Мониторинг окружающей среды

Е. Д. Бондарева[1], Ю. А. Калинин[2], Д. В. Петров[3]

[1] *АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»,*
[2] *ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»,*
[3] *ООО «Фармбиолайн»*

Непрерывное повышение качества проведения услуг по оценке безопасности лекарственных средств в доклинических исследованиях обусловлено, с одной стороны, стремлением обеспечить защиту здоровья и благополучие населения, с другой — конкуренцией и растущими требованиями, в частности, к обеспечению надлежащих условий содержания ЛЖ. Вопросы мониторинга окружающей среды (МОС) на конференции GLP-PLANET косвенно были освещены во многих докладах. Мнение специалистов совпадали в части, касающейся мониторинга санитарного состояния помещений содержания животных, включающего контроль воздушной обсемененности, при этом контроль качества проводимых дезинфекционных мероприятий — неотъемлемая часть системы менеджмента качества. МОС гарантирует надлежащий уровень испытательного центра для реализации услуг по проведению доклинических исследований.

Для обеспечения этого уровня в МОС рациональнее всего включить объекты и процессы, способные повлиять на ход доклинического исследования. К сожалению, многие специалисты вынуждены дорабатывать критерии оценки качества различных процедур и мероприятий при проведении МОС в связи с несовершенством, в иных случаях — отсутствием нормативного регулирования (Мохов А. А. и соавт., 2016; Мурашев М. Н. и соавт., 2016).

Также необходимо помнить о том, что при работе с ЛЖ возникают риски для здоровья персонала. Помимо возникновения травм, укусов, царапин, нанесенных животными, возможно и возникновение антропозоонозных заболеваний и аллергий. Аллергены могут попасть в организм человека с шерстью, мочой, слюной животных, частицами подстила (Васютина М. Л. и соавт., 2019). МОС, включающий контроль соблюдения санитарных требований во время работы, минимизирует опасность возникновения рисков для здоровья персонала.

Нормативно-правовое регулирование

Требования отечественных и международных нормативных и рекомендательных документов к доклиническим центрам различаются между собой и активно обсуждают-

ся в публикациях. Однако насколько критичны эти расхождения? Рассмотрим на примере показателей температуры и влажности для мелких лабораторных грызунов.

СанПиН 3.3686–21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней»[9] требует соблюдения температуры в помещениях содержания мелких лабораторных грызунов в соответствии с гигиеническими нормативами, большей информации в данном документе не дается. Предположительно имеются в виду гигиенические нормативы к микроклимату производственных помещений, которые в настоящий момент не действуют, а показатели температуры в них сильно различаются между собой в разных по функциональности производственных помещениях и зависят от выполняемых работ человеком. Если обратиться к СП 2.2.1.3218–14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» (документ с 01.01.21 не действует, некоторые условия частично внесены в СанПиН 3.3686–21), то требования к температуре в помещениях содержания ЛЖ в нем составляют 20–26 °С, к влажности — 30–70 %.

Другой нормативный документ ГОСТ 33216–2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами» диктует следующие параметры: температура 20–24 °С, влажность 45–65 %. Представленные здесь диапазоны у́же, чем в СП 2.2.1.3218–14.

Рассмотрим еще один документ РД-АПК 3.10.07.02–09 «Методические рекомендации по содержанию лабораторных животных в вивариях научно-исследовательских институтов и учебных заведений». В данном случае рекомендуется содержать ЛЖ при температуре 18–22 °С и 50–65 % влажности.

Зарубежные коллеги в руководстве по содержанию ЛЖ (National Research Council Guide for the care and use of laboratory animals, 2010) также рекомендуют содержать их при схожих диапазонах температур (для крыс 20–26 °С, для кроликов 16–22 °С, для кошек, собак и приматов 18–29 °С). В руководстве также приводятся значения термонейтральных зон (ТНЗ) таких диапазонов температур окружающей среды, при которых терморегуляция животных происходит без необходимости увеличения метаболического производства тепла или активации механизмов испарения тепла. Например, ТНЗ для крыс составляет 28–32 °С, для мышей — 26–34 °С. Однако авторы рекомендуют содержать ЛЖ при температурах ниже их ТНЗ во избежание теплового стресса. Также необходимо учитывать, что места содержания животных необходимо обогащать элементами среды обитания (укрытия, материалы для гнездования). Влажность в руководстве рекомендуется контролировать не так жестко, как температуру. Считается, что для большинства видов млекопитающих оптимальная влажность составляет 30–70 %.

