

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель Министра
здравоохранения – Главный
государственный санитарный
врач Республики Беларусь



А.А.Тарасенко

« 01 » 2022 г.

Регистрационный № 007-1121

МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ ИЗ ПРОМЫШЛЕННОЙ ПЫЛИ ЭКСТРАКТА
ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ПРОФЕССИОНАЛЬНОЙ АЛЛЕРГИЧЕСКОЙ
ПАТОЛОГИИ И ГИГИЕНИЧЕСКОГО НОРМИРОВАНИЯ

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

Республиканское унитарное предприятие «Научно-практический центр
гигиены»

АВТОРЫ:

д-р мед. наук, профессор Шевляков В.В., канд. мед. наук, доцент
Сычик С.И., Баранов С.А., канд. биол. наук Эрм Г.И., канд. мед. наук
Богданов Р.В., канд. мед. наук Чернышова Е.В., канд. биол. наук
Кузовкова А.А.

Минск, 2022

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра
Главный государственный
санитарный врач
Республики Беларусь

_____ А. А. Тарасенко
28.01.2022
Регистрационный № 007-1121

**МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ ИЗ ПРОМЫШЛЕННОЙ ПЫЛИ ЭКСТРАКТА
ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ПРОФЕССИОНАЛЬНОЙ АЛЛЕРГИЧЕСКОЙ
ПАТОЛОГИИ И ГИГИЕНИЧЕСКОГО НОРМИРОВАНИЯ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: РУП «Научно-практический центр гигиены»

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф. В. В. Шевляков, канд. мед. наук, доц. С. И. Сычик,
С. А. Баранов, канд. биол. наук Г. И. Эрм, канд. мед. наук Р. В. Богданов, канд.
мед. наук Е. В. Чернышова, канд. биол. наук А. А. Кузовкова

Минск 2022

ГЛАВА 1

НАЗНАЧЕНИЕ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

1. В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод получения в лабораторных условиях экстракта из образца ненормированной в воздухе рабочей зоны промышленной пыли (далее — экстракт).

Метод может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на медицинскую профилактику профессиональной аллергической патологии, связанной с воздействием промышленной ненормированной пыли, путем применения полученного экстракта:

в качестве тест-аллергена для верификации профессионального генеза аллергического заболевания, диагностированного у работающего в условиях воздействия данной ненормированной органической пыли, при отсутствии коммерческих специфических диагностических препаратов и систем на вещества-аллергены этой пыли;

для экспериментальных исследований по обоснованию предельно допустимой концентрации промышленной органической пыли в воздухе рабочей зоны (далее — ПДКврз) по белковой составляющей.

2. Настоящая инструкция предназначена для специалистов организаций здравоохранения, осуществляющих диагностику профессиональных аллергических заболеваний, иных учреждений, занимающихся изучением и обоснованием гигиенических нормативов содержания в воздухе рабочей зоны алергоопасных промышленных аэрозолей.

3. Настоящая инструкция вступает в силу с даты ее утверждения.

ГЛАВА 2

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

4. Метод позволяет получить из образца ненормированной промышленной органической пыли растительного, животного или смешанного происхождения (далее — ОП), отобранного на производстве в соответствии с инструкцией [1], экстракт с максимально возможным содержанием растворимых белоксодержащих субстанций с сохранением их антигенной активности.

5. В зависимости от степени водорастворимости и химической структуры вещества конкретного вида ОП используют метод получения из отобранного образца пыли экстракта в разных вариантах:

варианты экстракции из ОП с умеренно-высокой растворимостью в насыщенный водно-солевой раствор;

варианты деструкции структуры основного вещества ОП с «жесткой» химической структурой и низкой водорастворимостью (например, растительные и животные волокна, хитин- и целлюлозосодержащие вещества и т. п.).

6. При постановке метода в лаборатории согласно СТБ ISO 7218 должны быть соблюдены следующие условия:

температура воздуха при выполнении измерений (18–27) °С;

атмосферное давление от 84 до 107 кПа (630–800) мм рт. ст.;

относительная влажность воздуха не более 80 % при температуре 25 °С.

Помещения для проведения измерений должны быть оснащены приточно-вытяжной вентиляцией.

