

*В.В. Шевляков, В.А. Филонюк, Г.И. Эрм, Е.В. Чернышова,
С.А. Ушков, А.В. Буйницкая, Т.С. Студеничник*

**О МЕТОДОЛОГИИ ГИГИЕНИЧЕСКОГО
РЕГЛАМЕНТИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ-
ПРОДУЦЕНТОВ И МИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ
В ВОЗДУХЕ РАБОЧЕЙ ЗОНЫ**

ГУ «Республиканский научно-практический центр гигиены»

С учетом данных литературы, результатов собственных исследований 88 штаммов микроорганизмов-продуцентов различной таксономической принадлежности и 29 микробных препаратов на их основе обоснованы изменение методических подходов гигиенического нормирования микроорганизмов-продуцентов (микробных препаратов) в воздухе рабочей зоны, применяемых для оценки степени токсичности (патогенности), воспроизведения и выявления сенсibilизации, а также обоснованы количественные классификационные критерии определения классов опасности микроорганизмов-продуцентов и микробных препаратов по степени токсичности, сенсibilизирующей активности и аллергенной опасности, апробация которых показала их объективность и информативность.

Ключевые слова: *микроорганизмы-продуценты, микробные препараты, гигиеническая регламентация, классификационная оценка, предельно допустимая концентрация, воздух рабочей зоны, токсичность, сенсibilизирующая активность, аллергенная опасность.*

*V.V. Shevlaykov, V.A. Filanyuk, G.I. Erm, E.V. Tchernischova,
S.A. Ushkov, A. V. Buynickaya, T.S. Studenichnik*

**ON THE METHODOLOGY OF HYGIENIC REGULATION
OF MICROORGANISMS-PRODUCENTS AND MICROBIAL
COMPOSITIONS IN THE WORKPLACE AIR**

Considering the literature data, the results of our own study of 88 strains of microorganisms-producers of different taxonomic identity and 29 microbial compositions on their basis the change of methodological approaches of hygienic standardization of microorganisms-producers (microbial compositions) in the workplace air used for estimation of the degree of toxicity (pathogenicity), reproduction and sensitization detection, has been justified as well as quantitative classificatory criteria for determining classes of danger of microorganisms-producers and microbial compositions on the toxicity degree, sensitizing activity and allergenic risk the testing of which showed their objectiveness and informativity.

Key words: *microorganisms-producers, microbial compositions, hygienic regulation, classificatory criteria, maximum permissible concentration, workplace air, toxicity, sensitizing activity, allergenic risk*

Направления промышленной и медицинской биотехнологии основаны на использовании различных видов и родов штаммов и серотипов селективных или мутантных (полученных методом генной инженерии) микроорганизмов (далее – м.о.) в качестве пробиотических пищевых препаратов, продуцентов белка (биомасса, кормо-

вые добавки), биологически активных веществ (амино-, протео-, пекто-, целлюлолитические и другие ферменты, разнообразные антибиотики, аминокислоты, витамины и другие), микробиологических препаратов (далее – МП) для защиты (энтомопатогенные) и повышения урожайности (азотфиксирующие) сельскохозяйственных куль-

тур, препаратов выщелачивания и концентрирования металлов, защиты окружающей среды от загрязнений, деградации токсических отходов, увеличения добычи нефти и т.д.

Ранее считалось, что в отличие от химических веществ биологические препараты не обладают существенным разрушающим действием на живые организмы, не нарушают связей биоценоза, не влияют на важнейшие экологические факторы [8]. Однако, кроме положительных сторон микробиологических производств, необходимо отметить следующие негативные моменты: в ряде производств до сих пор используются патогенные и условно-патогенные для теплокровных животных и человека м.о., предприятия микробиологического синтеза характеризуются наличием неблагоприятных факторов производственной среды, вредных выбросов в атмосферный воздух, образованием сточных вод, а также твердых отходов; продукты микробиологического синтеза могут оказывать неспецифическое и специфическое действие, прежде всего, вызывая сдвиги иммунологического гомеостаза и изменяя ассоциацию аутофлоры человека и животных.

Следовательно, вместе с видимым положительным эффектом применения продуктов современной биотехнологии, при производстве и использовании м.о. и биопрепаратов на их основе возможно загрязнение ими производственной среды, выделение в воздух рабочей зоны и атмосферы с вредным воздействием на здоровье работников. Многочисленные данные литературы свидетельствуют о том, что биотехнологические штаммы м.о. представляют серьезную опасность как для человека, так и для объектов окружающей среды [3, 5, 21-23, 25, 32, 35 и др.]. Поэтому одним из актуальных направлений современных гигиенических исследований является оценка биологической опасности биотехнологических производств и вероятности возникновения неблагоприятных для здоровья человека последствий.

Основными направлениями обеспечения безопасности производственной среды для человека являются гигиеническая регламентация вредных факторов, гигиенический мониторинг состояния условий труда и здоровья работников с соответствующей научно обоснованной разработкой и реализацией системы управления качеством среды и предотвращения негативного влияния на работников вредных факторов производственной среды на основе эффективного внедрения превентивных мероприятий.

Вместе с тем, существующие в большинстве стран постсоветского пространства методиче-

ские подходы и критерии изучения и гигиенического регламентирования м.о.-производителей и МП, не обеспечивают современные требования и безопасное внедрение в практику многочисленных новых биопрепаратов различного назначения.

В соответствии с изложенным, комплексное токсиколого-гигиеническое исследование биологических свойств и регламентация м.о. и МП, разработка предельно допустимых концентраций и методов контроля их содержания в воздухе рабочей зоны и атмосферы с разработкой методологии гигиенической регламентации м.о. и МП, обеспечивающих, с одной стороны, возможность практического производства и использования новых биопрепаратов, а с другой, – действенность госнадзора за объектами биотехнологического производства, безопасные условия труда и профилактику профессиональной и производственно-обусловленной заболеваемости работников, является новым (не имеющим полного современного аналога), актуальным и необходимым.

Цель настоящего исследования – изучить в модельных экспериментах вредные свойства м.о.-производителей разных видов, родов и биопрепаратов на их основе и обосновать лимитирующие показатели их отнесения к промышленным штаммам, критерии определения степени токсичности (класс опасности) и сенсibiliзирующей активности. *Объект* настоящего исследования – штаммы м.о. разной таксономической принадлежности и МП на их основе, *предмет* – их патогенные (вирулентные), токсические, токсигенные и сенсibiliзирующие свойства в острых опытах на белых крысах и белых мышах при различных путях поступления в организм.

Основными направлениями обеспечения безопасности производственной среды для человека являются гигиеническая регламентация вредных факторов, гигиенический мониторинг состояния условий труда и здоровья работников с соответствующей научно обоснованной разработкой и реализацией системы управления качеством среды и предотвращения негативного влияния на работников вредных факторов производственной среды на основе эффективного внедрения превентивных мероприятий.

Загрязнения производственной и окружающей среды м.о. и МП на их основе, негативное влияние их на здоровье работников и населения в целом определяют настоятельную необходимость их гигиенической регламентации в среде обитания человека. На сегодняшний день наблюдается значительное отставание в разработке

гигиенических и экологических проблем биологического загрязнения по сравнению с гигиеническими и токсикологическими исследованиями химических веществ. Особенно это относится к вопросам гигиенического регламентирования в объектах производственной и окружающей среды штаммов м.о., используемых в биотехнологических процессах, препаратов, содержащих нежизнеспособные клетки и их структурные элементы, продуктов микробного синтеза [10, 12-14, 20, 32 и др.].

Если для химических веществ определены критерии выбора оптимального объема исследования в направлении гигиенического регламентирования и подходы к их безопасному обращению, то для биологических веществ, в частности, для промышленных м.о. и МП существующая система оценки опасности недостаточно отвечает требованиям современной науки и практики.