Все вышеперечисленные документы регулируют деятельность вивариев, однако они содержат разные требования к одному и тому же параметру. Аналогичные соображения были отражены в докладе Даниила Валерьевича Петрова, технолога-проектировщика компании Фармбиолайн[10].

В ряде публикаций приведены собственные и регламентируемые критерии оценки процессов при ведении МОС (Мохов А. А. и соавт., 2016; Бондарева Е. Д. и соавт., 2018;

[9] https://docs.cntd.ru/document/573660140?marker=6580IP
[10] https://conf-glp-planet.com/wp-content/uploads/2021/07/petrov-d.v..pdf

Таблица 3

Параметры микроклимата в помещениях содержания лабораторных животных

Помещение для содержания	Допустимая температура воздуха, °C	Относительная влажность воздуха, %	Отраслевой стандарт
Зайцеобразных	15–22	Более 45	• РД-АПК 3.10.07.02–09; • СанПиН 3.3686–21; • Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных (под ред. И.В. Белозерцевой), Москва, 2017; • ГОСТ 33216–2014; • ГОСТ 33217–2014; • Appendix A of the European convention for the protection of vertebrate animals used for expiremental and other scientific purposes. Strasbourg, 2006
Хорьков	15–24	Нет необходимости контролировать и регистрировать влажность воздуха	
Мелких лабораторных грызунов (мышей, крыс, хомяков, дегу)	18–26	45–65	
Песчанок	20–26	35–55	
Морских свинок	15–26	45–65	

Зайцева М.А. и соавт., 2020). Например, в **табл. 3** представлены параметры температуры и влажности, охватывающие все диапазоны показателей, требуемые в нормативных документах. Таким образом, создается «подушка безопасности» для испытательных центров, ведь в любом случае требования того или иного нормативного документа будут соблюдены.

То же касается и других параметров микроклимата помещений для содержания ЛЖ, таких как освещенность, шум (СНиП 23-05-95; СанПиН 1.2.3.685–21; СП 2.1.3.6.7.8–20; Красильщикова М.С., Белозерцева И.В., 2012; ГОСТ 33215–2014; ГОСТ 33216–2014; ГОСТ 33217–2014; ГОСТ 33218–2014; ГОСТ 33219–2014).

Большинство нормативно-правовых актов, действующих на территории Российской Федерации и регулирующих деятельность вивариев, не гармонизированы между собой и не могут отвечать международным требования в этой области. В связи с этим для соответствия международному сообществу и выполнения необходимых требований при ведении доклинических исследований испытательные центры вынуждены обращаться и ставить в приоритет именно зарубежные регулирующие документы. Подробно об этом обсуждается в статье А.П. Семаковой и соавт., 2021.

Объекты мониторинга окружающей среды

Как было сказано ранее, в МОС рациональнее всего включить все объекты, имеющие определенный риск воздействия на ход доклинического исследования, чтобы избежать искажения его результатов. МОС должен включать санитарно-противо-

эпидемические (плановые и внеплановые) мероприятия, направленные на предупреждение и/или ликвидацию процесса накопления, размножения и распространения возбудителей инфекционных и неинфекционных заболеваний, их переносчиков путем уничтожения в вентиляционных системах, кондиционерах и воздушных пространствах, на рабочих и бытовых поверхностях помещений лабораторий, вивария и питомника лабораторных животных.

Примерный список объектов для осуществления мониторинга окружающей среды состоит из следующих пунктов:

- микроклимат помещений содержания ЛЖ;
- контроль бактерицидной эффективности ультрафиолетовых облучателей;
- обсемененность воздушной среды помещений;
- обсемененность рабочих поверхностей, контроль качества проведения дезинфекции поверхностей, инвентаря и оборудования и др.