ГЛАВА 3 ОБОРУДОВАНИЕ, МАТЕРИАЛЫ, РЕАКТИВЫ, ЛАБОРАТОРНАЯ ПОСУДА

7. Оборудование	Нормативная документация
Анализатор потенциометрический (рН-метр) с диапазоном измерений 0–14 и погрешностью измерений $\pm 0,1$ с набором электродов	ГОСТ 19881-74
Баня водяная с терморегулятором, позволяющая поддерживать температуру $(56 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$	ГОСТ 12026 ТУ ВУ 100644799.004-2006
Весы лабораторные высокого класса точности с наибольшим пределом взвешивания не менее 200 г и погрешностью не более 0,01 г	ГОСТ 24104-2001
Весы лабораторные $(2-4000) \pm 0,3$ г	ГОСТ 24104-2001
Дезинтегратор ультразвуковой типа «RK 103 Н» (Bandolinelectronic, Германия)	
Инактиватор суховоздушный с автоматической регулировкой температуры	
Кофемолка бытовая	
Морозильная камера бытовая	
Мешалка магнитная	
Ротационный смеситель типа «LOIP LS-120» с максимальной частотой колебаний платформы 250 об/мин или шутель-аппарат для колб	
Термостат электрический суховоздушный с диапазоном рабочих температур от 28 до 55 $^\circ\text{C}$ с погрешностью $\pm 1 ^\circ\text{C}$	ТУ РБ 14789681.004-2000
Холодильник бытовой	СТБ 1499-2004
Фотоэлектрокалориметр концентрационный типа КФК-2 или спектрофотометр	
Центрифуга лабораторная с частотой оборотов до 800 g	
Допускается применение другого вспомогательного оборудования, а также средств измерения и испытательного оборудования с аналогичными по назначению техническими и метрологическими характеристиками.	
8. Материалы	Нормативная документация
Бумага индикаторная универсальная	ТУ 6-091181-76
Бумага фильтровальная лабораторная	ГОСТ 12026-76
Вата медицинская гигроскопичная	ГОСТ 5556-81

Дозаторы автоматические с переменным объемом дозирования от 20 до 200 мм ³ с шагом 0,2 мм ³ , с точностью ±0,6 %; от 100 до 1000 мм ³ с шагом 1 мм ³ , с точностью ±3 %	ГОСТ 8.523-2014 ГОСТ 28311-89
Колбы плоскодонные конические разной вместимости (50, 100, 1000 см ³)	ГОСТ 25336-82
Марля медицинская	ГОСТ 9412-93
Микропробирки эппендорф (стерильные, 1,5–2 см ³)	
Наконечники пластиковые объемом 20–200, 100–1000 мм ³	
Ножницы медицинские	ГОСТ 21239-2005
Пробирки центрифужные полимерные (6, 35 см ³)	
Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, колбы	ГОСТ 1770–74
Стаканы химические (50 см ³)	ГОСТ 1770
Ступка фарфоровая	ГОСТ 9147-80
9. Реактивы	Нормативная документация
Ацетон, х.ч.	
Бычий сывороточный альбумин (БСА) для молекулярной биологии >98,0 %	
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709-72
Калий фосфат однозамещенный, х.ч.	ГОСТ 2493-75
Калий-натрий виннокислый 4-водный, ч.д.а	ГОСТ 5845-79
Кислота соляная концентрированная, х.ч.	
Медь (II) сернокислая 5-водная, ч.д.а	ГОСТ 4165-78
Натрия гидроокись, раствор с массовой концентрацией 1,0 моль/дм ³ (1 н)	
Натрий хлорид, х.ч.	
Натрий углекислый безводный, х.ч.	ГОСТ 83-79
Натрий фосфат двузамещенный, х.ч.	ГОСТ 2493-75
Раствор физиологический 0,9 % (изотонический, стерильный)	
Стандарт титры для приготовления образцовых буферных растворов для рН-метрии	ГОСТ 8.135 ГСИ
Фенольный реактив Фолина-Чокальтеу (для определения белка по Лоури), 2 н	

Могут быть использованы другие материалы и реактивы с характеристиками, не уступающие рекомендованным. При их применении следует руководствоваться инструкциями изготовителя.

ГЛАВА 4

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА ПЫЛИ И ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАКТИВОВ

10. Подготовка отобранного на производстве образца ОП включает последовательные:

дополнительное измельчение в кофемолке или истирание в фарфоровой ступке;

стерилизацию образца пыли путем двукратной обработки по 1 часу при температуре 56 °С в регулируемой водяной бане или в суховоздушном инактиваторе с периодическим перемешиванием.

Подготовленный образец пыли в закрытом виде хранят при температуре 4–8 °С в холодильнике.

