Государственная система санитарно-эпидемиологического нормирования Российской Федерации

1.1. ОБЩИЕ ВОПРОСЫ.
ГИГИЕНА, ТОКСИКОЛОГИЯ, САНИТАРИЯ

# Требования к постановке экспериментальных исследований по обоснованию предельно допустимых концентраций промышленных химических аллергенов в воздухе рабочей зоны и атмосферы

**Методические указания**
**МУ 1.1.578—96**

Издание официальное

**Минздрав России**
**Москва•1997**

gost.e-ecolog.ru

1.1. ОБЩИЕ ВОПРОСЫ.
ГИГИЕНА, ТОКСИКОЛОГИЯ, САНИТАРИЯ

# Требования к постановке экспериментальных исследований по обоснованию предельно допустимых концентраций промышленных химических аллергенов в воздухе рабочей зоны и атмосферы

**Методические указания**
**МУ 1.1.578—96**

ББК 51.245
Т66

Т66 Требования к постановке экспериментальных исследований по обоснованию предельно допустимых концентраций промышленных химических аллергенов в воздухе рабочей зоны и атмосферы: Методические указания.—М.: Информационно-издательский центр Минздрава России, 1997.—24 с.

ISBN 5—7508—0070—9

1. Разработаны НИИ медицины труда РАМН (Дуева Л. А., Алексеева О. Г.), НИИ экологии человека и гигиены окружающей среды РАМН (Пинигин М. А., Тепикина Л. А.), Институтом иммунологии Минздравмедпрома России (Черноусов А. Д.), Центральным кожно-венерологическим институтом Минздравмедпрома России (Умеров Ж. Г.), Санкт-Петербургским НИИ гигиены труда и профзаболеваний Минздравмедпрома России (Сидорин Г. И., Мартинсон Т. Г.), Белорусским научно-исследовательским санитарно-гигиеническим институтом (Шевляков В. В.), Харьковским НИИ гигиены труда и профзаболеваний (Василенко Н. М.), Центральной научно-исследовательской лабораторией Латвийской медицинской Академии (Иванова И. А.).

2. Утверждены и введены в действие Первым заместителем Председателя Госкомсанэпиднадзора России - заместителем Главного государственного санитарного врача Российской Федерации 21 октября 1996 г.

3. Введены взамен методических рекомендаций «Постановка исследований по гигиеническому нормированию промышленных аллергенов в воздухе рабочей зоны» (1980) и в дополнение к «Временным методическим указаниям по обоснованию предельно допустимых концентраций загрязняющих веществ в атмосферном воздухе населенных мест» (1989).

ББК 51.245

ISBN 5—7508—0070—9

©Информационно-издательский центр Минздрава России

## Содержание

1. Область применения . . . . . 4
2. Схема постановки исследований . . . . . 5
3. Постановка исследований по выявлению аллергенных свойств . . . . . 8
4. Постановка исследований по обоснованию величины гигиенических нормативов . . . . . 10
5. Методы выявления сенсибилизации . . . . . 12
6. Обоснование величины гигиенических нормативов . . . . . 20
Приложение . . . . . 24

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Председателя Госкомсанэпиднадзора России – Заместитель Главного государственного санитарного врача Российской Федерации
С. В. Семенов
21 октября 1996 г.
МУ 1.1.578—96
Дата введения: с момента утверждения

1.1. ОБЩИЕ ВОПРОСЫ.
ГИГИЕНА, ТОКСИКОЛОГИЯ, САНИТАРИЯ

# Требования к постановке экспериментальных исследований по обоснованию предельно допустимых концентраций промышленных химических аллергенов в воздухе рабочей зоны и атмосферы

## Методические указания

### 1. Область применения

Методические указания предназначены для токсикологов, занимающихся обоснованием гигиенических нормативов вредных веществ в воздухе рабочей зоны и атмосферы. Методические указания посвящены установлению гигиенических нормативов промышленных химических аллергенов в воздухе рабочей зоны и атмосферы. Более чем десятилетняя практика обоснования гигиенических нормативов (ПДК и ОБУВ) промышленных аллергенов в воздушной среде подтвердила эф-

Издание официальное

Настоящие методические указания не могут быть полностью или частично воспроизведены, тиражированы и распространены без разрешения Минздрава России.