Микроклимат

Температура и влажность в помещениях содержания ЛЖ должны регистрироваться ежедневно с ведением соответствующих записей в листах регистрации температуры и влажности или журналах (Бондарева Е. Д. и соавт., 2018; Зайцева М. А. и соавт., 2020).

Освещенность и шум регулируются при вводе помещений в эксплуатацию, а затем периодически контролируются специалистами технического персонала (Бондарева Е. Д. и соавт., 2018; Зайцева М. А. и соавт., 2020).

О ключевой роли параметров микроклимата в испытательных центрах и вопросах автоматизации систем контроля микроклимата были рассмотрены в докладе Юрия Анатольевича Калинина [11], где среди прочего обсуждались преимущества автоматизированной системы: исключение ошибок при ручном заполнении документов, моментальное реагирование на отклонения от нормативов и т. д.

Бактерицидная эффективность

Оценка бактерицидной эффективности проводится согласно руководству Р 3.5.1904–04 «Использование ультрафиолетового бактерицидного излучения для обеззараживания воздуха в помещениях». Периодичность оценки составляет не реже 2 раз в год. В **табл. 4** представлены необходимые уровни бактерицидной эффективности ОБН в зависимости от категории помещения.

В соответствии с методикой руководства Р 3.5.1904–04 определяется достижение эффективности обеззараживания УФ-облучателей до 90, 95 и 99,9 % при облучении микроорганизмов ультрафиолетовым излучением (Васютина М. Л. и соавт., 2019; Мурашев А. Н. и соавт., 2016).

При оценке бактерицидной эффективности УФ-облучателей в качестве санитарно-показательного микроорганизма принимается *S. aureus*. Чашки Петри

[11] https://conf-glp-planet.com/wp-content/uploads/2021/07/kalinin_yurij.pdf

Таблица 4

Бактерицидная эффективность УФ-облучателей (ультрафиолетовый облучатель)

Название помещений вивария (по аналогии с лечебно-профилактическими учреждениями)	Класс чистоты	Бактерицидная эффективность (в %) не менее
Операционные	Чистые (Б)	99
Помещения содержания лабораторных животных	Условно-чистые (В)	95
Манипуляционные		
Секционная, помещения обеззараживания и временного хранения биологических отходов, дезинфекционно-моечные отделения, коридоры, шлюзы, лестничные марши и площадки, туалеты, гардеробы верхней и рабочей одежды, кладовые уборочного инвентаря, подсобные помещения, склады, кормокухни, лабораторные помещения	Грязные (Г)	90

с питательной средой засевают золотистым стафилококком, выдерживают экспозицию под исследуемой лампой УФ-облучателей. Результативность облучения микроорганизмов, или бактерицидная эффективность УФ-облучателей, оценивается в процентах как отношение числа погибших микроорганизмов к их начальному числу до облучения (Бондарева Е. Д. и соавт., 2018; Васютина М. Л. и соавт., 2019).

Обсемененность воздушной среды помещений

Нормативы для оценки бактериальной обсемененности воздуха помещений содержания ЛЖ в настоящее время не разработаны.

Помещения содержания ЛЖ могут быть отнесены к помещениям классов чистоты Б, В и Г в соответствии с СП 2.1.3678–20 **(табл. 5)**. На основании допустимых уровней бактериальной обсемененности воздуха помещений лечебно-профилактических учреждений, представленных в СП 2.1.3678–20, обсемененность помещений классов В и Г, в том числе золотистым стафилококком (как было ранее), не нормируется, класса Б составляет не более 500 КОЕ до работы и 750 КОЕ во время работы. В связи с чем любые полученные результаты микробиологического анализа воздушной среды помещений классов В и Г следует считать приемлемыми.

Несмотря на отсутствие государственного регулирования, следует стремиться к поддержанию надлежащего санитарного состояния всех помещений испытательного центра, а при выполнении контроля качества проведения санитарных мероприятий ориентироваться на значения, применимые к вышестоящему классу чистоты помещений — классу Б.