В настоящее время не только уровень и объем исследований по гигиеническому регламентированию биологических поллютантов отстает от таковых для химических веществ, но и более того – имеются данные о том, что гигиенические нормативы для ряда промышленных м.о. (представителей рода *Candida*, в частности) не обеспечивают безопасные для организма человека уровни воздействия [35].

Исследования по токсиколого-гигиеническому изучению и нормированию в воздухе м.о. начаты в СССР в 60-70 гг. прошлого столетия и преимущественно основывались на оценке их патогенного действия для определения отнесения к промышленным штаммам и выявлении сенсibiliзирующей способности. На этой основе отработывались и совершенствовались схемы и методические подходы к гигиеническому нормированию промышленных м.о. в воздухе рабочей зоны [15, 26] и были установлены нормативы некоторых наиболее перспективных на то время м.о. [12, 14, 30, 31 и др.]. Тем не менее, для гигиенической оценки эти препараты изучались лишь с точки зрения их общетоксического и аллергенного действия.

Актуальным представлялось исследование изменений иммунной системы организма, отражающих течение патологического процесса как при токсическом, так и аллергеном проявлении действия биопрепаратов. И.А.Иванова [11] впервые обосновала использование иммунологического критерия в гигиеническом нормировании МП на примере бактерий *Bac. thuringiensis var. dendrolimus* (дендробациллин) и *var. galieriae* (энтобактерин) и на основе грибов *Beauveria bassiana* (боверин) и *Entomophthora thaxteriana*

(такстериана).

По данным различных авторов, сложность методических подходов к токсиколого-гигиенической оценке биологических факторов и их последующего гигиенического регламентирования обуславливается тем, что они включают два специфических компонента: м.о. и готовые МП на основе их синтеза или структурные элементы нежизнеспособных клеток. Известно, что снижение иммунного статуса организма у населения отмечается в три раза чаще под воздействием продуцентов, по сравнению с готовым продуктом [4].

Основываясь на данных исследований многих авторов по гигиеническому нормированию биотехнологических штаммов, были сформулированы методические основы оценки неблагоприятного действия штаммов-продуцентов, предложена принципиальная схема проведения токсиколого-гигиенических исследований новых биотехнологических штаммов, включающая три основных этапа по токсиколого-гигиенической оценке.

В отличие от химических веществ, м.о. являются живыми объектами, способными сохранять жизнеспособность и размножаться при наличии определенных условий в окружающей среде или в м.о. Продукты биотехнологии, которые содержат в своем составе производственные штаммы м.о., как правило, не токсичны для теплокровных организмов, но могут вызывать дисбиотическое, сенсibiliзирующее, иммуномодулирующее или аллержизирующее действие.

Штаммы, зарегистрированные как возбудители инфекционных заболеваний у людей и полезных животных, к применению как производственные не разрешаются. Поэтому изучение действия на организм теплокровных животных новых производственных штаммов м.о. является *первым этапом исследований* при проведении гигиенического регламентирования МП в объектах производственной и окружающей сред, направленное на выяснение патогенности м.о., под которой понимается потенциальная способность последнего вызывать специфическое (инфекционное) заболевание у макроорганизма определенного вида [18, 33].

Многолетний опыт изучения производственных штаммов м.о. и влияния их на состояние здоровья лиц, постоянно контактирующих с ними при производстве биотехнологических продуктов, свидетельствует о возможной способности этих объектов вызывать не только аллерженное, но и дисбиотическое действие. Следовательно, принципиальная схема исследований опасности производственных микроорганизмов включает в

дальнейшем изучение дисбиотического действия.

На втором этапе токсиколого-гигиенических исследований проводят изучение готовой формы МП, который содержит живые вегетативные клетки м.о. или споры). При токсиколого-гигиенической оценке МП, прежде всего, следует учитывать численность м.о. и состояние, в котором они находятся в препарате (высушенные или нативные клетки) и от которого зависит их патогенность. На патогенность могут влиять также и другие компоненты, которые входят в МП: продукты жизнедеятельности, остатки питательной среды, различные минеральные и органические наполнители, стабилизаторы, эмульгаторы и т.д. Каждое из этих веществ может воздействовать на организм как самостоятельно, так и в комплексе с м.о., усиливая действие последнего. Поэтому в дополнение к исследованиям, которые проводятся для определения безопасности производственного штамма м.о. – основного действующего фактора МП, определяют также общетоксическое действие препарата в острых и субхронических экспериментах, выявляют сенсibiliзирующее и дисбиотическое действие, раздражающее действие на кожу. Необходимы специальные тесты, для определения патогенного/токсического действия микроорганизмов на организм теплокровных животных.

На третьем этапе проводят клинико-гигиенические исследования с целью корректировки экспериментально установленных ПДК.

Длительный производственный контакт с патогенными м.о. приводит к алергизации работающего контингента, поэтому использование промышленных м.о. требует обоснования безопасных уровней воздействия и оценки риска их воздействия на организм в условиях биотехнологического производства.

По данным Н.И. Шеиной [41], по таксономической структуре к 3-му классу опасности (умеренно опасные м.о.) относятся грамотрицательные бактерии (*Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azotobacter* и др.), актиномицеты (*Actinomyces*, *Streptomyces*), микромицеты (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Tolyposcladium*) и дрожжеподобные грибы рода *Candida*. На их долю приходится 70% всех используемых в промышленности м.о., что свидетельствует об актуальности и необходимости проведения исследований по оценке их опасности, регламентированию и оценке их риска для здоровья работающих.

Среди штаммов, относящихся к 3 классу опасности, можно выделить м.о. родов *Candida*, *Aspergillus* и *Pseudomonas* (11%), которые обладают выраженным неблагоприятным действием на

организм и имеют ПДК_{в.р.з.} на уровне 10^2 м.кл./м³. Принимая во внимание клинико-гигиенические данные о неблагоприятном действии этих штаммов, биотехнологические производства отказываются от использования м.о. с высоким алергическим потенциалом и перепрофилируются в сторону менее алергеноопасных штаммов.

Меньшая часть штаммов (30%) относится к 4 классу опасности (малоопасные). Основу этой группы составляют *B.subtilis*, *B.licheniformis*, а также представители родов *Rhodococcus*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*. При этом неблагоприятное действие м.о. этих родов на экспериментальных животных проявляется на значительно более высоких, чем 10^5 м.кл./м³ уровнях воздействия.

В сложившейся ситуации несомненно актуальным являлось расширение объема исследований по идентификации биомаркеров основных эффектов промышленных м.о., направленных на повышение надежности разрабатываемых гигиенических нормативов – одного из наиболее важных элементов комплекса мероприятий по обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия населения [1, 2, 9, 27].

С учетом этого О.Г.Алексеевой и соавт. были проанализированы результаты многочисленных исследований по проблеме и разработаны методические указания по экспериментальному обоснованию ПДК м.о.-продуцентов и содержащих их готовых форм препаратов в объектах производственной и окружающей среды [42]. На основании этих методических подходов в воздушной среде были нормированы десятки м.о. и МП [3, 5-7, 16, 24, 28, 29, 34 и др.].

Согласно положениям Единых санитарно-эпидемиологических и гигиенических требований к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю), утвержденных решением Комиссии Таможенного союза от 28.05.2010 № 299 (Глава II; Раздел 15 Требования к пестицидам и агрохимикатам), и других действующих технических нормативных правовых актов, м.о. и МП должны подвергаться токсиколого-гигиеническим исследованиям в полном объеме первичной токсикологической оценки, позволяющим разработать раздел требований безопасности «Технических условий на препарат» и провести процедуру государственной регистрации, а в последующем и гигиенической регламентации в окружающей среде, обеспечивающей безопасность биопрепаратов при производстве и применении для здоровья работников и населения.

