МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР
ГЛАВНОЕ САНЭПИДУПРАВЛЕНИЕ

СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АЛЛЕРГЕННОЙ АКТИВНОСТИ ПОЛИМЕРНЫХ МАТЕРИАЛОВ, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫХ К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ В СТРОИТЕЛЬСТВЕ ЖИЛЫХ И ОБЩЕСТВЕННЫХ ЗДАНИЙ

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

МОСКВА
1978 г.

gost.e-ecolog.ru

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР
ГЛАВНОЕ САНЭПИДУПРАВЛЕНИЕ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Главного государственного санитарного врача СССР

В. Е. Ковшило

« 8 » декабря 1977 года

№ 1806—77

СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АЛЛЕРГЕННОЙ АКТИВНОСТИ ПОЛИМЕРНЫХ МАТЕРИАЛОВ, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫХ К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ В СТРОИТЕЛЬСТВЕ ЖИЛЫХ И ОБЩЕСТВЕННЫХ ЗДАНИЙ

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

МОСКВА
1978 г.

Методические рекомендации

составлены кандидатом медицинских наук Г. П. Трубицкой под редакцией профессора А. Н. Бокова и профессора А. И. Полякa

В методических рекомендациях описан разработанный на кафедре коммунальной гигиены РГМИ совместно с отделом иммунитета и аллергии ЦНИЛ способ определения аллергенной активности полимерных материалов, используемых в строительстве жилых и общественных зданий. Подробно изложены специфические методы аллергодиагностики in vitro и in vivo, рекомендуемые для выявления сенсибилизации организма.

Данные методические рекомендации направлены не столько на диагностику развившейся аллергической реакции, сколько на выявление наличия и степени сенсибилизации организма, как основного фактора, определяющего опасность развития явных аллергических реакций в ответ на воздействие комплексов химических веществ, мигрирующих из полимерных строительных материалов.

Методические рекомендации предназначаются для специалистов токсиколого-гигиенических лабораторий и практических врачей.

Бурное развитие промышленности, в том числе химической, широкая химизация народного хозяйства и быта неизбежно приводит к проникновению в среду обитания человека огромного числа различных химических веществ, многие из которых обладают аллергенными свойствами. с чем все чаще связывают рост числа случаев аллергических реакций и заболеваний (А. Д. Адо, О. Г. Алексеева, 1969; Е. С. Брусиловский, 1972; С. Я. Чикин и соавт., 1973).

В связи с растущими масштабами развития химической промышленности стала очевидной необходимость получения сведений о роли полимерных материалов, используемых в строительстве и быту, как фактора аллергизации организма. Отсутствие в литературе сведений о факторе сенсибилизации, связанном с ингаляционным воздействием сложных комплексов химических веществ, поступающих в организм в концентрациях и режиме, характерных для эксплуатации жилых и общественных зданий сделало необходимым разработку методических подходов по изучению аллергенного эффекта полимерных материалов, чему и посвящены настоящие методические разработки.

Изучение аллергенной активности полимерных материалов в принципе возможно как в натурных, так и в моделированных условиях.

Данные, полученные в натурных наблюдениях, отображают то положение, которое имеет место в практических условиях. Особенно ценно то, что подобные наблюдения осуществляются непосредственно на людях.

Однако наблюдения в натурных условиях, чаще при одновременном контакте сразу с несколькими полимерными материалами, а возможно влиянии и других неучтенных источников, не позволяют оценить сенсибилизирующее действие каждого из полимерных материалов в отдельности. Особен-

но трудно приспособить натурные условия для проведения исследований, связанных с разработкой новых полимерных строительных материалов в связи с необходимостью апробации многих опытных образцов.

Отличительной особенностью изучения аллергенного эффекта полимерных материалов в моделированных условиях является возможность изучения как отдельных образцов, так и всевозможных сочетаний материалов на экспериментальных животных с последующей экстраполяцией полученных результатов на человека.

I. ИЗУЧЕНИЕ АЛЛЕРГЕННОЙ АКТИВНОСТИ ПОЛИМЕРНЫХ МАТЕРИАЛОВ В НАТУРНЫХ УСЛОВИЯХ

1. 1. Подбор объектов исследования

Обитаемый объект «опыт» (жилой дом, квартира, лечебное или детское учреждение, общественное здание, учреждение торговой сети и пр.) подбирается из числа зданий, выстроенных с использованием тех или иных полимерных материалов; при этом принимается во внимание наличие и полимерной мебели.