11. Приготовление экстрагирующего насыщенного водно-солевого раствора по Соса [7] (далее — ВСРС): в мерную колбу объемом 1000 см³ вносят 50 г натрия хлорид, 3,63 г калия фосфат однозамещенного, 4,31 г натрия фосфат двузамещенного, добавляют дистиллированную воду до метки, закрывают пробкой и перемешивают до полного растворения вещества.

Раствор стабилен в течение 7 сут при комнатной температуре.

12. Приготовление 1 н водного раствора натрия гидроокиси: в мерную колбу объемом 100 см³ вносят 4,0 г натрия гидроокиси, добавляют дистиллированную воду до метки, закрывают пробкой и перемешивают до полного растворения вещества.

ГЛАВА 5

ЭКСТРАГИРОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СУБСТАНЦИЙ ИЗ ОБРАЗЦА ПЫЛИ В ВОДНО-СОЛЕВОЙ РАСТВОР СОСА

13. Упрощенный вариант метода экстракции в ВСРС, позволяющий получить экстракт из ОП с содержанием белка не более 4–6 мг/см³, достаточного для его использования в аллергодиагностике, в следующей постановке.

14. Экстрагирование подготовленного образца ОП:

14.1 готовят пробу суспензии пыли, смешивая в стеклянном стакане (колбе) в соотношении 1:10 взвешенного количества подготовленного образца ОП (1,00±0,01 г) с ВСРС (10 см³);

14.2 экстрагируют пробу в течение 1-х сут в термостате (37 °С) и затем 3 сут в холодильнике при температуре 6–8 °С при периодическом/постоянном перемешивании.

15. Очистка, характеристика и хранение экстракта:

15.1 суспензию пыли после экстракции переливают в уравновешенных объемах в полимерные центрифужные пробирки (ПЦП на 6 см³) и центрифугируют при 6000 об/мин в течение 20 мин, отбирают супернатанты в чистые ПЦП и подвергают повторному центрифугированию при 6000 об/мин в течение 30 мин, супернатанты отбирают в стеклянный стакан и перемешивают;

15.2 количественно характеризуют экстракт по содержанию белка (в мг/см³), определяемого фотометрическим методом Лоури при длине волны 750 нм, используя для построения градуировочного графика бычий сывороточный альбумин согласно [5];

15.3 экстракт разливают по 1–2 см³ в микропробирки эппендорфы или ампулы и в закрытом виде хранят при температуре -18–20 °С в морозильнике без применения консерванта.

ГЛАВА 6

ПОЛУЧЕНИЕ ИЗ ОБРАЗЦА ПЫЛИ ЭКСТРАКТА С ВЫСОКИМ СОДЕРЖАНИЕМ БЕЛОКСОДЕРЖАЩИХ СУБСТАНЦИЙ

16. Вариант метода экстрагирования биологически активных субстанций пыли в ВСРС с последующим их концентрированием и выделением позволяет получить экстракт из ОП с более высоким содержанием белоксодержащих субстанций, требуемый для экспериментального обоснования ПДК_{врз} ОП по белку, в следующей постановке.

17. Экстрагирование подготовленного образца ОП:

17.1 готовят 4-е параллельные пробы суспензии пыли в ВСРС аналогично, приведенному в п. 14.1;

17.2 помещают стаканы с суспензией ОП в ультразвуковую ванну и проводят дезинтеграцию ультразвуком мощностью 75–100 Вт и частотой 18–22 кГц в течение 30 мин;

17.3 экстрагируют пробы суспензии пыли в течение 1 сут в термостате (37 °С) и затем 3 сут в холодильнике при температуре 6–8 °С при периодическом/постоянном перемешивании.

18. Концентрирование и осаждение белкового преципитата:

18.1 переносят пробы суспензии пыли из стеклянных стаканов (колб) в полимерные центрифужные пробирки (ПЦП на 35 см³) в уравновешенных объемах и центрифугируют при 6000 об/мин в течение 30 мин;

18.2 супернатанты параллельных проб отбирают и объединяют в одном стеклянном стакане, при перемешивании добавляют по каплям охлажденную концентрированную соляную кислоту, доводя постепенно рН до 4,0–4,5;

18.3 содержимое стаканов быстро переносят в уравновешенных объемах в чистые ПЦП и в течение 2-х ч выдерживают в холодильнике при температуре 4–6 °С, после чего пробирки с экстрактами центрифугируют при 8000 об/мин в течение 30 мин и супернатанты из ПЦП аккуратно удаляют.