Однако существующие в странах СНГ методические подходы и критерии изучения и гигиениче-

ского регламентирования м.о. и МП, частично изложенные в устаревших методических указаниях № 5789/1-91 Минздрава СССР [42], не обеспечивают безопасное внедрение в практику многочисленных новых биопрепаратов различного назначения.

Несмотря на постоянно расширяющуюся номенклатуру штаммов м.о., активно используемых в биотехнологии, в настоящее время не существует общепринятой гигиенической классификации промышленных м.о. по степени токсичности и опасности, как и методики их оценки, аналогичные для химических веществ по ГОСТ 12.1.007–76. Так, определение патогенности м.о. и МП по величине LD_{50} предусматривается в опытах при последовательном внутрижелудочном и внутрибрюшинном введениях 5 снижающихся десятикратно доз препарата с оценкой величины LD_{50} по количеству микробных клеток (далее – м.кл.) на животное, без учета разной массы опытных животных, что определяет показатель не как интегральный, а среднеарифметический при возможной существенной ошибке расчета среднесмертельной дозы [18, 19, 33, 41, 42 и др.].

В методических подходах или отсутствует объективная классификация промышленных штаммов м.о. по степени патогенности (вредности) / степени токсичности в острых экспериментах и соответствующие количественные критерии, или показателем классифицирования по патогенности (острой токсичности) является только пороговая доза при внутрижелудочном введении, причем с выражением LD_{50} в м.кл./животное и одинаковая для микроорганизмов 3 и 4 классов на уровне более 10^7 [41], что не позволяет дифференцировать м.о. по степени патогенности на 3 и 4 классы.

В оценке аллергенной способности м.о. и МП предусматривались различные не унифицированные по способу введения и концентрациям модели воспроизведения сенсибилизации: при ингаляционном поступлении в организм белых мышей и белых крыс, внутрикожном введении белым мышам с адьювантом Фрейнда по А.Д. Черноусову [40], который пригоден только для изучения гаптенов, и т.д. Причем для определения сенсибилизации используют методы, позволяющие выявлять только отдельные механизмы аллергической реакции – тест опухания лапы или уха животного на выявление гиперчувствительности замедленного типа (далее – ГЗТ) или косвенные методы оценки анафилактического типа аллергического процесса по реакции дегрануляции тучных клеток (далее – РДТК) с использованием в них жизнеспособных м.о., что не учитывает гете-

роантигенную особенность м.о. и формирование при их воздействии на макроорганизм смешанных механизмов гипериммунного ответа.

В целом, отсутствует объективная классификационная оценка сенсибилизирующей способности м.о. и МП, аналогичная для химических и биологических промышленных аллергенов [17]. Предложенная шкала разделения по аллергенной активности штаммы промышленных м.о. на три группы [41] основана только на критериях показателей косвенной оценки гиперчувствительности немедленного типа (далее – ГНТ), как-то: величина РДТК, уровень достоверности различий в опыте и контроле по критерию Стьюдента t , частоте положительных результатов по РДТК, что не адекватно и не объективно характеризует сенсибилизирующую способность м.о.

В определении вредного дозозависимого субхронического ингаляционного действия м.о. и МП на их основе для их гигиенического нормирования в существующих методических документах приводятся не полные или устаревшие методики. Воздействие м.о. на макроорганизм, особенно при ингаляционном пути поступления, может сопровождаться формированием гипериммунных реакций с механизмами аллергических реакций как по немедленному IgE-опосредованному и цитотоксическому типам, так и/или по отсроченному (иммунокомплексному) и замедленному (клеточноопосредованному) типам, что определяется разными свойствами поверхностных и внутриклеточных антигенов м.о., дозой воздействия, исходным состоянием иммунной системы макроорганизма [43-47]. Вместе с этим, для оценки аллергизирующего эффекта в основном используются методы только для выявления ГЗТ (тесты опухания уха или лапы) и/или ГНТ (по РДТК), без определения других показателей, характеризующих разные механизмы аллергического процесса [27, 32, 41, 42].

В оценке иммунотоксического действия на организм лабораторных животных предлагается использовать методы количественного определения в крови Т- и В-лимфоцитов, но без оценки их функциональной способности, а для оценки антигенности м.о. – реакцию прямой агглютинации, позволяющую определить титр иммунных антител, и/или фагоцитарную реакцию нейтрофилов крови на изучаемый м.о., но данные методики весьма трудоемкие и во многом субъективные (визуальный учет результатов). Фактически не определяется влияние м.о. на формирование в организме иммуномодулирующих эффектов, в том числе, на чувствительные показатели иммунологической резистентности организма.

Эндо- и экзотоксины м.о. могут активно вмешиваться в обменные процессы и нарушать их в макроорганизме. Однако в методических документах по гигиенической регламентации м.о. и МП на их основе в воздушной среде изучение показателей, характеризующих общетоксическое действие на биохимические процессы в организме лабораторных животных, в том, числе, на процессы перекисного окисления липидов и белков и антиоксидантной защиты, в основном не рассмотрены.

Соблюдение разработанных гигиенических нормативов м.о. и МП на их основе требует разработки соответствующих методик их количественного определения в воздухе рабочей зоны и атмосферы. Однако до сих пор в мировой практике отсутствуют единые унифицированные подходы по аттестации методик выполнения измерений (далее – МВИ) концентрации м.о. в воздухе с определением операционных характеристик (стандартное отклонение повторяемости S , предел повторяемости, стандартное отклонение и предел промежуточной прецизионности, расширенная неопределенность) и валидности МВИ (взвешенное совокупное относительное стандартное отклонение подсчета клеток, чувствительность, специфичность, частота ложноположительных и ложноотрицательных результатов, селективность, эффективность, верхний предел линейности), что не позволяет широко использовать разработанные методики в разных микробиологических лабораториях, объективизировать и сравнивать полученные результаты контроля загрязнения воздуха микробным аэрозолем на соответствие гигиеническому нормативу.

Следовательно, для обеспечения соблюдения требований санитарного законодательства и нормативных правовых актов Республики Беларусь в области безопасного обращения м.о. и МП на их основе актуально и необходимо усовершенствовать и разработать современные методические подходы по их гигиеническому регламентированию и контролю в объектах окружающей среды.

Обоснование критериев оценки степени острой токсичности м.о.-производителей и МП, методики постановки эксперимента

Несмотря на постоянно расширяющуюся номенклатуру штаммов м.о., активно используемых в биотехнологии, в настоящее время не существует общепринятой гигиенической классификации промышленных м.о. по степени токсичности и опасности, как и методики их оценки, аналогичные для химических веществ по ГОСТ 12.1.007–76. Так, согласно [18, 19, 34, 41, 42 и

др.] исследования 1 этапа гигиенического нормирования предусматривают определение основных признаков патогенности м.о. с целью отбора штаммов для квалификации как промышленные и последующей постановки исследований по нормированию или запрещению изучаемого м.о. для производства и использования:

- определение патогенности (вирулентности) по величине LD_{50} ;
- определение токсигенности и токсичности м.о.

Степень патогенности м.о. (бактерий, грибов) определяется их вирулентностью, т.е. способностью вызывать патологический процесс в макроорганизме с летальным исходом. Для ее определения используют интегральный показатель – LD_{50} , т.е. дозу, которая вызывает гибель 50% подопытных животных. В устаревших методических указаниях [18, 42] определение LD_{50} проводят путем введения суспензии штаммов м.о. в пяти последовательно снижающихся дозах кратных десяти (10^{10} , 10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6) м.кл. на одно животное интраназально, внутрибрюшинно и внутрижелудочно. Объем суспензии при внутрибрюшинном и внутрижелудочном введении не должен превышать $1,0 \text{ см}^3$ для мыши и $5,0 \text{ см}^3$ для крысы. При интраназальном введении объем суспензии составляет соответственно $0,007-0,05 \text{ см}^3$ и $0,05-0,25 \text{ см}^3$. На каждую дозу используют не менее 12 мышей и 12 крыс (по 6 самок и 6 самцов) и проводят наблюдения за их выживаемостью и общим состоянием в течение 30 суток. Расчет LD_{50} проводят одним из общепринятых статистических методов.