Объект «контроль», также обитаемый, подбирается аналогичным по назначению, внутренней планировке, месту расположения в черте населенного пункта и прочим условиям. В объекте «контроль» не должно иметь места использование полимерных строительных материалов, в том числе и полимерной мебели.

1.2. Аллергологический анамнез

Выявляется анамнез как собственный (наличие аллергических проявлений в прошлом), так и семейный (наличие аллергических реакций и заболеваний у родственников по нисходящей, восходящей и боковым линиям). Особое внимание должно быть уделено выяснению контакта с химическими веществами и полимерными материалами.

1.3. Санитарно-химический контроль за состоянием воздушной среды

Приступая к санитарно-химическому исследованию в объекте «опыт», необходимо хорошо ознакомиться с рецептурой и

технологией изготовления использованных полимерных материалов, что позволяет выяснить перечень веществ, могущих мигрировать из него в воздушную среду. Целесообразно определять вещества наиболее летучие и обладающие аллергенным действием. Количество анализов на каждое вещество следует принимать таким, чтобы в зависимости от разброса данных можно было бы получить достоверные результаты; обычно требуется выполнение 6 — 12 анализов. При отрицательных результатах достаточно 3—4 анализов.

Одновременно санитарно-химическое исследование состояния воздушной среды осуществляется и в объекте «контроль» с определением тех же веществ, что и в объекте «опыт».

1.4. Выявление аллергизации организма

Для выявления наличия и степени аллергизации организма, обусловленной контактом с химическими веществами, поступающими ингаляционным путем, следует использовать специфические методы аллергодиагностики с аллергенами in vitro. Для определения антител гуморальных — реакцию пассивной гемагглютинации (РПГА по О. Г. Алексеевой с соавт., 1971), клеточных — реакцию специфической агломерации лейкоцитов (РСАЛ ло И. Е. Сосонкину, 1968), реакцию усиления пиронинофилии лейкоцитов (РУПЛ по А. М. Фиалковскому, 1974) или другие наиболее чувствительные и воспроизводимые реакции. Все указанные реакции (РПГА, РУПЛ и РСАЛ) в клинических условиях могут быть поставлены в любой период заболевания как при явных клинических проявлениях, так и для выявления латентной стадии химических аллергозов.

Для суждения о сенсибилизирующем воздействии газовоздушной смеси, обусловленной использованием полимерных строительных материалов, при постановке указанных или других специфических реакций in vitro целесообразнее использовать весь комплекс водорастворимых веществ, могущих мигрировать из материалов (см. раздел 6 — Приготовление аллергенов, стр. 15).

2. ИЗУЧЕНИЕ АЛЛЕРГЕННОЙ АКТИВНОСТИ ПОЛИМЕРНЫХ МАТЕРИАЛОВ В МОДЕЛИРОВАННЫХ УСЛОВИЯХ

Для определения аллергенного эффекта полимерных строительных материалов в моделированных условиях раз-

работан способ (А. Н. Боков, Г. П. Трубицкая, 1975), который характеризуется следующими положениями:

— получение в экспериментальных условиях воздуха, с качественными и количественными характеристиками химического загрязнения, которые в достаточной степени коррелируют с натурными условиями эксплуатации материала;

— изучение сенсибилизирующего действия химических веществ, мигрирующих в воздушную среду из полимерных строительных материалов, в эксперименте на морских свинках;

— режим затравки — ингаляционный круглосуточный непрерывный;

— продолжительность затравки — 30 суток;

— сроки тестирования — на 14 и 30 сутки;

— методы аллергодиагностики — специфические с гаптенами in vitro и in vivo.

Широкие возможности в реализации основных положений этого способа открывает использование методики исследования полимерных строительных материалов в моделированных условиях (А. Н. Боков, 1968) и предназначенной первоначально для изучения общетоксического действия их, которая позволяет:

— моделировать любые условия эксплуатации полимерных материалов;

— создавать любые режимы затравки и при необходимости варьировать их;

— изучать сенсибилизирующее действие как отдельных образцов, так и всевозможных сочетаний материалов, а также многослойных конструкций и т. д.

Сущность указанной методики заключается в моделировании ожидаемых условий эксплуатации материала в специальных камерах — генераторах. К числу моделируемых факторов относятся температура воздуха, кратность воздухообмена, насыщенность помещений полимерным материалом, при необходимости — влажностный режим и другие условия.

