рекомендуемые для отдельных групп объемы потребления пищевой продукции устанавливаются национальными органами государственного управления реализации политики в сфере охраны здоровья граждан.

9.3. Обязательным является определение фактического объема потребления пищевой продукции. Основным способом определения фактического объема потребления пищевой продукции является анкетно-опросный. Дополнительно для оценки питания людей, находящихся в условиях организованного коллектива, может быть применен анализ меню-раскладок и анализ накопительных ведомостей.

9.4. Для изучения фактического объема индивидуального потребления пищевой продукции применяются методы непосредственной (оперативной) регистрации потребляемой пищевой продукции и опросные методы ретроспективного воспроизведения питания.

Сущность анкетно-опросных методов изучения фактического объема индивидуального потребления пищевой продукции заключается в том, что объем потребления устанавливается на основе суждений конкретного человека (респондента), который характеризует свое питание (или питание своего ребенка) с использованием специальных опросных листов различной степени формализованности – содержащих закрытый перечень продуктов питания или допускающих самостоятельное определение продуктов респондентов.

Регистрация потребляемой пищевой продукции производится при помощи метода анализа частоты потребления пищевой продукции с помощью специальных опросников (Food frequency questionnaire

(FFQ)), метода 24-часового воспроизведения питания и метода многодневного дневника питания.

Рекомендуемым методом является метод анализа частоты потребления пищевой продукции с помощью опросника FFQ, реализуемый при помощи самостоятельного заполнения респондентом анкеты, содержащей перечень продуктов питания. Респондент отмечает в соответствующей каждому продукту строке, как часто в течение 30 дней до даты проведения опроса он употреблял данный продукт. Шкала частоты употребления является порядковой и содержит варианты ответа «несколько раз в день», «каждый день», «6 раз в неделю», «5 раз в неделю», «4 раза в неделю», «3 раза в неделю», «2 раза в неделю», «1 раз в неделю или реже», «никогда».

При необходимости проведения углубленного исследования используются:

- метод 24-часового воспроизведения питания заключается в установлении количества фактически потребленной пищевой продукции и блюд посредством личного интервью (face-to-face), когда респондент (опрашиваемый) воспроизводит по памяти то, что он съел за предшествующие дню опроса сутки. Интервьюер путем постановки вопросов просит респондента вспомнить съеденную накануне в течение предшествующих суток (24 часов) пищу. Интервьюер активно участвует в опросе и совместно с респондентом дает описание характера и устанавливает количество принятой в течение предшествующих суток пищи. Полученные характеристики и величины записываются интервьюером в специальную форму-вопросник. Важно, чтобы сбор данных собирался 2-3 раза в неделю, причем один день был выходным. Подробно алгоритм реализации метода изложен в методических рекомендациях «Способ оценки индивидуального

потребления пищи методом 24-часового (суточного) воспроизводства питания (Методические рекомендации)» (утв. Председателем профильной комиссии по диетологии Экспертного совета в сфере здравоохранения Минздрава РФ 01 ноября 2016 г.);

- метод многодневного дневника питания с невесовой оценкой заключается в установлении количества фактически потребленной пищевой продукции и блюд посредством ежедневного внесения респондентом в дневник питания всей пищи, съедаемой в течение суток. Метод предназначен для оценки фактического потребления пищевой продукции населением в возрасте 14 лет и старше. При необходимости оценки питания детей в возрасте до 14 лет дневники питания на них заполняются родителями или другими членами семьи, ухаживающими за ребенком. Многодневный дневник может вестись тремя способами: а) заполнение печатной формы на компьютере или вручную; б) ведение электронного дневника он-лайн; в) ведение фотодневника. Печатная форма для заполнения респондентом на компьютере или вручную выдается перед началом исследования в виде электронного файла в формате MS Word или в распечатанном виде. На каждый день недели формируется отдельный бланк.

При реализации опросных методов изучения фактического объема потребления пищевой продукции респонденту могут предлагаться визуальные средства помощи оценки объема потребления пищи:

а) альбомы с фотографиями или картинками пищевой продукции, а также порций блюд в натуральную величину;

б) предметы-аналогии для оценки объема (теннисный мячик, колода игральных карт, кубики и пр.).

Данные, полученные из дневников питания, могут обрабатываться с целью объединения в укрупненные группы пищевой продукции.

Поскольку структура потребления пищевой продукции имеет выраженную сезонность, рекомендуется проведение двукратного исследования (лето и зима) на одной и той же выборочной совокупности.

9.5. В результате определения фактического объема потребления пищевой продукции должны быть определены:

- среднее потребление пищевой продукции (группы пищевой продукции) в граммах в день на основе средне недельного, среднемесячного, либо среднегодового для сезонных продуктов) потребления;

- частота потребления пищевой продукции (группы пищевой продукции) в день, месяц, год, в зависимости от вида пищевой продукции (группы пищевой продукции).

10. Определение максимально допустимых уровней (МДУ) химических примесей и биологических агентов в пищевой продукции.

Максимально допустимые уровни содержания химических примесей в пищевой продукции устанавливаются на основании информации о допустимых суточных дозах, уровнях условно переносимого максимального суточного потребления (недельного, месячного), данных о потреблении населением пищевой продукции (структуры питания населения).

Расчет МДУ химических веществ в пищевом продукте производится таким образом, чтобы поступление данного вещества с рационом питания не превышала ДСД/УПП.

Расчет МДУ химических веществ производится по формуле 30:

$$МДУ = \frac{(ДСД)}{(СП \cdot \beta)} \quad (30)$$

где ДСД – допустимая суточная доза (условно переносимое поступление) химического вещества, мг/кг массы тела в сутки;

СП – суточное потребление пищевой продукции, для которой устанавливается МДУ, кг;

β – коэффициент, учитывающий временной период для которого установлена величина УПП (1 – для условно переносимого максимального суточного потребления, 1/7 – для условно переносимого максимального недельного потребления, 1/30 – для условно переносимого максимального месячного потребления).

Максимально допустимые уровни содержания биологических агентов в пищевой продукции в случае установленной минимальной инфицирующей дозы (МИД) производится по формуле 31:

$$МДУ = \frac{(МИД)}{(СП)} \quad (31)$$

В случае отсутствия установленной величины МИД, для биологических агентов может быть использована величина вероятной минимальной инфицирующей дозы.

При расчете МДУ должна приниматься во внимание доля потребления пищевой продукции, для которой устанавливается МДУ в общем потреблении пищевой продукции.

Определение допустимой дозы микроорганизмов ($D^{доп}$), поступившей с пищевыми продуктами производится по формуле 32:

$$D^{доп} = МИД_{pi} / СП, \quad (32)$$

где СП – суточное потребление продукта, г

Установление гигиенических нормативов содержания биологических агентов в пищевых продуктах по критериям риска

здоровью человека производится только для патогенных и условно-патогенных микроорганизмов и возбудителей паразитарных болезней. Установление показателей безопасности пищевых продуктов осуществляется для микробных агентов по альтернативному принципу, т.е. нормируется масса продукта, в которой они не допускаются.

Если полученное значение $D^{доп} < 0{,}04$ КОЕ/г, то в качестве норматива принимается отсутствие КОЕ в 25 г продукта.

Если полученное значение $D^{доп}$ находится в пределе 0,04–1 КОЕ/г, то в качестве норматива считается отсутствие КОЕ менее, чем в 25 г продукта.

Если полученное значение $D^{доп}$ более 1 КОЕ/г, то это количество биологического агента является допустимым в 1 г продукта.

gost.e-ecolog.ru