

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель

Министра здравоохранения – Главный
государственный санитарный врач
Республики Беларусь



И.В. Гаевский

« 1 » *января* 2015 г.

Регистрационный № *020-1275*

ИММУНО- И АЛЛЕРГОДИАГНОСТИКА ПРОФЕССИОНАЛЬНЫХ
АЛЛЕРГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ У РАБОТНИКОВ,
КОНТАКТИРУЮЩИХ С ПРОМЫШЛЕННЫМИ ШТАММАМИ
МИКРООРГАНИЗМОВ-ПРОДУЦЕНТОВ

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: Республиканское унитарное
предприятие «Научно-практический центр гигиены»

АВТОРЫ: к.м.н., доцент Филонюк В.А., д.м.н., профессор Шевляков
В.В., к.б.н. Эрм Г.И., к.м.н., доцент Рыбина Т.М., к.м.н. Кардаш О.Ф.,
к.м.н. Чернышова Е.В., к.м.н. Соболев Ю.А., Буйницкая А.В.

Минск, 2015

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра –
Главный государственный
санитарный врач
Республики Беларусь

_____ И.В. Гаевский
08.12.2015
Регистрационный № 020-1215

**ИММУНО- И АЛЛЕРГОДИАГНОСТИКА ПРОФЕССИОНАЛЬНЫХ
АЛЛЕРГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ У РАБОТНИКОВ,
КОНТАКТИРУЮЩИХ С ПРОМЫШЛЕННЫМИ ШТАММАМИ
МИКРООРГАНИЗМОВ-ПРОДУЦЕНТОВ**

инструкция по применению

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

АВТОРЫ: канд. мед. наук, доц. В.А. Филонюк, д-р мед. наук, проф.
В.В. Шевляков, канд. биол. наук Г.И. Эрм, канд. мед. наук, доц. Т.М. Рыбина,
канд. мед. наук О.Ф. Кардаш, канд. мед. наук Е.В. Чернышова, канд. мед. наук
Ю.А. Соболев, А.В. Буйницкая

Минск 2015
ГЛАВА I

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

1. В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложены методы клинической и лабораторной иммуно- и аллергодиагностики профессиональных аллергических заболеваний у работников, подвергающихся производственному воздействию аэрозолей промышленных штаммов микроорганизмов-продуцентов (далее — работники), позволяющие получить сопоставимые и достоверные результаты при оптимальном объеме исследований с минимальными материальными затратами. Методы, изложенные в настоящей инструкции, могут быть использованы в комплексах медицинских услуг, направленных на диагностику и медицинскую профилактику профессиональных аллергических заболеваний.

2. Разработка настоящей инструкции обусловлена широким промышленным производством микроорганизмов-продуцентов (далее — МО) (дрожжеподобные и плесневые грибы, бактерии и др.) и микробных препаратов на их основе (далее — МП), их применением в различных отраслях народного хозяйства.

Основные направления промышленной и медицинской биотехнологии основаны на использовании различных видов и родов штаммов и серотипов селективных или мутантных (полученных методом генной инженерии) МО в качестве пробиотических пищевых препаратов, продуцентов белка (биомасса, кормовые добавки), биологически активных веществ (амино-, протео-, пекто-, целлюлолитические и другие ферменты, разнообразные антибиотики, аминокислоты, витамины и другие), микробиологических препаратов для защиты (энтомопатогенные) и повышения урожайности (азотфиксирующие) сельскохозяйственных культур, дрожжевых продуктов, препаратов выщелачивания и концентрирования металлов, защиты окружающей среды от загрязнений, деградации токсических отходов, увеличения добычи нефти и т. д. МО широко используют в мясомолочной промышленности, хлебопекарном и прочих производствах.

Наряду с положительным эффектом применения продуктов современной биотехнологии при производстве и использовании МО и МП возможно загрязнение ими производственной среды, выделение в воздух рабочей зоны с вредным воздействием на здоровье работников.