Наружный воздух после очистки при помощи специальной воздуходувной системы с необходимой объемной скоростью подается круглосуточно во все опытные и контрольные камеры-генераторы, температурный режим создается и поддерживается при помощи вложенных в обшивке камер-генераторов нагревательных элементов, терморегуляторов и магнитных пускателей; размер образца устанавливается в каждом случае в зависимости от ожидаемой насыщенности в

условиях эксплуатации материала и объема камеры-генератора. Последний регламентируется спецификой этапов исследования и должен быть не менее 100—200 л при осуществлении санитарно-химических исследований, 1000—1200 л — при проведении биологических исследований, в том числе при изучении сенсибилизирующего действия на организм полимерных строительных материалов. В процессе аллергологических исследований воздух из камер-генераторов подается в затравочные камеры объемом 100 л.

2.1. Условия эксперимента

Насыщенность, кратность воздухообмена, температура и пр. создаются в камерах-генераторах в зависимости от предполагаемого назначения и области применения материалов. Подопытным животным воздух подается из камер-генераторов объемом 1000 л, содержащих полимерные материалы, контрольным — из таких же камер-генераторов, но не содержащих материалов.

2.2. Санитарно-химический контроль за состоянием воздушной среды

На протяжении всего периода эксперимента осуществляется санитарно-химический контроль состава воздушной среды как в опытных, так и контрольных камерах-генераторах. Выбор определяемых веществ и установление количества анализов см. п. 1.3.

2.3. Выявление аллергизации организма

Наш опыт изучения более 20 различных наиболее распространенных полимерных строительных материалов в натурных и моделированных условиях позволяет рекомендовать для выявления сенсибилизации организма, обусловленной использованием полимерных материалов, методы специфической аллергодиагностики с гаптенами in vitro (например, РПГА, РУПЛ, РСАЛ) и in vivo (лишь в условиях эксперимента) — конъюнктивальный тест (Г. П. Трубицкая, 1977). Учитывая, что сенсибилизация организма под воздействием химических соединений, мигрирующих из полимерных строительных материалов, индуцируется преимущественно по замедленному типу, для экспресс диагностики можно использо-

вать лишь клеточные реакции с гаптенами in vitro и, в частности, как наиболее чувствительную из числа использованных нами — РУПЛ по А. М. Фиалковскому (1974).

При этом следует учитывать, что кожные пробы не при любых количественных и качественных характеристиках химических загрязнителей, мигрирующих из полимерных строительных материалов, дают информативные результаты, в связи с чем кожно-аллергические реакции могут использоваться лишь в комплексе с рекомендуемыми нами методами аллергодиагностики.

Ниже приводится подробное описание методов, рекомендуемых для выявления сенсибилизации организма, индуцированной химическими веществами при ингаляционном поступлении их в организм.

В приложении указан перечень и других методов аллергодиагностики, довольно часто используемых гигиенистами в процессе иммунологических исследований.

3. РЕАКЦИЯ УСИЛЕНИЯ ПИРОНИНОФИЛИИ ЛЕЙКОЦИТОВ ПО А. М. ФИАЛКОВСКОМУ

Принцип предложенного А. М. Фиалковским (1974) метода — РУПЛ состоит в определении разницы содержания РНК по (Brachet, 1940) в мазках крови, предварительно обработанной и необработанной предполагаемым аллергеном.

ТЕХНИКА ПОСТАНОВКИ РЕАКЦИИ

3.1. Препарат «опыт»

В парафинированную пробирку вносят 0,1 мл крови испытуемого, 0,1 мл аллергена и помещают в термостат при 37°С на 2 часа, периодически (через каждые 30 мин) слегка встряхивая. Затем готовят тонкий мазок, фиксируют его безводным этиловым спиртом (1—2 капли на мазок), а затем в жидкости Карнуа (10 мин), проводят через спирт (1—3 мин), промывают в дистиллированной воде (2—3 смены), окрашивают краской метилгрюнпиронин (10—20 мин), которую смывают дистиллированной водой (15 сек), хорошо сушат фильтровальной бумагой.

3.2. Препарат «контроль лейкоцитов»

В парафинированную пробирку вносят 0,1 мл крови испы-

туемого и 0,1 мл 3,8% раствора цитрата натрия. Остальное см. «препарат опыт».

3.3. Препарат «контроль аллергена»

В парафинированную пробирку вносят 0,1 мл крови интактного животного и 0,1 мл аллергена. Остальное как и в препарате «опыт».