Причем критериями для запрещения промышленного использования высокоопасных (I класс) м.о. по результатам I этапа являлись:

- LD_{50} при введении м.о. в желудок мышей менее 10^7 м.кл./животное, а при введении внутрибрюшинно – менее 10^5 м.кл./животное;
- м.о. обладает выраженной токсичностью – LD_{50} менее 10^6 м.кл./животное и токсигенностью – LD_{50} менее $1,0 \text{ мл}$ /животное.

Как видно из приведенных методических материалов, в оценке патогенности по LD_{50} использовали рассчитанную дозу микробных клеток на животное. Аргументом для этого являлось то, что расчеты доз м.о., которые вводятся в организм, проводятся не так, как для химических веществ, когда количество препарата выражается, как правило, в мг на кг массы животного или человека. При оценке опасности м.о. такие расчеты непригодны, потому что видовая восприимчивость макроорганизма к м.о. имеет не меньшее значение, чем патогенные свойства м.о., в свя-

зи с чем доза м.о., которая вводится, выражается не в мг, а по количеству микробных клеток на весь организм, а не на его вес. Выражается это количество в единицах введенных м.о. каждому экспериментальному животному: для бактерий за такую единицу принимается образование, которое продуцирует одну колониюобразующую единицу (далее – КОЕ) на соответствующей твердой питательной среде, для грибов – отдельная спора, которая определяется микроскопически или дает одну КОЕ на соответствующей питательной среде [41].

Данные положения во многом не верны. Во-первых, рассчитанная LD_{50} не учитывает массу опытных животных, которые по методическим указаниям колеблются в значительных параметрах (белые крысы 160-200 г, белые мыши 16-24 г), а, следовательно, показатель LD_{50} , не учитывающий вводимую дозу на кг массы животных, не может быть объективно интегральным.

Во-вторых, для определения LD_{50} рекомендовано для введений животным использовать 5 последовательно снижающихся доз м.о., не учитывая, что для промышленных (непатогенных) м.о. характерным при действии на организм теплокровных животных является, как правило, отсутствие токсического эффекта по критерию гибели даже после введения максимально возможных больших доз.

К тому же, при умеренной выраженности факторов патогенности м.о. (инфекционность, инвазивность и токсичность) летальность и клиническая картина интоксикации у опытных животных формируется, как правило, сразу в течение нескольких часов или до 1-2 суток после введения, с последующим восстановлением. Следовательно, в принципе не требуется последующее длительное наблюдение за состоянием опытных животных в течение до 30 суток. Эти доводы подтверждаются анализом данных выполненных ранее исследований по оценке патогенности м.о. и МП.

Так, при введении внутрижелудочно белым крысам и внутрибрюшинно белым мышам м.о. и МП в максимально возможных дозах (от $1,0 \times 10^9$ м.кл./жив. и выше) в основном сразу или в течение первых суток после воздействия только на 39 МП из изученных 117 (33%) отмечался летальный исход 1 и более животных опытной группы, а летальность в количестве половины и более животных опытной группы отмечалась только на 16 МП в основном при внутрибрюшинном введении, на которые опыты повторялись при снижении дозы в 10 раз. Причем, на дозу м.о. при внутрибрюшинном введении белым мышам ниже 1×10^8 м.кл./

жив. ни в одном эксперименте не выявлялась летальность опытных животных или выраженная клиническая картина интоксикации.

Следовательно, традиционная схема не рациональна и весьма материально затратная. Для оценки степени патогенности м.о. с целью, главным образом, решения вопроса о квалификации их как промышленные штаммы достаточно определить ориентировочную LD_{50} при введении в организм животных максимально возможных доз м.о., например, в стандартной высокой дозе на уровне $1,0 \times 10^9$ м.кл./жив. на установленную среднюю массу опытных животных. Причем наблюдение за состоянием опытных животных следует ограничить до 5 суток. И только при установлении гибели половины и более животных, за счет более выраженных факторов патогенности м.о., необходимо проводить дополнительные опыты в более низких дозах, вплоть до установления лимитирующей дозы на рекомендуемом уровне $1,0 \times 10^7$ м.кл./жив., позволяющей квалифицировать отнесение м.о. к возбудителям инфекционных заболеваний.

В-третьих, в существующих методических подходах отсутствует объективная классификация промышленных штаммов м.о. по степени патогенности в острых экспериментах и соответствующие количественные критерии, подобные для веществ по ГОСТ 12.1.007–76. В последней более современной, предложенной Н.И. Шеиной [41] классификации, м.о. уже классифицированы на 4 класса: 1-ый и 2-ой классы как особо опасные инфекционные агенты и опасные возбудители других инфекционных заболеваний, 3-ий класс – умеренно опасные и 4-ый класс – малоопасные м.о. Однако и в ней показателем классифицирования по патогенности (острой токсичности) является только пороговая доза при внутрижелудочном введении, причем с выражением LD_{50} в м.кл./жив., одинаковая для м.о. 3-го и 4-го классов на уровне более 10^7 м.кл./жив. Это не позволяет дифференцировать м.о. 3-го и 4-го классов опасности и обосновывать соответствующие требования безопасности.

Следовательно, необходимо четко определить лимитирующие параметры патогенности (токсичности) изучаемых м.о. по интегральному показателю LD_{50} в м.кл./кг по классам опасности.

В-четвертых, квалификация изучаемых м.о. как обладающих выраженной токсигенностью (патогенностью экзотоксинов), используя для LD_{50} объемную (менее 1,0 мл/животное), в корне не верна, поскольку возможно определять токсигенность по оценке выраженности отека на месте подкожного введения белым мышам $0,5 \text{ см}^3$

фильтрата из культуральной суспензии только по количественной дозе клеток м.о. в суспензии.

На основании экспериментального изучения разных видов, родов и штаммов м.о. и МП на их основе нами обоснованы следующие рациональные стандартные условия постановки острого эксперимента для оценки степени их токсичности (патогенности) и объективные критерии определения класса опасности.

Степень патогенности м.о. определяется их вирулентностью, т.е. способностью вызывать патологический процесс в макроорганизме с летальным исходом. Для ее определения используют интегральный показатель – $ЛД_{50}$, т.е. дозу, которая вызывает гибель (летальность) 50% опытных животных при введении определенного количества м.о. внутрижелудочно белым крысам и внутрибрюшинно белым мышам.

Для испытаний м.о. используют их смыв стерильным физиологическим раствором с плотной питательной среды и последующим подсчетом концентрации в КОЕ/см³. Для испытаний МП используют культуральную жидкость с содержанием суспензии микроорганизма(ов)-продуцента с установленной концентрацией в КОЕ/см³. Представленные для испытания образцы препаратов должны содержать м.о. в концентрации не менее $1,0 \times 10^9$ КОЕ/см³. Гомогенизация суспензии и асептичность являются обязательными условиями подготовки материала для экспериментального заражения.

Взвешивание опытных белых крыс производят перед введением с точностью ± 5 г, белых мышей – с точностью $\pm 0,2$ г.

Белым крысам (6 в опытной группе) вводят внутрижелудочно суспензию испытуемого препарата в фактической дозе, рассчитываемой с учетом индивидуальной массы тела опытных животных, исходя из стандартной дозы $3,0 \times 10^9$ м.кл./жив. – в объеме по $3,0$ см³ в исходной концентрации $1,0 \times 10^9$ м.кл./см³ – на 180 г массы животного.