19. Выделение растворимых белоксодержащих субстанций:

19.1 в каждую пробирку с полученным осадком белкового преципитата добавляют по 2 см³ охлажденного стерильного физиологического раствора и растворяют осадок, внося при перемешивании в каждую пробирку по каплям 1 н раствор натрия гидроксида, доводя рН до 7,2–7,4;

19.2 экстракты из пробирок объединяют в стеклянном стакане, перемешивают и доводят при необходимости рН до 7,2–7,4.

20. Количественная характеристика и хранение полученного экстракта аналогичны, приведенным в пп. 15.2–15.3.

21. Для получения белоксодержащих субстанций из не растворимых в воде видов органической промышленной пыли подбирают адекватные способы деструкции химической структуры основного вещества пыли, основанные на

кислотно-щелочном гидролизе прочных связей между элементарными звеньями поверхностных (межфибриллярных) и внутренних структур вещества, последующем концентрировании и осаждении белоксодержащих субстанций с использованием кислоты, растворении белкового преципитата раствором натрия гидроокиси.

22. Получение растворимых белково-антигенных комплексов из образцов не идентифицированной, сложной по составу или водонерастворимой с «жесткой» химической структурой основного вещества промышленной пыли, требующее разработку специальных методов, осуществляется специалистами республиканского унитарного предприятия «Научно-практический центр гигиены».

ГЛАВА 7

ПРИМЕНЕНИЕ ПОЛУЧЕННОГО ЭКСТРАКТА ИЗ ОБРАЗЦА НЕНОРМИРОВАННОЙ ПРОМЫШЛЕННОЙ ПЫЛИ

23. Полученный экстракт из образца промышленной органической пыли используется в аллергодиагностике в качестве тест-аллергена, в т. ч. в дозе по 100–300 мкг/см³ по белку при постановке комплекса доступных специфических клеточных и серологических методов *in vitro* [2–4].

Установление положительных результатов аллергологического тестирования обследуемого работника с использованием полученного экстракта из конкретного образца пыли является подтверждением этиологии этой пыли в развитии аллергии у данного работника и доказательством профессионального генеза аллергического заболевания.

24. В экспериментальных исследованиях по гигиеническому нормированию содержания ОП в воздухе рабочей зоны по белку полученный из образца пыли экстракт или растворимый белково-антигенный комплекс используют согласно утвержденной методологии [6].

Приложение
к инструкции по применению
«Метод получения из
промышленной пыли экстракта для
диагностики аллергической
патологии и гигиенического
нормирования»
(Справочное)

Список использованных источников

1. Метод отбора образцов промышленной пыли для лабораторных исследований : инструкция по применению: утв. 28.01.2021 № 003-1220 / В. В. Шевляков [и др.] ; М-во здравоохран. Респ. Беларусь, Респ. науч.-практ. центр гигиены. – Минск, 2021. – 9 с.
2. Методы лабораторной специфической диагностики профессиональных аллергических заболеваний химической этиологии : метод. рекомендации / М-во здравоохранения СССР ; под ред. О. Г. Алексеевой. – М., 1980. – 27 с.
3. Новик, Г. А. Механизмы аллергических реакций и методы аллергообследования в клинической практике : учеб.-метод. пособ. / Г. А. Новик ; под ред. И. М. Воронцова. – СПб. : Изд-е ГПМА, 2004. – 76 с.
4. Новиков, Д. К. Клиническая иммунопатологии и аллергологии / Д. К. Новиков, П. Д. Новиков. – М. : Мед. литература, 2009. – 448 с.
5. Определение концентрации белка методом Lowry в модификации Петерсона [Электронный ресурс] // Сайт Researchgate.net. Страница Aliaksandr Y. Kazlou. – Режим доступа: https://www.researchgate.net/publication/336832261_Opredelenie_koncentracii_belka_metodom_Lowry_v_modifikacii_Petersona_Determination_of_protein_concentration_by_the_Lowry_method_in_the_Peterson_modification.
6. Требования к постановке токсиколого-аллергологических исследований при гигиеническом нормировании белоксодержащих аэрозолей в воздухе рабочей зоны : метод. указания 11-11-10 РБ-02 / М-во здравоохран. Респ. Беларусь ; разработ.: В. В. Шевляков [и др.] // Сб. офиц. док. по медицине труда и производств. санитарии / Респ. центр гигиены, эпидем. и обществ. здоровья, Респ. науч.-практ. центр гигиены ; под общ. ред. В. П. Филонова, С. М. Соколова. – Минск : ПЧУП «Бизнесофсет», 2004. – Ч. XIV. – С. 4–49.
7. Фрадкин, В. А. Диагностические и лечебные аллергены / В. А. Фрадкин. – М. : Медицина, 1990. – 284 с.