3.4. Препарат «контроль окрашивания»

В парафинированную пробирку вносят 0,1 мл крови испытуемого и 0,1 мл аллергена. Помещают ее в термостат при 37°С на 2 часа. Готовят мазок, помещают его в раствор рибонуклеазы на 30 мин (в термостат при 37°С), тщательно промывают дистиллированной водой, окрашивают метилгрюнпиронином (10—20 мин) и быстро споласкивают дистиллированной водой. В данном препарате РНК отсутствовала.

3.5. Оценка результатов

В препаратах «опыт», «контроль лейкоцитов» и «контроль аллергена» содержание РНК оценивалось (в условных единицах на одну клетку) под микроскопом (увеличение 10х40) визуальным полуколичественным методом по формуле 1:

$$N = \frac{ax + by + cz}{100}. \qquad (1)$$

где N — содержание РНК (в условных единицах на одну клетку);

$a = 3$, $b = 2$, $c = 1$ — условные баллы интенсивности окраски, соответственно малиновое, красное и розовое окрашивание цитоплазмы и ядрышек (ядро окрашено в зеленый цвет);

x, y и z — количество клеток с соответствующей интенсивностью окраски;

100 — общее число подсчитанных клеток.

Ошибка измерения содержания РНК в клетках описанным способом составляет $\pm 10\%$.

Тест считается положительным, если содержание РНК в опыте (в условных единицах на 1 клетку) превышало таковое в контроле лейкоцитов и аллергена более, чем на 10%. От 11 до 20% — реакция слабо положительная (+), от 21 до 30% — реакция положительная (++), свыше 30% — реакция резко положительная (+++).

3.6. Приготовление реактивов

3.6.а. Растворы для получения красителя

Раствор 1: В процессе приготовления раствора краска предварительно промывается, для чего 100 мг краски метилгрюн растворяется в 20 мл дистиллированной воды и 20 мл хлороформа. Промывка повторяется до тех пор пока хлороформ не перестанет окрашиваться. При химически чистой краске, как правило, требуется лишь однократная промывка и после удаления хлороформа раствор готов к употреблению. При необходимости многократной промывки берется бо́льшая навеска краски; после окончательной промывки удаляется хлороформ, водный раствор краски фильтруется и высушивается на фильтре в термостате (при 37°С). Для приготовления рабочего раствора берется 100 мг высушенной краски и растворяется в 20 мл дистиллированной воды.

Раствор 2: 200 мг пиронина «Ж» растворить в 20 мл дистиллированной воды.

3.6.б. Буферный раствор

Раствор 3: 1,4 уксуснокислотного натрия на 100 мл дистиллированной воды.

Раствор 4: 0,58 мл кислоты уксусной (ледяной) на 100 $см^3$ дистиллированной воды.

Далее оба раствора (3 и 4) берутся в равных количествах, pH буфера должна быть 4,7—4,8.

3.6.в. Приготовление красителя

Берется по 8,8 мл растворов метилгрюн (1 раствор) и пиронина «ж» 2 (раствор), к этой смеси растворов добавляется до 25 мл дистиллированная вода и приливается 25 мл ацетатного буфера с pH=4,8.

3.6.г. Приготовление фиксатора Карнуа

Берется: 6 частей абсолютного спирта — 60 мл; 3 части хлороформа — 30 мл; 1 часть кислоты уксусной (ледяной) — 10 мл.

Фиксатор готовится перед употреблением, на холоде (составные его части, кроме кислоты уксусной ледяной, также хранятся на холоде). В процессе работы фиксатор должен находиться на холоде.

3.6.д. Раствор рибонуклеазы

Готовится в концентрации 0,01% — на 3,8% растворе цитрата.

3.7. Оборудование и посуда: микроскоп, весы аналитиче-

ские, лабораторные стаканчики объемом 200 и 50 мл, колбы мерные на 100, 50 и 10 мл, пипетки на 10 и 5 мл (количество посуды зависит от объема исследований).

3. 8. Реатив пиронин «Ж», краска метилгрюн, рибонуклеаза, кислота уксусная (ледяная), уксуснокислый натрий, хлороформ, абсолютный спирт, спирт 96°, химические аллергены.

4. РЕАКЦИЯ АГЛОМЕРАЦИИ ЛЕЙКОЦИТОВ ПО И. Е. СОСОНКИНУ

Принцип метода, предложенного в 1968 г., основан на использовании феномена склеивания (агломерации) лейкоцитов в цитратной крови по Флеку (1951).

Техника постановки реакции

4.1. В парафинированные пробирки вносят по 0,02 мл 3,8% раствора цитрата натрия (контроль). В опытные парафинированные пробирки в отличие от контрольных вносят аллерген, приготовленный на 3,8% растворе цитрата натрия (приготовление аллергена см. п. 6).