Белым мышам (8 в опытной группе) вводят внутрибрюшинно суспензию испытуемого препарата в фактической дозе, рассчитываемой с учетом индивидуальной массы тела опытных животных, исходя из стандартной дозы $5,0 \times 10^8$ м.кл./жив. – в объеме по $0,5$ см³ в исходной концентрации $1,0 \times 10^9$ м.кл./см³ – на 20 г массы животного.

Фактические вводимые дозы м.о. (по вводимому объему суспензии) рассчитывают с учетом индивидуальной массы тела опытных животных, которая может различаться в широких пределах.

В течение 5 суток наблюдают за выживаемостью и клиническими проявлениями интокси-

кации с посуточной регистрацией летальности опытных животных.

При отсутствии павших животных в опытных группах или регистрации гибели 1 из 6 белых крыс и 1-2 из 8 белых мышей в период наблюдения рассчитывают интегральный показатель степени патогенности по относительной величине $ЛД_{50}$ по формуле:

$$ЛД_{50} > (D : M) \times 1000, \quad (1),$$

где: $ЛД_{50}$ – относительная величина среднесмертельной дозы испытуемого препарата в м.кл./кг, D – среднеарифметическая величина фактически введенных доз МП в количестве микробных клеток на животное, рассчитываемых с учетом стандартной дозы и индивидуальной массы каждого животного опытной группы, M – средняя масса тела животных опытной группы в г, 1000 – коэффициент пересчета на кг массы тела животных.

При регистрации существенной летальности, т.е. при учете в период наблюдения гибели в опытной группе белых крыс 2-х и более животных из шести, а в группе белых мышей 3-х и более из 8 животных, опыты аналогично повторяют, последовательно снижая стандартную дозу суспензии препарата на порядок (в 10, 100 и более раз при необходимости). Расчет относительной величины $ЛД_{50}$ проводят по формуле (1) с учетом фактически введенных доз испытуемого препарата.

В зависимости от установленной в острых опытах при внутрижелудочном и внутрибрюшинном введении относительной величины $ЛД_{50}$ испытанные образцы м.о. и МП дифференцируют по классам опасности согласно следующим обоснованным количественным критериям, приведенным в таблице 1.

При различии в относительных величинах $ЛД_{50}$ при внутрижелудочном и внутрибрюшинном введении м.о. и МП класс токсичности (опасности) устанавливают по наименьшей величине более чувствительного показателя (в основном внутрибрюшинная патогенность, поскольку при поступлении через слизистые ЖКТ за счет их физико-химических и иммунобиологических «барьерных» факторов вирулентность м.о. с более низкой инвазивной способностью может быть значительно снижена.

При выявлении выраженной токсигенности (токсичность экзотоксинов в основном грамположительных патогенных бактерий), проявляющейся летальностью, резким похуданием и адинамией опытных животных, некрозом тканей в месте подкожного введения в заднюю лапу белых мышей в дозе $0,5$ см³ фильтрата из культуральной суспензии м.о. в стандартной концентрации $1,0 \times 10^9$

Таблица 1. Классификация опасности м.о.-продуцентов и МП в острых опытах

Интегральный показатель степени патогенности	Класс опасности (по степени токсичности)			
	I	II	III	IV
Среднесмертельная доза при внутрижелудочном введении белым крысам (относительная величина ЛД ₅₀), м.кл./кг	5,5x10 ⁷ и менее		5,6x10 ⁷ – 5,0x10 ⁹	5,1x10 ⁹ и более
Среднесмертельная доза при внутрибрюшинном введении белым мышам (относительная величина ЛД ₅₀), м.кл./кг	5,0x10 ⁶ и менее		5,1x10 ⁶ – 5,0x10 ⁹	5,1x10 ⁹ и более

Примечание: I-й класс – чрезвычайно опасные (1 и 2 группы патогенных м.о.); II-й класс – высокоопасные (3 и 4 группы м.о.-возбудителей инфекционных заболеваний); III-й класс – умеренно опасные м.о.; IV-й класс – малоопасные м.о.

м.кл./см³, м.о. и МП относятся к высокоопасным.

М.о. и МП I и II классов опасности запрещаются для промышленного использования.

М.о. и МП III и IV классов опасности квалифицируются как промышленные штаммы и разрешаются для биотехнологического производства и использования по назначению.

В токсикологических паспортах на м.о. и в заключениях по токсиколого-гигиенической оценке МП обязательно указываются относительные величины интегрального показателя патогенности ЛД₅₀ и класс их опасности.

Используя обоснованные подходы и критерии класса опасности, нами обобщены результаты ранее выполненных исследований более 100 м.о.-продуцентов и МП на их основе.

Обоснование критериев оценки степени сенсибилизирующей активности и алергоопасности м.о.-продуцентов и МП

При производстве и использовании м.о. и МП на их основе возможно загрязнение ими производственной среды, выделение в воздух рабочей зоны и атмосферы с вредным воздействием на здоровье работников, прежде всего, за счет их гетероантигенности и формирования в организме аллергических и иммунотоксических эффектов.

Непременным этапом первичной токсикологической оценки и гигиенической регламентации в окружающей среде м.о. и МП на их основе является определение степени их сенсибилизирующей активности и оценка аллергенной опасности.

Однако до настоящего времени отсутствует объективные критерии определения степени сенсибилизирующей активности и оценки класса аллергенной опасности м.о. и МП, что не позволяет учитывать эти негативные свойства в определении ведущего их вредного действия на организм и лимитирующего показателя нормирования, в разработке профилактических мер защиты здоровья работников при их производстве и применении.

В публикациях и в известных методических

указаниях [42] приводятся следующие условия специального эксперимента: белые мыши (по 20 особей в группах) подвергаются пятидневному интраназальному или энтеральному воздействию м.о. и МП в концентрациях на порядок ниже ЛД₅₀ с последующей оценкой через 5 суток ГЗТ по статистически достоверным различиям между средними показателями выраженности отека лапок опытных и контрольных животных (по разнице в толщине лап в мм) после провокационной пробы введения в апоневроз задних лап животных обеих групп по 0,05 мл суспензии живой культуры м.о. или МП в той же концентрации. Указанные методические подходы имеют ряд недостатков.

Во-первых, данный эксперимент позволяет альтернативно устанавливать только потенциальное сенсибилизирующее действие, т.е. обладает или нет МП сенсибилизирующей способностью.

Во-вторых, оценку ГЗТ по внутрикожному тесту опухания лапы (далее – ВТОЛ) проводят по абсолютным величинам разницы в толщине лапы в мм после и до провокационной пробы, что не учитывает коллатеральные различия толщины лап даже у одного и того же животного и отражается на объективности измерения, а также не позволяет учитывать разную степень выраженности ГЗТ на испытываемые м.о. и МП.

В-третьих, для определения сенсибилизирующего действия м.о. и МП необходим специальный эксперимент на большом количестве мышей или на морских свинках, хотя известно, что на ингаляционное поступление в организм белых крыс биологических аллергенов также развивается адекватный гипериммунный ответ по замедленному типу аллергического процесса [38, 39, 42] и это определяет адекватную возможность использования белых крыс в оценке сенсибилизирующей активности м.о. и МП.

В-четвертых, для провокационного внутрикожного тестирования животных используются жизнеспособные м.о., при этом выявляется ГЗТ только на поверхностные (мембранные) антигены м.кл., тогда как макрофагами после фагоцитоза и

Таблица 2. Шкала перевода абсолютных величин ВТОЛ в величины интегрального показателя в баллах

Абсолютная величина ВТОЛ, 10 ² мм	Интегральный показатель ВТОЛ, балл
до 10,0	0
11,0 – 20,0	1
21,0 – 30,0	2
31,0 – 40,0	3
41,0 – 50,0	4
Более 50,0	5

киллинга м.о. представляются для формирования иммунного ответа как поверхностные, так и внутриклеточные антигены м.о.