Промышленные штаммы МО не обладают острой токсичностью, но проявляют в экспериментах за счет мультигетероантигенности полисахариδο-белковых комплексов в основном сильную или выраженную сенсибилизирующую способность (1–2 класс аллергенной опасности), что обуславливает высокий риск развития профессиональной аллергической и производственно обусловленной иммунозависимой патологии у работников. Действительно, при ингаляционном поступлении МО или МП в организм работников при производстве и применении в основном формируются аллергические и иммунотоксические эффекты. Причем у работников биотехнологических производств установлена значительная выраженность и распространенность сенсибилизации (73,7–88,6% в зависимости от вида МО) в основном полимикробной этиологии, сопровождаемая высокой частотой субъективных и объективных проявлений аллергического процесса.

3. Диагностика профессиональной микробной аллергии у работников основана на клиническом уточнении аллергической природы заболевания и определении причинно-значимых микробных аллергенов.

Для определения в организме аллергических процессов микробной этиологии в методах клинической и лабораторной аллергодиагностики используют полный антиген микроорганизма — стандартизованный растворимый тест-аллерген в виде коммерческих диагностических препаратов с гарантированной специфичностью и активностью. Однако такие препараты производят только для ограниченного круга, наиболее распространенных видов микроорганизмов, и для большинства промышленных штаммов микроорганизмов-продуцентов они в основном отсутствуют. Это обосновывает настоятельную необходимость получения в условиях оснащенных лабораторий организаций здравоохранения тест-аллергена из конкретного промышленного штамма МО (или нескольких МО), с которым работник с установленной аллергопатологией имеет постоянный производственный контакт, и его использования для специфической аллергодиагностики.

4. Настоящая инструкция предназначена для врачей-специалистов организаций здравоохранения, осуществляющих медицинское обеспечение работников при прохождении ими периодических медицинских осмотров, а также врачей-специалистов иных организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам, страдающим профессиональными заболеваниями.

ГЛАВА 2 ОБЩЕКЛИНИЧЕСКОЕ И АЛЛЕРГОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

5. Общеклиническое и аллергологическое исследование работников с подозрением профессиональной аллергопатологии выполняют в соответствии с клиническими протоколами диагностики и лечения лиц с аллергическими заболеваниями, утвержденными приказом Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 19 мая 2005 г. № 274.

6. При аллергологическом исследовании работника особое внимание обращают на выявление отягощенного наследственного и собственного аллергологического анамнеза, установление ведущих клинических симптомов и диагноза аллергопатологии, их взаимосвязь с профмаршрутом и возможную производственную обусловленность (по данным санитарно-гигиенической характеристики условий труда работника, выданной территориальным центром гигиены и эпидемиологии).

7. Установление согласно санитарно-гигиенической характеристики профессионального контакта пациента с промышленными штаммами МО, на которые имеются стандартизованные коммерческие тест-аллергены, зарегистрированные в Республике Беларусь в установленном законодательством порядке, осуществляется постановкой специфических кожных тестов (прик-тест

или скарификационная проба) в соответствии с инструкцией по применению, прилагаемой к соответствующим диагностическим аллергенам.

8. Положительные результаты кожного тестирования с тест-аллергеном промышленного штамма МО являются объективным подтверждением профессионального характера аллергического заболевания работника.

9. При расхождении результатов кожного тестирования и данных анамнеза и санитарно-гигиенической характеристики условий труда обследование дополняют постановкой провокационных проб: назальной (при клинических проявлениях ринита), конъюнктивальной (для специфической диагностики конъюнктивита) или ингаляционной (для диагностики респираторной аллергии) с учетом возможных противопоказаний.

10. В случае невозможности постановки кожных и провокационных проб пациенту (тяжелое состояние, сопутствующие заболевания, невозможность отмены фармпрепаратов перед обследованием) определяют специфические IgE-антитела при наличии соответствующих ИФА-наборов к конкретным промышленным штаммам МО.

11. С учетом анамнестических данных, характера симптомов экспозиции, реэкспозиции и элиминации проявления клинических аллергических симптомов вне производственных условий проводят дополнительно постановку кожных проб с предполагаемыми бытовыми, микробными, эпидермальными или пыльцевыми аллергенами с использованием стандартизованных коммерческих наборов аллергенов.

ГЛАВА 3

СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА С ТЕСТ-АЛЛЕРГЕНАМИ, ПОЛУЧЕННЫМИ ИЗ ПРОМЫШЛЕННЫХ ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ-ПРОДУЦЕНТОВ

12. При определении согласно санитарно-гигиенической характеристике условий труда профессионального контакта пациента с установленной формой аллергопатологии с теми промышленными штаммами МО, на которые отсутствуют коммерческие тест-аллергены, проводят их получение в условиях оснащенных лабораторий (диагностические и научно-практические центры, микробиологические лаборатории).