В пробирки (опытные и контрольные) вносят по 0,1 мл крови, взятой из пальца больного (у морской свинки — из ушной вены, у крысы — из хвостовой вены), используя каждый раз чистую пипетку. Количество опытных проб не должно превышать 3,4 (от одного испытуемого), так как длительное взятие крови может привести к перераспределению адгезивных лейкоцитов.

Далее пробы помещают в термостат при 37°С на 2 часа, слегка перемешивая через каждый час. После инкубации готовят толстую каплю на обезжиренном стекле. Высохший (при комнатной температуре) препарат окрашивают без фиксации 0,01% раствором метиленового синего в дистиллированной воде в течение 10 мин.

Под микроскопом с иммерсионной системой по диаметру капли подсчитывают 1000 лейкоцитов, отдельно учитывая те клетки, которые образуют агрегаты из 3 лейкоцитов и более.

4.2. Оценка результатов

Показателем агломерированных лейкоцитов служит процент склеившихся клеток. Проба считается положительной, если в пробе с аллергеном (опыт) показатель агломерации на

1/3 и более превышает показатель в контрольной пробе. Ошибка одного определения составляет ±10% показателя. Показатель контроля отражает уровень спонтанной лейкергии (агломерации) по Флеку, который может колебаться в разные сроки, в связи с чем его необходимо вычислять при каждой новой постановке пробы.

4.3. Оборудование и посуда: микроскоп, весы аналитические, пробирки парафинированные, микропипетки, предметные стекла, ванночки эмалированные.

4.4. Реактивы: цитрат натрия, аллергены.

5. РЕАКЦИЯ ПАССИВНОЙ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ ПО BOYDEN В МОДИФИКАЦИИ О. Г. АЛЕКСЕЕВОЙ С СОАВТОРАМИ

5.1. Реакцию начинают с приготовления эритроцитов

Применяют эритроциты барана, которые трижды отмывают физиологическим раствором и каждый раз центрифугируют по 5 мин при 2 тыс. об/мин. Третий раз следует центрифугировать эритроциты 15 мин. при 1,5 тыс. об/мин. Надосадочную жидкость, обычно совершенно прозрачную, удаляют, а из осадка эритроцитов готовят 2,5% взвесь на буферном растворе с pH=7,2, для чего к 4 мл буферного раствора добавляют 0,1 мл отмытых эритроцитов.

5.2. Приготовление раствора танина

Химически чистый танин взвешивают на аналитических весах (5 мг) и растворяют в 5 мл физиологического раствора, получая разведение 1:1000. Для получения разведения 1:30000 берут 2 мл полученного раствора (1:1000) и добавляют 58,0 мл буферного раствора с pH=7,2. Как правило, разведение танина готовят ex temporе.

5.3. Получение танизированных эритроцитов

Раствор танина (1:30000) в физиологическом растворе смешивают с равным объемом 2,5% взвеси отмытых эритроцитов. Смесь тщательно перемешивают и ставят на 10 мин в термостат при 37°С, затем центрифугируют, надосадочную жидкость удаляют и осадок трижды промывают буферным раствором с pH=7,2 или забуференным физиологическим раствором (1 мл фосфатного буфера и 100 мл физиологического раствора).

5.4. Приготовление нормальной кроличьей сыворотки (НКС)

Кроличью сыворотку перед употреблением инактивируют в водяной бане (или инактиваторе) в течение 30 мин при температуре 56—58°С и дважды адсорбируют на бараньих эритроцитах. Для адсорбции берут 0,2 мл отмытых бараньих эритроцитов, смешивают с 1 мл кроличьей сыворотки и ставят на 20 мин в термостат при 37°С. Затем взвесь центрифугируют, сыворотку отсасывают и, таким образом, вторично проводят адсорбцию. Разведение НКС 1 : 100 готовят на буферном растворе с pH=7,2.

5.5. Приготовление 2,5% взвеси танизированных эритроцитов

Промытый осадок танизированных эритроцитов растворяют в буферном растворе с pH=6,4, получая 2,5% взвесь танизированных эритроцитов, для чего берут 0,1 мл отмытых танизированных эритроцитов и прибавляют 4 мл буфера.