Таблица 5

Классификация помещений содержания лабораторных животных по классу чистоты, нормирование бактериальной обсемененности

Название помещения содержания лабораторных животных	Название помещения в ЛПУ (СП 2.1.3678–20)	Класс чистоты	Общее количество микроорганизмов в 1 м³ воздуха (в КОЕ/м³) не более
Операционные	Малые операционные	Чистые (Б)	500 КОЕ до работы, 750 КОЕ во время работы
Помещения содержания лабораторных животных	Смотровые, ординаторские, материальные	Условно-чистые (В)	Не нормируется
Манипуляционные	Процедурные		
Секционная, помещения обеззараживания и временного хранения биологических отходов, дезинфекционно-моечные отделения, коридоры, шлюзы, лестничные марши и площадки, туалеты, гардеробы верхней и рабочей одежды, кладовые уборочного инвентаря, подсобные помещения, склады, кормокухни, лабораторные помещения	Секционные, санузлы; кладовые, технические помещения (компрессорные, насосные и т. п.), архивы; санитарные комнаты, помещения для сортировки и временного хранения грязного белья, мойки, носилок и клеенок, сушки одежды; помещения (комнаты) для санитарной обработки больных, душевые, раздевальные в отделениях водо- и грязелечения; клинико-диагностические лаборатории (помещения для исследований), контрольно-аналитическая, моечная, распаковочная; кладовые кислот, реактивов и дезинфицирующих средств	Грязные (Г)	Не нормируется

Исследования бактериальной обсемененности воздушной среды проводят с учетом санитарно-микробиологических показателей:

- общее количество микроорганизмов в 1 м^3 воздуха (в КОЕ/м^3);
- количество плесневых и дрожжевых грибов в 1 м^3 воздуха (в КОЕ/м^3).

Контроль дезинфекции воздуха осуществляется методом протягивания определенного объема воздуха через поглотительный прибор (аспирационный метод). Количество пропущенного воздуха через прибор должно составлять 100 дм^3 для определения общего количества микроорганизмов, дрожжевых и плесневых грибов. Метод заключается в установке чашек Петри в прибор для отбора проб (аспиратор). Расположение точек отбора проб воздуха является рандомным исходя из параметров помещения.

Ключевые точки для отбора проб:

- зоны наиболее высокой вероятности контаминации;
- зоны наибольшего риска скопления микроорганизмов при нормальном рабочем процессе (накопление пыли на поверхностях с электростатическими свойствами, более холодных поверхностях, на дверных ручках, в помещении хранения кормов и сена/подстила, грязных клетках, зонах работы с биологическим материалом/лекарственными средствами);
- труднодоступные зоны для уборки и дезинфекции;
- точки смежных зон;
- зоны возмущения воздушного потока рельефом поверхности, смешение потоков.

Обсемененность рабочих поверхностей

Для оценки качества дезинфекции помещений, оборудования и рабочих поверхностей следует руководствоваться Правилами № 13-5-2.0525 от 15.07.02, согласно которым при проведении контроля качества дезинфекции определяют наличие на поверхностях обеззараживаемых объектов жизнеспособных клеток санитарно-показательных микроорганизмов — бактерий группы кишечной палочки (*Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*), стафилококков (*aureus*, *epidermatis*, *saprophiticus*), микобактерий или спорообразующих аэробов рода *Bacillus*. Качество дезинфекции признают удовлетворительным при отсутствии выделения названных культур во всех исследованных пробах.

Оценка бактериальной обсемененности поверхностей и контроль качества дезинфекции рабочих поверхностей, инвентаря и оборудования осуществляют преимущественно методом смывов.

Первым этапом контроля качества дезинфекции является контроль подготовки объектов к дезинфекции (проверяют степень очистки поверхностей, их увлажненность, защиту электрооборудования и приборов, герметизацию помещений), осуществляемый сотрудником структурного подразделения организации, ответственным за ее проведение.

Контроль качества дезинфекции должен осуществляться без предварительного уведомления сотрудников, ответственных за проведение дезинфекции, о времени и месте отбора проб для исследования.