12.1. Для изготовления тест-аллергена используют чистую культуру конкретного промышленного штамма МО, полученную из Коллекции промышленных штаммов микроорганизмов-продуцентов или производственной микробиологической лаборатории предприятия, сопровождаемую актом отбора образца культуры, подтверждающий ее соответствие паспорту МО.

12.2. Производят тест-аллергены согласно методам, приведенным в приложении к настоящей инструкции.

12.3. Использование подобранных методов позволяет получить из культур грамположительных и грамотрицательных бактериальных, дрожжевых и плесневых грибковых МО растворимые тест-аллергены, обладающие достаточно

высокой специфичностью (до 94%), антигенной обособленностью и антигенной чистотой, которые могут применяться в лабораторной аллергодиагностике.

13. Для подтверждения профессиональной микробной этиологии аллергопатологии работников используют как минимум 2 известные клеточные аллергологические методики: реакции специфического лизиса лейкоцитов или повреждения гранулоцитов, реакция выброса миелопероксидазы гранулоцитами, реакция непрямой дегрануляции тучных клеток, реакция специфического НСТ-теста гранулоцитов крови, реакция бласттрансформации лимфоцитов в МТТ-тесте и т. п.

13.1. В методиках используют полученные бактериальные тест-аллергены в дозах по 300 и грибковых тест-аллергенов в дозах по 100 мкг с постановкой в 2–3 повторностях в сравнении с контрольными пробами со стерильным физиологическим раствором и неспецифическим коммерческим микробным тест-аллергеном одной таксономической принадлежности с МО.

13.2. При производственном контакте работника с несколькими штаммами МО проводят лабораторную аллергодиагностику с соответствующими полученными из них тест-аллергенами.

Приложение
к Инструкции по применению «Иммуно- и
аллергодиагностика профессиональных
аллергических заболеваний у работников,
контактирующих с промышленными
штаммами микроорганизмов-продуцентов»

ОБЯЗАТЕЛЬНОЕ

МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ ТЕСТ-АЛЛЕРГЕНОВ ИЗ
ПРОМЫШЛЕННЫХ ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ-ПРОДУЦЕНТОВ

1. Общие требования к постановке методов.

1.1. нормативные ссылки.

ГОСТ 12.1.004-91	Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования.
ГОСТ 12.1.005–88	Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны
ГОСТ 12.2.003-91	Система стандартов безопасности труда. Оборудование производственное. Общие требования безопасности.
ГОСТ 12.1.007–76	Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности
ГОСТ 12.1.018–93	Система стандартов безопасности труда. Пожаро-взрывобезопасность статического электричества. Общие требования.
ГОСТ 12.3.002–75	Система стандартов безопасности труда. Процессы производственные. Общие требования безопасности.
СП 17-129 РБ 2000	Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности и гельминтами
ГОСТ OIML R 76-1–2011	Государственная система обеспечения единства измерений. Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания.
ГОСТ 24104-2001	Весы лабораторные. Общие технические требования.
ГОСТ 19881-74	Анализатор потенциометрический с погрешностью измерений рН ±0,1 (рН-метр).
ГОСТ 28498-90	Термометры жидкостные стеклянные. Общие технические требования. Методы испытаний.
ГОСТ 1770–74 (ИСО 1042–83, ИСО 4788–80)	Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия.

ГОСТ 29227-91	Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования.
ГОСТ 25336-82Е	Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры
ГОСТ 12026-76	Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия.
ГОСТ 5556-81	Вата медицинская гигроскопичная.
ГОСТ 1172-93 (СТБ 2144-2010)	Бинты марлевые медицинский. Технические условия.
ГОСТ 6709-72	Вода дистиллированная. Технические условия.

1.2. Средства измерений, испытательное и вспомогательное оборудование, реактивы и материалы.