5.6. Адсорбция антигена на эритроцитах

2,5% смесь танизированных эритроцитов смешивают с равным объемом раствора антигена и ставят в термостат на 45 мин при температуре 37°С. Затем взвесь центрифугируют, осадок промывают НКС в разведении 1 : 100, вновь центрифугируют и осадок ресуспензируют 2,5% концентрации в НКС в разведении 1 : 100. Или как делают в ЦНИЛе РГМИ: промывают буфером с pH=7,2 или физиологическим раствором 3 раза и готовят 2,5 % взвесь сенсибилизированных эритроцитов в физиологическом растворе.

5.7. Подготовка сывороток опытных и контрольных животных

5.7.а. Сыворотки инактивируют в водяной бане в течение 30 мин при температуре 56—58°С, разрушая гетерогенные антитела (специфические антитела разрушаются при 70°С).

5.7.б. Сывортки истощают, для чего в каждую из них добавляют по две капли (0,1 мл), из расчета на 1 мл, цельных трижды отмытых бараньих эритроцитов и ставят все сыворотки на 1 сутки в холодильник.

5.8. Постановка реакции

Реакция ставится в полистироловых пластинах. Готовят два ряда разведений исследуемой сыворотки (опытных и контрольных животных) в НКС 1 : 100. Одновременно ставится три контроля: 2 — на эритроциты (5.8.а и 5.8.б) и 1 — на каждую опытную сыворотку (5.8.в).

5.8.а. 0,4 мл НКС+0,1 мл сенсибилизированных эритроцитов.

5.8.б. 04, мл НКС + 0,1 мл несенсибилизированных эритроцитов.

5.8.в. 0,4 мл опытной сыворотки + 0,1 мл несенсибилизированных эритроцитов.

5.9. Оценка результатов

Реакция считается положительной, если произошла полная агглютинация. В контроле сенсибилизированных и несенсибилизированных эритроцитов (5.8.а и 5.8.б) с разводящей жидкостью (НКС в разведении 1 : 100), а также в контроле сыворотки с несенсибилизированными эритроцитами (5.8.в) должно произойти оседание эритроцитов.

5.10. Приготовление реактивов

0,15 М Na_2HPO_4 — высушивают 3 дня в термостате при 37°С (в открытой посуде). Высушенные 26,707 г Na_2HPO_4 растворяют в дистиллированной воде и доводят до 1 л.

0.15 М KH_2PO_4 берут 20,418 г и также доводят до 1 л.

5.11. Приготовление физиологического раствора с pH=7,2

Физиологический раствор готовят на дистиллированной воде (850 мг NaCl + 100 мл дистиллированной воды) и добавляют по капле 30% раствора NaOH до получения pH=7,2.

5.12. Приготовление буферного раствора с pH=7,2

Для приготовления указанного буфера берут 100 мл физиологического раствора с pH = 7,2; 29,9 мл 0,15 М KH_2PO_4; 76,0 мл 0,15 М Na_2HPO_4.

5.13. Приготовление буферного раствора с pH=6,4

Для приготовления этого буфера берут: 100 мл физиологического раствора с pH=7,2; 67,7 мл 0,15 М KH_2PO_4; 32,2 мл 0,15 М Na_2HPO_4.

5.14. Оборудование и посуда: термостат, центрифуга, водяная баня (или инактиватор), полистироловые пласты, штатив, колбы на 200 и 50 мл, пробирки центрифужные, пипетки на 1 и 2 мл.

5.15. Реактивы: соли KH_2PO_4, Na_2HPO_4 и NaCl, аллергены.

6. ПРИГОТОВЛЕНИЕ АЛЛЕРГЕНОВ

Для приготовления аллергенов необходимо применять соединения химически чистые или содержащие лишь минимальное количество посторонних примесей. Многие промышленные химические аллергены имеют нестабильный состав, значительное количество веществ легко окисляется или осмоляется, в связи с чем стандартные растворы химических аллергенов лучше хранить в виде серии в ампулах, периодически контролируя их концентрацию. При работе с летучими соединениями нужно быстро, тщательно и желательно в течение всей инкубации, перемешивать их с биосубстратами.

Если химический аллерген нерастворим в воде, то в реакциях in vitro целесообразно использовать водорастворимые аллергены, имеющие общую групповую детерминанту (О. Г. Алексеева и соавт., 1976).

До введения в реакцию химического аллергена необходимо проверить степень его действия и подобрать дозу, не вызывающую цитотоксический и денатурирующий белок эффект.

Соблюдение перечисленных условий дает возможность использовать в серологических и клеточных реакциях in vitro различные химические соединения и обеспечивает специфичность и воспроизводимость реакций.