Отбор проб проводят по окончании дезинфекции и до начала проветривания помещений методом смывов (предпочтительно).

Смывы с поверхностей берут с помощью стерильных увлажненных ватных тампонов. Непосредственно перед взятием смыва тампон увлажняют, наклоняя пробирку или опуская тампон в жидкость/транспортную среду. В процессе отбора смывов рекомендуется неоднократное смачивание тампонов. Исследуемые участки тщательно протирают до полног °Снятия с поверхности всех имеющихся на ней загрязнений, после чего тампоны помещают в пробирку с нейтрализующей жидкостью или транспортной средой.

Пробы-смывы или соскобы для исследования берут с нескольких различных участков обрабатываемых поверхностей (полов, проходов, стен, перегородок, столбов, кормушек, поилок и т. д.). Смывы (в пробирках) должны быть доставлены в аккредитованную лабораторию в течение 3–6 ч с момента взятия (Бондарева Е. Д. и соавт., 2018).

Для проведения контроля микробной загрязненности поверхностей можно использовать экспресс-тесты, например контактные пластины или петрифильмы (МУК 4.2.2884–11 «Методы микробиологического контроля объектов окружающей среды и пищевых продуктов с использованием петрифильмов»), или метод АТФ-биолюминесценции с использованием специального оборудования. Экспресс-тесты удобно использовать с целью получения быстрого результата. Для организаций, не являющихся аккредитованными испытательными лабораториями, следует учитывать, что данное исследование не имеет никакой юридической силы, а, следовательно, может быть включено в МОС лишь как дополнительный метод микробиологического контроля наряду с плановыми исследованиями.

Риск-ориентированный подход к проведению мониторинга окружающей среды

Оценка рисков считается современным методом достижения желаемых результатов во многих областях. Популярность применения риск-ориентированного подхода очень быстро растет как в России, так и за рубежом (Бурова Е. Д. и соавт., 2017; Бондарева Е. Д. и соавт., 2020). Эта тема была поднята в докладе Марии Анатольевны Зайцевой [12] и поддержана в сообщении Евгении Дмитриевны Бондаревой [13].

Guglielmo Vismara в своем докладе [14] рассмотрел вопросы возникновения рисков в лабораториях разных уровней биологической безопасности, а также перечислил несколько руководств, регулирующих работу испытательных центров. В статьях Е. А. Тюрина, В. Г. Германчука внимание уделено аналогичным вопросам, касающимся необходимости строгого соблюдения требований биологической безопасности при работе с патогенными микроорганизмами и с учетом определенных рисков (Греманчук В. Г. и соавт., 2018; Тюрин Е. А. и соавт., 2018).

[12] https://conf-glp-planet.com/wp-content/uploads/2021/07/zajczeva-m.a..pdf
[13] https://conf-glp-planet.com/wp-content/uploads/2021/07/bondareva-e.d..pdf
[14] https://conf-glp-planet.com/wp-content/uploads/2021/07/vismara-g..pdf

Система управления рисками служит с целью повышения качества, результативности процессов, сокращения потребляемых для их реализации ресурсов. Также оценку риска проводят для понимания и визуализации вероятности наступления неблагоприятных последствий. Риск поддается прогнозированию, что делает возможным его снижение путем проведения предупреждающих мероприятий.

Методов оценки рисков довольно много, выбор их зависит от значительного количества факторов и определяется испытательным центром самостоятельно исходя из собственных преследуемых целей и задач.

По результатам оценки рисков можно определить вероятность наступления неблагоприятных последствий для животных и экспериментальных исследований. Например, при снижении и повышении температуры воздуха в помещениях содержания ЛЖ ниже и выше нормальных диапазонов (Каргопольцева Д. Р. и соавт., 2019a, 2019b) или при отклонениях показателей влажности воздуха помещений [15], в результате оценки последствий выхода за нормальные значения которой был сделан вывод, что повышенная и пониженная влажность не является критичной для содержания большинства видов ЛЖ.