1.2.1. Средства измерений, испытательное и вспомогательное оборудование: анализатор потенциометрический (рН-метр) с диапазоном измерений 0–14 и погрешностью измерений $\pm 0,1$ — по ГОСТ 19881; весы лабораторные — по ГОСТ OIML R 76-1 — высокого класса точности с наибольшим пределом взвешивания не менее 200 г и погрешностью не более 0,01 г; дезинтегратор ультразвуковой типа «РК 103 Н»; ультрацентрифуга роторная; рефрижераторная ультрацентрифуга роторная; термостат электрический суховоздушный с автоматическим терморегулятором до 50°C, позволяющий поддерживать заданную температуру с погрешностью $\pm 1^\circ\text{C}$ — по ТУ 64-1-1382-72; термометр технический жидкостный с ценой деления 1°C и диапазоном от -50 до +400°C — по ГОСТ 28498; дозаторы пипеточные — по ГОСТ 29227; дозаторы пипеточные типа ПЛ или варипипетки на 0,02–0,2; 1,0–5,0 см³; флаконы стеклянные — по ГОСТ 25336; холодильник бытовой, морозильная камера — по ГОСТ 16317; мешалка магнитная;

1.2.2. Реактивы и материалы:

вода дистиллированная — по ГОСТ 6709; водный раствор калия гидроокиси с массовой концентрацией 1%; водный раствор уксусной кислоты с массовой концентрацией 50%; натрий хлорид, х.ч.; калий фосфат однозамещенный, х.ч; натрий фосфат двузамещенный; спирт этиловый ректифицированный — по СТБ 1334; раствор физиологический (изотонический, стерильный); марля медицинская — по ГОСТ 9412; вата медицинская гигроскопическая — по ГОСТ 5556.

Могут быть использованы другие средства измерения и вспомогательные устройства с метрологическими и техническими характеристиками, не уступающими рекомендуемым, а также реактивы не ниже указанной чистоты.

1.3. Требования безопасности и требования к квалификации операторов.

1.3.1. Требования безопасности: при выполнении работ персонал должен знать и строго соблюдать на рабочем месте требования:

электробезопасности (ГОСТ 12.2.003);

пожарной безопасности (ГОСТ 12.1.004);

техники безопасности при работе в микробиологической и токсикологической лаборатории (СП 17-129 РБ 2000);

техники безопасности, изложенные в эксплуатационных документах на средства измерений и оборудование, применяемые при проведении измерений.

Работы с микроорганизмами-продуцентами и готовыми формами микробных препаратов, агрессивными реактивами должны производиться персоналом в соответствии с требованиями охраны труда, в спецодежде (медицинский халат, шапочка) с использованием индивидуальных средств защиты кожи (латексные перчатки) и органов дыхания (респираторы типа «Лепесток» или марлевые повязки).

1.3.2. Требования к квалификации оператора: к выполнению измерений могут быть допущены лица, имеющие высшее или среднее специальное образование по профилю выполняемых работ, освоившие выполнение всех операций, предусмотренных методом.

1.4. Условия выполнения измерений.

При постановке методов 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;

напряжение питающей сети — (230±10) В;

частота переменного тока — (50±0,4) Гц.

Помещения для измерений должны быть оснащены приточно-вытяжной вентиляцией и подводкой воды.

2. Метод получения бактериальных тест-аллергенов.

2.1. Получение суспензии бактерий.

Выращенную на скошенной плотной питательной среде культуру конкретного промышленного штамма бактерий смывают с косяков 1 см³ стерильного физиологического раствора с последующим объединением проб в 1 пробирку в общем объеме до 8 см³ в максимально возможной концентрации бактериальных клеток (10^{11–12} кл/см³ и более).

2.2. Инактивация и разрушение бактериальных клеток.

Полученную суспензию бактерий инактивируют с одновременным разрушением мембран клеток дезинтегрированием ультразвуком мощностью 140–160 Вт, частотой 28–35 кГц в течение 30 мин.

2.3. Щелочная экстракция.

Инактивированную бактериальную культуру разливают дозатором по 1 см³ в пластиковые центрифужные пробирки, добавляют в каждую по 6 см³ 1% водного раствора КОН и экстрагируют в течение 1 сут при комнатной температуре с регулярным перемешиванием.

2.4. Получение экстракта из бактериальной культуры.

После завершения экстракции пробирки с бактериальной культурой центрифугируют при 10000 об./мин и 5°С в течение 1 ч, затем супернатант-экстракт из пробирок дозатором переносят в «чистые» пластиковые центрифужные пробирки.