Приведенные условия эксперимента не позволяют объективно классифицировать м.о. и МП по степени выраженности их сенсибилизирующей активности. Только Н.И.Шеиной [41] предпринята попытка классифицировать м.о. и МП по степени выраженности индуцированной аллергической реакции немедленного анафилактического типа. Однако предложенная шкала разделения промышленных м.о. на три класса основана только на критериях показателей косвенной оценки ГНТ: по критериям уровня достоверности различий в опыте и контроле по критерию *t* количества дегранулированных тучных клеток, величины показателя РДТК и частоты положительных результатов по РДТК, что не адекватно и не объективно характеризует сенсибилизирующую способность м.о. и МП, не соответствует основным принципам классифицирования вредных веществ.

В тоже время, принципы и критерии объективной классификационной оценки сенсибилизирующей способности в достаточной степени разработаны как в целом [17], так и для химических [36] и биологических [37] промышленных аллергенов.

Поскольку промышленные штаммы м.о. и МП на их основе как полные гетероантигены не проникают через кожный барьер, а при парентеральном пути поступления в организм вызывают в основном защитные иммунные реакции, то для экспериментального воспроизведения сенсибилизации (гипериммунного ответа) к ним используют адекватную экспериментальную модель подострого ингаляционного воздействия (интраназальное введение) м.о. и МП на организм белых крыс. Определение степени сенсибилизирующей активности и аллергенной опасности м.о. и МП проводят путем воспроизведения и выявления ГЗТ в следующих стандартных условиях эксперимента.

Для проведения эксперимента взвешивают (с точностью до ± 5 г) белых крыс одного пола и подбирают инбредные по массе опытную и контрольную группы по 10-12 животных в каждой. Ежедневно в течение 5 дней опытным белым крысам пипеточным дозатором вводят дробно на вдохе животного интраназально в объеме 0,1 см³ суспензию живых м.о. (смыв стерильным физиологическим раствором с плотной питательной среды) или МП (культуральная жидкость с содержанием суспензии м.о. или смеси м.о.) в стандартной дозе по 1,0x10⁸ м.кл. на 180 г массы животного.

По известной формуле [42] проводят последующий пересчет вводимой дозы на концентрацию клеток во вдыхаемом воздухе по формуле:

$$K = D : V \quad (2),$$

где: *K* – количество микробных клеток (концентрация) в 1 м³ воздуха, *D* – количество микробных клеток введенных животному, *V* – объем вдыхаемого воздуха используемого вида животных, который определяется как произведение легочной вентиляции в см³/г/мин (показатель для крыс 0,65) на массу тела каждого животного опытной группы и время ингаляции (4 часа). Рассчитывают индивидуальную ингалируемую концентрацию микробных клеток в 1 м³ воздуха (*K*_п, в м.кл./м³) как частное от деления величины фактической введенной дозы м.о. конкретному животному на объем вдыхаемого воздуха с последующим определением средней ингалируемой концентрации м.о. в м.кл./м³ (*K*_{ср}).

Выявление сенсибилизации по ГЗТ производят на 6-е сутки опыта постановкой провокационного внутрикожного теста опухания лапы (ВТОЛ) путем введения шприцом в срединный сегмент подушечки (под апоневроз) задней лапы всех фиксированных животных опытной (сенсибилизированные) и контрольной (интактные) групп суспензии м.о. или смеси м.о., содержащихся в МП, в объеме по 0,06 см³ в исходной концентрации 1,67x10⁷ м.кл./см³ – стандартная доза 1,0x10⁶

Таблица 3. Шкала классификационной оценки м.о.-продуцентов и МП по степени сенсibiliзирующей активности и аллергенной опасности

Критерии	Классы сенсibiliзирующей активности (сила аллергена/степень опасности)			
	1 Сильные (чрезвычайно опасные)	2 Выраженные (опасные)	3 Умеренные (умеренно опасные)	4 Слабые (малоопасные)
H ¹)	75 и более	более 50	50 и более	25 и более
Pt	<0,01-0,001	<0,05-0,01	<0,05	>0,05
Px	<0,01	<0,05	>0,05	>0,05

Примечание: H¹) – выявляемость сенсibiliзации по частоте положительного теста ВТОЛ в баллах у животных опытной группы в %; Pt – уровень значимости достоверных различий среднегрупповых величин интегрального показателя ВТОЛ в опытной и контрольной группах по критерию t; Px – то же по критерию «X».

м.кл./жив., не вызывающая существенного неспецифического воспаления тканей.

Затем инженерным микрометром измеряют у каждого животного обеих групп до и через 24 часа после введения толщину тестируемой лапы, для чего устанавливают измерительные плоскости микрометра строго над участком тестирования и сдвигая их, вращая трещотку микрометра до трех щелчков. Ослабив зажим обратным вращением трещотки, процедуру измерения повторяют еще дважды, учитывают результат последнего измерения с точностью до 0,01 мм. По разнице толщины лапы каждого животного после и до тестирования в единицах 10⁻²мм определяют величину абсолютного показателя ВТОЛ.

Для оценки степени выраженности сенсibiliзации используют интегральный показатель ВТОЛ, который определяют в баллах по шкале, приведенной в таблице 2.

Степень сенсibiliзирующей способности м.о. или МП определяют по следующим количественным критериям: частоте выявления ГЗТ у опытных животных (1 и более баллов интегрального показателя ВТОЛ) в %, уровню статистической значимости различий среднегрупповых величин интегрального показателя ВТОЛ в опыте и контроле по критерию t Стьюдента и по «жесткому» непараметрическому критерию «X» Ван дер Вардена, который учитывает достоверность различий в опытной и контрольной группах по частоте проявления и величинам интегрального показателя ГЗТ в баллах у отдельных животных.

С учетом данных критериев определяют класс сенсibiliзирующей способности и аллергенной опасности испытанных м.о.-продуцентов и МП в соответствии со шкалой, приведенной в таблице 3.

Предложенная нами методика выявления ГЗТ in vivo и критерии определения класса аллерген-

ной опасности м.о.-продуцентов и МП на их основе более чувствительна и объективна по сравнению с аналогом определения их аллергенной активности по ГНТ in vitro [41]. Так, по данным Н.И. Шеиной [41] бактерии *Micrococcus* и *Rhodococcus* не проявляли в ингаляционных экспериментах сенсibiliзирующих и иммуностропных свойств. В то же время по предложенной нами методике МП Антоил (смесь бактерий штаммов *Pseudomonas putida* 10АП, *Rhodococcus ruber* 2В, *Rhodococcus* sp. R1-3ФН и *Bacillus subtilis* 6/2 АПФ1 в концентрации 7,27x10⁹ м.кл./м³) и Родобел Т2 (смесь бактерий штаммов *Rhodococcus wratislaviensis* Г-13 и *Rhodococcus ruber* 1НГ-30П, *Bacillus* sp. 2-4-201Н и *Bacillus* sp. 4НГ-ПСД в концентрации 5,65x10⁹ м.кл./м³) дифференцированы ко 2 классу опасности, а МП Клинка (содержащий в смеси бактерий *Rhodococcus* sp. 1НГ) – к 1 классу.