Стоит отметить, что при недостатке нормативного регулирования объектов МОС оценка рисков позволяет более взвешенно подойти к каждой критичной точке и своевременно минимизировать потенциальные негативные последствия. Например, обсемененность помещений содержания ЛЖ, которая не подлежит нормам государственного регулирования, можно контролировать путем создания внутренних нормативов лаборатории. Оценка риска в данном случае позволит выявить наиболее показательные микроорганизмы, и даже определить их максимально-допустимое количество (в КОЕ).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бондарева Е. Д., Макарова М. Н., Ковалева М. А., Ходько С. В., Макаров В. Г. Нормативно-правовое регулирование деятельности питомников и экспериментально-биологических клиник (вивариев) // Лабораторные животные для научных исследований. — 2018. — №. 4. — С. 100–115. https://doi.org/10.29296/2618723X-2018-04-08.
2. Бондарева Е. Д., Боровкова К. Е., Макарова М. Н. Риск-ориентированный подход к оценке санитарного благополучия вивария и питомника, здоровья лабораторных животных и человека // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. — 2020. –10 (4). — С. 260–269.
3. Бурова Е. Д., Ходько С. В., Гущина С. В., Макарова М. Н., Макаров В. Г. Управление рисками для обеспечения качества доклинических исследований лекарственных средств // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. — 2017. — 7 (1). — С. 25–32.
4. Васютина М. Л., Бреднева О. Г., Иванов С. А., Салминьш Д. А., Галагудза М. М. Аллергия на лабораторных грызунов: недооцененная проблема // Лабораторные

[15] https://conf-glp-planet.com/wp-content/uploads/2021/07/bondareva-e.d..pdf

животные для научных исследований. — 2019. — 4. https://doi.org/10.29296/2618723X-2019-04-01.
5. Германчук В. Г., Семакова А. П., Шавина Н. Ю. Этические принципы при обращении с лабораторными животными в эксперименте с патогенными биологическими агентами I–II группы // Проблемы особо опасных инфекций. — 2018. — №. 4.
6. ГОСТ 33215–2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур».
7. ГОСТ 33216–2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами».
8. ГОСТ 33217–2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными хищными млекопитающими».
9. ГОСТ 33218–2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за нечеловекообразными приматами».
10. ГОСТ 33219–2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за рыбами, амфибиями и рептилиями».
11. Зайцева М. А. Потапенко, Е. Г., Кашина, Т. В., Верведа, А. Б. Основные подходы к обеспечению качества биологических тест-систем в исследованиях GLP-статуса // Лабораторные животные для научных исследований. — 2020. — № 2. — С. 1–7. https://doi.org/10.29296/2618723X-2020-02-03.
12. Каргопольцева Д. Р., Крышень К. Л., Макарова М. Н., Кательникова А. Е., Зуева А. А., Матичин А. А., Гайдай Д. С. Оценка потенциальных рисков, возникающих при повышении температуры содержания лабораторных животных (мыши, крысы, морские свинки) за пределы рекомендованных диапазонов: влияние на основные биологические показатели // Лабораторные животные для научных исследований. — 2019a. — № 3. — С. 1–11. https://doi.org/10.29296/2618723X-2019-03-09.
13. Каргопольцева Д. Р., Макарова М. Н., Зуева А. А., Кильдибеков К. Ю. Оценка потенциальных рисков, возникающих при снижении температуры содержания лабораторных животных за пределы рекомендованных диапазонов по влиянию на основные биологические показатели //Лабораторные животные для научных исследований. — 2019b. — № 4. — С. 1–6. https://doi.org/10.29296/2618723X-2019-04-02.
14. Красильщикова М. С., Белозерцева И. В. Директива 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях // Rus-LASA: Объединение специалистов по работе с животными, СПб. — 2012.
15. Мохов А. А., Мурашев А. Н., Красильщикова М. С., Хохлова О. Н., Семушина С. Г., Рассказова Е. А., Ржевский Д. И., Яворский А. Н. О необходимости совершенствования законодательства в сфере использования лабораторных животных // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. — 2016. — №.4. — С. 62–68.