2.5. Выделение из экстракта белоксодержащих антигенных фракций.

В пробирки с экстрактом вносят 50% водный раствор уксусной кислоты в количестве из расчета по 0,2 мл на 1 мл экстракта, перемешивают и в течение 2 ч выдерживают в холодильнике при температуре от 5 до 6°C, затем пробирки с экстрактом центрифугируют при 6000 об./мин. в течение 30 мин, супернатант аккуратно удаляют, а полученные белковые преципитаты (осадки) растворяют, дозируя в каждую пробирку по 5 см³ стерильного физиологического раствора, измеряют рН и доводят при необходимости до 7,2–7,4, подщелачивая содовым раствором.

2.6. Стандартизация полученного бактериального тест-аллергена.

Методом Лоури определяют содержание белка в полученном бактериальном экстракте-аллергене и стандартизируют его в международных единицах белкового азота PNU (1 единица белкового азота PNU соответствует 0,06 мкг белка).

Бактериальные тест-аллергены разливают по 1–2 см³ в микропробирки и хранят в морозильнике при температуре -18°C без добавления консервантов.

3. Метод получения грибковых тест-аллергенов.

3.1. Подготовка дрожжевых клеток.

Используют хлебопекарные сушеные активные дрожжи производственных штаммов *Saccharomyces cerevisiae*.

Сухие дрожжевые клетки предварительно подвергают механической дезинтеграции путем размола 5 г в кофемолке в течение 15 мин.

3.2. Приготовление раствора Соса.

Для экстрагирования из дрожжевых клеток полисахаридо-белковых антигенных субстанций используют щелочной солевой раствор Соса в следующем составе: натрий хлорид — 50 г, калий фосфат однозамещенный — 3,63 г, натрий фосфат двузамещенный — 14,31 г, растворенные в 1 л стерильной дистиллированной воды.

3.3. Инактивация и разрушение дрожжевых клеток.

Тонкодисперсную сухую биомассу дрожжевых грибов инактивируют с одновременным разрушением мембран клеток следующим образом:

1 г измельченной биомассы сухих дрожжей вносят в колбу (100 см³), приливают отмеренные в мерном цилиндре 30 см³ раствора Соса;

лизируют дрожжевые клетки путем четырехкратного замораживания и оттаивания: суспензию клеток в колбе тщательно перемешивают, помещают (на 5–8 ч) в морозильную камеру при температуре -22°C до полного замораживания, затем быстро оттаивают, помещая колбы в теплую воду, повторяют данную процедуру четырежды;

проводят дополнительную ультразвуковую дезинтеграцию дрожжевых клеток и их внутриклеточных структур: помещают колбу с суспензией в ультразвуковую ванну с водой на 1 ч в условиях воздействия ультразвука с параметрами 140–150 Вт, 35 кГц при постоянном охлаждении (добавление льда).

3.4. Экстрагирование полисахаридо-белковых антигенных субстанций.

Колбу с биомассой выдерживают в течение 4 сут в холодильнике при температуре от 4 до 6°C при регулярном перемешивании содержимого (через каждые 3–4 ч в дневное время).

3.5. Выделение из экстракта дрожжевой биомассы растворимых полисахариδο-белковых комплексов.

Содержимое колбы после завершения экстракции переносят в центрифужные полимерные пробирки и центрифугируют при 6000 об./мин. в течение 15 мин. Супернатант-экстракт из пробирок дозатором переносят в «чистые» пластиковые центрифужные пробирки и повторно центрифугируют при 3000 об./мин. в течение 1 ч, после чего супернатант-экстракт-аллерген отделяют от осадка.

3.6. Стандартизация полученного тест-аллергена.

Методом Лоури определяют содержание белка в полученном экстракте-аллергене и стандартизируют его в международных единицах белкового азота PNU. Полученные тест-аллергены содержат от 2,2 до 3,6 мг/см³ белка (до 60000 ед. PNU). Измеряют pH полученного экстракта-аллергена и при необходимости доводят его до 7,2 ед.

Дрожжевой тест-аллерген разливают по 1–2 см³ в микропробирки и хранят в морозильнике при температуре -18°C без добавления консервантов.