Согласно аналогу: м.о. *Bacillus subtilis*, *Trichoderma* проявляли только слабые сенсibiliзирующие свойства, тогда как по нашей методике изученные МП Лигнорин (на основе грибов *Trichoderma lignorum* Harz.T 13-82 в концентрации 3,4x10⁹ сп./м³) и МП Жыцень (смесь м.о., содержащая грибы *Trichoderma* sp. R-15) обладают выраженной сенсibiliзирующей активностью и отнесены к 2 классу опасности; МП Бактрин (смесь бактерий *Bacillus subtilis* в концентрации 5,55x10⁸ м.кл./м³) отнесен к 1 классу, МП Бетапротектин (бактерии *Bacillus subtilis* М-22 в концентрации 1,04x10⁹ м.кл./м³) и МП Бактоген-паста (бактерии *Bacillus subtilis* 494 КМБУ 30043 в концентрации 2,45x10¹⁰ м.кл./м³) – к 2 классу опасности. Только 1 изученный штамм м.о. *Bacillus subtilis* КМБУ 2003 (продуцент аминокислоты L-триптофан) в концентрации 5,81x10⁹ м.кл./м³ проявил слабую сенсibiliзирующую активность (4 класс).

Таким образом, предложенная и апробиро-

ванная методика экспериментального изучения и критерии определения степени выраженности сенсibilизирующей активности и класса аллергенной опасности м.о. и МП обоснованы, объективны и информативны.

Причем определение степени сенсibilизирующей активности и аллергенной опасности МП проводят не в отдельном специальном эксперименте как по традиционной методике на белых мышках, а на 1 стадии изучения биологического действия МП при месячном ингаляционном воздействии на одних и тех же группах опытных и контрольных белых крыс, что обуславливает значительную экономию денежных и материальных средств (снижение затрат только по приобретению и содержанию белых крыс составляет более 1,5 млн. бел. руб. в ценах на 01.07.2013).

Обязательным требованием при выявлении у штаммов м.о. и МП на их основе сенсibilизирующей активности 1-3 классов является гигиеническая регламентация их содержания в воздухе рабочей зоны.

Таким образом, промышленные микроорганизмы представляют собой серьезную опасность как для организма человека, так и для объектов производственной и окружающей среды, при этом для обеспечения соблюдения требований санитарного законодательства и нормативных правовых актов Республики Беларусь в области безопасного обращения микроорганизмов-продуцентов и биопрепаратов на их основе актуально и необходимо усовершенствовать и разработать современную методологию их гигиенического регламентирования и контроля в объектах окружающей среды. Нами с учетом данных литературы, результатов собственных исследований патогенных, токсигенных и токсических свойств, степени сенсibilизирующей активности 88 штаммов микроорганизмов-продуцентов разных родов, видов и штаммов микроорганизмов и 29 микробных препаратов на их основе:

1. обоснованы рациональные стандартные условия постановки острого эксперимента для оценки степени токсичности (патогенности) и объективные количественные критерии определения класса опасности микроорганизмов и микробных препаратов;

2. доказана объективность разработанных унифицированных методических подходов и критериев классифицирования микроорганизмов-продуцентов и микробных препаратов по степени опасности, на основании которых определены параметры патогенности, токсигенности и токсичности изученных штаммов бактерий с минимальными материальными затратами (снижение затрат

только по приобретению и содержанию опытных животных в 8,2 раза по сравнению с традиционной методикой), установлена принадлежность 8 штаммов микроорганизмов-продуцентов новых перспективных комбинированных микробных препаратов к IV классу опасности, при этом они квалифицированы как промышленные штаммы микроорганизмов;

3. разработана унифицированная методика воспроизведения (при 5-тикратном ингаляционном воздействии на организм белых крыс) и выявления сенсibilизации (по ГЗТ провокационным внутрикожным тестом опухания лапы животного) микроорганизмов-продуцентов и микробных препаратов, обоснованы критерии определения степени их сенсibilизирующей активности и классификационной аллергенной опасности, апробация которых показала их объективность и информативность.

Литература

1. Актуальные вопросы медицинской микологии: заболевания, вызванные условно-патогенными грибами / Л.Н. Бубнова [и др.] – М.: Медицина, 1987. – 50 с.
2. Алексеева, О.Г. Токсикологическое значение специфических эффектов промышленных загрязнителей биологической природы / О.Г. Алексеева // Токсиколог. вестн. – 1994. – № 6. – С. 2–5.
3. Багдасарьян, Г.А. Токсиколого-гигиеническая оценка действия дрожжеподобных грибов рода *Candida* на организм теплокровных животных и человека / Г.А. Багдасарьян, Н.П. Сергеук // Токсиколог. вестн. – 1994. – № 6. – С. 18–21.
4. Баширова, Р.М. Исследование комбинированного действия биологических факторов / Р.М. Баширова // Актуальные проблемы гигиены в Башкирской АССР. – Уфа, 1983. – С. 90–92.
5. Баширова, Р.М. Токсиколого-гигиеническая характеристика бактериального меприна: автореф. дис. ... канд. биол. наук. : 14.00.07 / Р.М. Баширова. – М., 1989. – 107 с.
6. Бидевкина, М.В. К оценке риска воздействия биотехнологических продуктов сложного состава / М.В. Бидевкина, В.С. Поздняков, Н.Г. Иванов // Тезисы докладов 2-ого съезда токсикологов России Москва, 10-13 ноября 2003 г. – М., 2003. – С. 59–60.
7. Биомаркеры токсического эффекта при оценке риска воздействия промышленных штаммов-продуцентов на организм / Н.И. Шеина [и др.] // Тезисы докладов 2-ого съезда токсикологов России. – М., 2003. – С. 290–291.
8. Бондаренко, Н.В. Состояние и перспективы развития биологического метода защиты растений в СССР / Н.В. Бондаренко, К.Е. Воронин, Ш.М. Гринберг // С.-х. биология – 1979, – Т. 14, № 6 – С. 675–682.
9. Буянов, В.В. Гигиеническое нормирование содержания в воздухе условно-патогенных микроорганизмов на примере *E. Coli* / В.В. Буянов, Н.П. Сергеук, Ю.В. Каплунов // Гигиена труда и проф. заболевания. – 1990. – № 8. – С. 27–30.
10. Гигиенические аспекты изучения препаратов микробиологического синтеза / В.И. Немыря [и др.] // Медицинские проблемы охраны окружающей среды : сб. науч. тр. – М., 1981. – С. 148–153.