Таблица

Концентрации химических веществ в аллергенах

Наименование химического вещества	Концентрация химического вещества в аллергене, %			Растворитель
	РУПЛ	РСАЛ	РПГА	
Формальдегид	0,01	0,01	—	3,8% цитрат Na
Фталевый ангидрид	0,01	0,01	0,01	»
Малеиновый ангидрид	0,01	0,01	0,01	»
В-нафтиламин (аналог неозона «Д»)	0,005	0,005	0,005	»
I-аминогуанидин (аналог дифенилгуанидина)	0,01	0,01	0,01	»
Катапин	0,0001	0,0001	0,0001	»

Примечание: Для постановки РПГА в качестве растворителя используется физиологический раствор.

В таблице представлены концентрации химических веществ в аллергенах*, отработанных нами для постановки

* Аллергены готовились по способу Е. С. Брусиловского, Н. Р. Поляк и Г. М. Вольновой (1974).

клеточных и серологических реакций с отдельными веществами.

Постановка тех или иных специфических реакций с отдельными химическими веществами особенно целесообразна для выявления наиболее активных в аллергенном отношении веществ в целях разработки гигиенических мероприятий по снижению сенсибилизирующего воздействия полимерных строительных материалов для получения образцов, не обладающих аллергенным действием.

При постановке исследований как в натурных условиях с целью санитарной экспертизы материала (материалов) так и в моделированных при изучении комбинированного действия химических соединений, целесообразно использовать весь комплекс водорастворимых веществ, могущих мигрировать из материалов в воздушную среду.

Однако в качестве аллергенов, в зависимости от целей опытов могут быть использованы не только отдельные химические вещества, но и их комплексы.

Такие комплексы следует получать путем отбора проб воздуха на те или иные поглотительные жидкости в качестве которых могут быть использованы, например, следующие:

1. Физиологический раствор — для постановки РПГА;
2. 3,8% цитрат — для осуществления РУПЛ и РСАЛ;
3. Дистиллированная вода — для постановки конъюнктивальной пробы.

Отбор проб воздуха на все предполагаемые к использованию поглотительные жидкости осуществляется одновременно, в условиях соблюдения аналогичного режима (скорость и продолжительность отбора) в моделированных условиях из камер-генераторов, в натурных — в помещении, где находятся изучаемые полимерные материалы.

Пороговая чувствительность аллергенов, в данном случае разведений поглотительной жидкости, не вызывающих цитотоксического эффекта (при постановке РУПЛ, РПГА и РСАЛ) и явления конъюнктивита (при конъюнктивальной пробе) устанавливается опытным путем с первоначальной ориентацией и учетом концентрации веществ, обнаруженных при санитарно-химическом анализе. В условиях наших исследований, например, при изучении сендвичпанелей и жестких пенополиуретанов, когда объем проб отбираемого воздуха составлял от 90 до 120 литров, эти разведения колебались в пределах от 1:4 до 1:16.

7. КОНЪЮНКТИВАЛЬНАЯ ПРОБА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ НА МОРСКИХ СВИНКАХ ПО Г. П. ТРУБИЦКОЙ

Конъюнктивальная проба представляет собой воспроизведение аллергической реакции на слизистой конъюнктивы и роговицы, искусственно воспроизводимую специфическими аллергенами в известной концентрации (И. Лишка, 1963). Раньше эта проба использовалась для титрования антител у людей (Ю. А. Порошина, Н. В. Медуницын, 1963).

В процессе изучения аллергенной активности полимерных строительных материалов нами в 1977 г. предложена модификация конъюнктивальной пробы применительно к морским свинкам.

7.1. техника постановки реакции

Гаптены, в данном случае различные водорастворимые химические соединения, в количестве одной капли вводятся глазной пипеткой, имеющей вытянутый тонкий конец, под верхнее веко. Второй глаз служит контролем на растворитель — дистиллированную воду. При этом удобнее всего держать животное вниз головой. Необходимость введения веществ под верхнее веко обуславливалась анатомическими особенностями глаз морских свинок. Реакция читается через 5 минут после введения гаптена и далее 24, 48 и 72 часа. При чтении реакции свинка укладывается на бок, противоположный исследуемому глазу.

7.2. Оценка результатов

Оценка результата производится по Лишка (1963):
неопределенная реакция (±)—едва заметное покраснение слезного протока;
Слабо положительная (+) — слегка краснеет слезный проток, обычно возникают явления зуда;
Положительная средней степени (++) — наблюдается легкое покраснение склеры в направлении к роговице, регистрируются признаки зуда;
резко положительная реакция (+++) — проявляется как покраснение всей конъюнктивы и склеры, возникают явления сильного зуда, слезотечение.