11. *Иванова, И.А.* Гигиеническая оценка биологических инсектицидов по некоторым показателям реактивности организма (экспериментальные исследования): автореф. дис. ... канд. биол. наук: 14.00.07 / И.А. Иванова; НИИГТиПЗ. – М., 1985. – 21 с.
12. *Иванова, И.А.* Особенности действия микробиологических средств защиты растений на организм / И.А. Иванова // Известия АН Лат. ССР. – 1985. – № 6 (455). – С. 76–81.
13. *Израйлет, Л.И.* Гигиеническая оценка боверина и некоторые перспективы применения микробиологических средств защиты растений / Л.И. Израйлет, М.Э. Эглите, Л.В. Дроздова // Гигиена и санитария. – 1975. – № 11. – С. 91–94.
14. *Израйлет, Л.И.* Гигиеническое нормирование дендробациллина в воздухе производственных помещений в атмосферном воздухе / Л.И. Израйлет, Р.Е. Когай // Гигиена и санитария. – 1978. – № 7. – С. 32–35.
15. *Израйлет, Л.И.* Методические указания в постановке исследований по гигиеническому нормированию микробных препаратов в воздухе рабочей зоны / Л.И. Израйлет, В.Н. Слинко, Е.П. Седышева; МЗ Латв. ССР. – Рига, 1978. – 6 с.
16. *Квятковская, И.Я.* Токсиколого-гигиеническая оценка микроорганизмов-продуцентов как загрязнителей производственной среды (к обоснованию принципов, методов и иммунологических критериев их санитарной стандартизации): автореф. дис. ... д-ра мед. наук: 14.00.07 / И.Я. Квятковская; НИИГТиПЗ. – М., 1990. – 40 с.
17. *Классификация и перечень алергоопасных для человека промышленных веществ, основные меры профилактики: руководство Р 11-11-11 РБ О2* // Сборник официальных документов по медицине труда и производственной санитарии. – Минск: РЦГЭ и ОЗ, 2003. – Ч. XI. – С. 94–126.
18. *Критерии* оценки патогенных свойств штаммов-продуцентов, предлагаемых для использования в промышленности микробиологического синтеза: метод. рекомендации / Ю.П. Пивоваров [и др.]. – М., 1992. – 20 с.
19. *Медико-биологические исследования производственных штаммов микроорганизмов и токсиколого-гигиеническая оценка микробных препаратов, определение их безопасности и обоснование гигиенических нормативов и регламентов: метод. указания / М-во здравоохранения Украины, приказ № 521 от 2004 г.* – Киев, 2004. – 37 с.
20. *Мельникова, Е.А.* Гигиеническое изучение антибиотиков и микробных препаратов, предназначенных для применения в сельском хозяйстве: автореф. дис. ... д-ра. мед. наук: 14.00.07 / Е.А. Мельникова. – Киев, 1977. – 42 с.
21. *Немыря, В.И.* Результаты динамических исследований состояния здоровья населения в районе расположения предприятий по производству кормового белка / В.И. Немыря, Ю.Н. Никитина // Факторы окружающей среды и здоровье населения: сб. науч. тр. – М., 1988. – С. 99–104.
22. *О влиянии факторов биотехнологического производства на реактивность иммунной системы / Л.Б. Захарова [и др.]* // Медицина труда и пром. экология. – 1994. – № 10. – С. 17–18.
23. *Омельянец, Т.Г.* Гигиенические аспекты охраны окружающей среды в связи с применением в сельском хозяйстве микробных препаратов на основе неспорообразующих микроорганизмов: автореф. дис. ... д-ра мед. наук / Т.Г. Омельянец. – М., 1982. – 38 с.
24. *Патогенный, аллергенный, антимикробный и иммуногенный эффекты в профилактической токсикологии / И.А. Иванова [и др.]* // Всесоюзная учредительная конференция по токсикологии: тезисы докл. конф. – М., 1980. – С. 52.
25. *Пивоваров, Ю.П.* Промышленные микроорганизмы причины возможного негативного действия на окружающую среду и здоровье людей / Ю.П. Пивоваров, В.В. Королик // Токсиколог. вестн. – 1994. – № 6. – С. 13–16.
26. *Постановка исследований для обоснования предельно-допустимых концентраций производственных штаммов микроорганизмов и на их основе готовых форм препаратов в воздухе рабочей зоны: метод. указания: утв. МЗ СССР 23.12.83, № 2955-83.* – 19 с.
27. *Принципиальные подходы к нормированию биологических загрязнителей / Ю.А. Рахманин [и др.]* // Гигиена и санитария. – 2001. – № 1. – С. 6–8.
28. *Продуцент* неомицина *Streptomyces tradiae* (штамм ЛИАЗ-0306) / Г.А. Багдасарьян [и др.] // Токсикологический вестник. – 1994. – № 6. – С. 43.
29. *Рыбалкин, С.П.* Методические особенности токсикологической оценки микроорганизмов-продуцентов и продуктов микробного синтеза / С.П. Рыбалкин, Н.Р. Дядищев, Р.В. Боровик // Токсиколог. вестн. – 1994. – № 6. – С. 11–12.
30. *Санитарно-гигиеническая оценка безвредности энтомопатогенных препаратов / Н.Д. Голидонова [и др.]*. – М.: ОНТИТЭИ, Главмикробиопром, 1977. – 27 с.
31. *Санитарно-гигиеническая оценка безвредности энтомопатогенных препаратов / В.П. Падалкин [и др.]*. – М., 1977. – 127 с.
32. *Сергеюк, Н.П.* Научные основы оценки опасности и гигиенической регламентации промышленных микроорганизмов: автореф. дис. ... д-ра мед. наук: 14.00.07 / Н.П. Сергеюк; ФНЦ гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана. – Мытищи, 2004. – 34 с.
33. *Сергеюк, Н.П.* Токсикология промышленных микроорганизмов / Н.П. Сергеюк, И.П. Супрун, В.В. Буянов. – М.: РАНИПХФ, 2003. – 127 с.
34. *Сергеюк, Н.П.* Токсикология промышленных микроорганизмов и продуктов микробиологического синтеза / Н.П. Сергеюк, Ю.Л. Походзей // Токсикологический вестник. – 1994. – № 6. – С. 5–10.
35. *Соседова, Л.М.* Токсико-гигиеническая оценка изолированного и сочетанного действия биологического фактора / Л.М. Соседова, В.С. Рукавишников // Тезисы докладов 2-ого съезда токсикологов России / Москва, 10-13 ноября 2003 г. – М., 2003. – С. 244–245.
36. *Требования к постановке экспериментальных исследований по изучению аллергенных свойств и обоснованию предельно допустимых концентраций химических аллергенов в воздухе рабочей зоны и атмосферы: метод. указания № 1.1.11-12-5-2003 / В.В. Шевляков [и др.]* // Сборник официальных документов по медицине труда и производственной санитарии. – Минск, 2004. – Ч. XIV. – С. 133–156.
37. *Требования к постановке токсиколого-аллергологических исследований при гигиеническом нормировании белоксодержащих аэрозолей в воздухе рабочей зоны: метод. указания № 11-11-10-2002 / В.В. Шевляков [и др.]* // Сборник официальных документов по медицине труда и производственной санитарии. – Минск,

2004. – Ч. XIV. – С. 4–49.

38. Ушков, С.А. Гигиеническая регламентация крупной пыли и обоснование единой предельно допустимой концентрации в воздухе рабочей зоны пыли зернорастительного происхождения / С.А. Ушков, В.В. Шевляков // Медико-биологические проблемы жизнедеятельности. – 2012. – № 1 (7). – С. 47-53.

39. Фрадкин, В.А. Аллергены / В.А. Фрадкин. – М.: Медицина, 1978. – 114 с.

40. Черноусов, А.Д. Метод определения аллергенной активности низкомолекулярных химических веществ на мышах / А.Д. Черноусов // Гигиена труда и проф. заболевания. – 1987. – № 5. – С. 45–47.

41. Шеина, Н.И. Научно-методические основы гигиенического нормирования и оценки профессионального риска воздействия биотехнологических штаммов микроорганизмов : автореф. дис. ... д-ра биол. наук : 14.00.50 / Н.И. Шеина ; Рос. гос. мед. ун-т. – М., 2008. – 38 с.

42. Экспериментальное обоснование ПДК микроорганизмов-продуцентов и содержащих их готовых форм

препаратов в объектах производственной и окружающей среды: метод. указания № 5789/1-91 / О.Г. Алексеева [и др.]; М-во здравоохран. СССР. – М.: Инф.-изд. Центр Госкомсанэпиднадзора России, 1993. – 20 с.

43. Bristow, V.G. Infection and allergy / V.G. Bristow // Ann. Allergy. – 1980. – V.44. – № 4. – P.225-227.

44. Hall, E. Boosterable IgE antibody response in mice without the use of adjuvant / E. Hall, S. Ahlstedt, A. Kristaferson // Int. Arch. Allergy. – 1982. – V. 67. – P. 96-99.

45. Involvement of atopic and infective factors in pathogenesis of bronchial asthma / V. Fedoseeva [e.a.] // Allergy. – 1996. – V. 51. – № 32. – P. 60-62

46. Intravenous immunoglobulin therapy induces neutrophil apoptosis in Kawasaki disease / S. Takeshita [e.a.] // Clin. Immun. – 2002. – V.103. – № 2. – P. 161-168.

47. Keropjan, J. Involvement different types of allergic reaction in pathogenesis of infective bronchial asthma / J. Keropjan, V. Fedoseeva, T. Chervinskaya // Allergy. – 1998. – V. 53. – № 43. – P. 150 -152.

Поступила 10.02.2014