Пороговая чувствительность, то есть дозы гаптенов, не вызывающие явления конъюнктивита у интактных животных, установлены для циклогексанона на уровне 0,01%; формальдегида — 0.1%; фталевого ангидрида — 3%; малеинового

ангидрида — 0,1%; катапина — 0,1% и 1-аминогуанидина [$HN = C(NH_2)_2$] — аналога дифенилгуанидина [$HN = C(NHC_6H_5)_2$], имеющего общую групповую детерминанту — 4% водного раствора.

Каждый из описанных выше методов прошел апробацию в лаборатории кафедры коммунальной гигиены на примере изучения большой группы наиболее распространенных полимерных строительных материалов и в токсикологической лаборатории Ростовской областной санэпидстанции при изучении химических аллергозов.

Приложение

Методы аллергодиагностики

№№ пп	Название реакции	Авторы разработки реакций	Литературные источники
1.	Реакция розеткообразования	N. K. Ierne A. I. Nordin	Science 1963, 140, 3565, 405
2.	Реакция бляшкообразования	Б. В. Пинегин Б. С. Утешев С. Б. Першин	Ж. Микробиология, 1971, 1, 128
3.	Реакция торможения миграции	М. М. Авербах	Ж. Микробиология, 1972, 112
4.	Реакция дегрануляции тучных клеток	Л. М. Ишимова	Вопросы патогенеза и клиники аллергических заболеваний. М., 1962, 11.
5.	Показатель повреждения нейтрофилов (ПЦПН)	В. А. Фрадкин	Советская медицина, 1962, 9, 41—47
6.	Реакция микропреципитации	R. Hoigne, W. Grossmann, H. Storck	Methodik und ersfe klinische Erfahrung Schweiz., Med., 1955, 85, 24. 578—586
7.	Кожные пробы	О. Г. Алексеева, А. Н. Петкевич, А. Д. Черноусов	Сб. Клиническая цитология химической этиологии (Материалы I Всесоюзной конференции), Киев, 1972, 109

ЛИТЕРАТУРА

Адо А. Д., Алексеева О. Г. — Гигиена и санитария, 1969, 3, 75—79.

Алексеева О. Г., Барлогова С. Г., Дуева Л. А., Загидуллин Ш. З. Вестник дерматологии и венерологии, 1971, 9, 33.

3. Боков А. Н. — Сб. Гигиена и токсикология полимерных строительных материалов и некоторых химических веществ. Ростов-на-Дону, 1968, вып. 1, 17—28.

4. Брусиловский Е. С. — Сб. Клиническая патология химической этиологии. Материалы I Всесоюзной конференции (Киев, 24—25 октября, 1972), Киев, 1972, 63—66.

5. Лишка И. — Современная практическая аллергология. Под ред. члена кор. АМН СССР проф. А. Д. Адо и А. А. Польнера. М., 1963, 46.

6. Порошина Ю. А., Медуницын Н. В. — Современная практическая аллергология. Под ред. члена кор. АМН СССР проф. А. Д. Адо и А. А. Польнера. М., 1963, 334.

7. Сосонкин И. Е. — Лабораторное дело, 1968, 12, 707.

8. Трубицкая Г. П. — Сб. Актуальные вопросы аллергологии и иммунологии. Ташкент, 1977.

9. Фиалковский А. М. — Диссертация кандидатская. Ереван, 1974.

10. Чикин С. Я., Сомов Б. А., Житницкий Г. Д. — Гигиена и санитария, 1973, 4, 52—55.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение . . . . . .
1. Изучение аллергенной активности полимерных материалов в натурных условиях 4
2. Изучение аллергенной активности полимерных материалов в моделированных условиях 5
3. Реакция усиления пиронинофилии лейкоцитов по А. М. Фиалковскому 8
4. Реакция агломерации лейкоцитов по И. Е. Сосонкину 11
5. Реакция пассивной гемагглютинации по Boyden в модификации О. Г. Алексеевой с соавт. 12
6. Приготовление аллергенов 15
7. Конъюнктивальная проба 17
Приложение 1. 18
Литература 19

ПК 80385. Подписано к печати 27.2. 1978 г. Зак. 2. Объем 1,25 физ. п. л.
кз. Типография им. М. И. Калинина Ростовского уприздата.

gost.e-ecolog.ru