фективность данного мероприятия по профилактике развития аллергических заболеваний у рабочих аллергоопасных производств и населения промышленных регионов. Настоящие методические указания разработаны с учетом накопленных за эти годы данных по теории и практике токсикологической аллергологии. При этом предусмотрен единый подход к обоснованию гигиенических нормативов промышленных химических аллергенов в воздухе рабочей зоны и атмосферы.

Оценка аллергоопасности при установлении гигиенических нормативов химических соединений и сложных продуктов на их основе обязательно проводится в следующих случаях:

- при нормировании новых химических соединений, принадлежащих к химическим классам, неизученным в аллергологическом плане;
- при нормировании химических соединений и сложных продуктов, принадлежащих к химическим классам, содержащим уже известные аллергены, или имеющих химические аналоги, обладающие сенсибилизирующим действием;
- при наличии жалоб аллергического характера или клинических признаков аллергических поражений у людей, имеющих контакт с данным химическим соединением или продуктом.

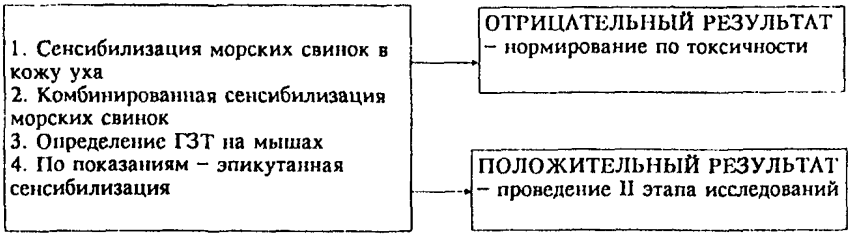
## 2. Схема постановки исследований

Исследования проводят в два этапа. Цель 1-го этапа – выявление аллергенных свойств изучаемого вещества, 2-го этапа – обоснование величины гигиенического норматива (см. схему).

*На 1-м этапе исследований* используют методы экспресс-сенсибилизации морских свинок и мышей.

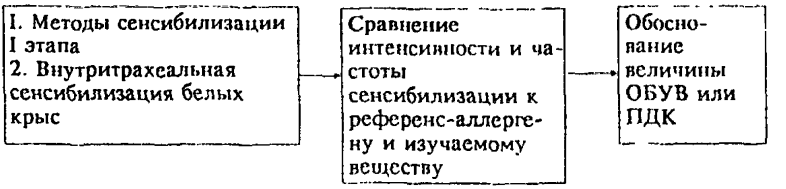
*Схема постановки исследований*

**I этап – выявление аллергенных свойств**

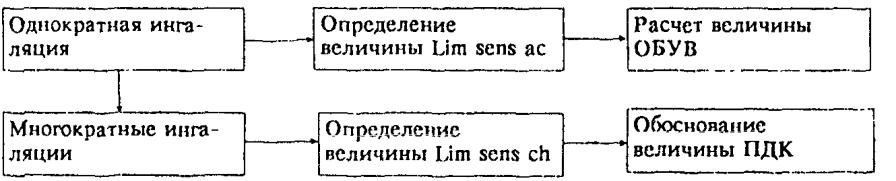


**II этап – обоснование величины санитарного стандарта**

**А. Нормирование по аналогии**




**Б. Нормирование по ускоренной и полной схеме**




При изучении простых химических соединений рекомендуется применение метода сенсибилизации морских свинок внутрикожно в зону уха и/или воспроизведение гиперчувствительности замедленного типа (далее ГЗТ) на мышах.

Сенсибилизация морских свинок, как наиболее чувствительного вида лабораторных животных к действию химических аллергенов, позволяет оценить аллергенную активность изучаемого вещества. С этой целью животных сенсибилизируют введением в зону уха двух доз вещества: 50 и 200 мкг/животное. Воспроизведение ГЗТ на мышах позволяет выявить аллергенные свойства не только растворимых, но также нерастворимых в воде твердых и пастообразных веществ, обладающих сильной или умеренной аллергенной активностью. Поскольку введение мышам слабых аллергенов не проявляется развитием четко выраженной ГЗТ, при отрицательном или сомнительном результате данного эксперимента на мышах следует дополнительно провести сенсибилизацию морских свинок в дозе 200 мкг/животное. При этом, а также для веществ с предполагаемой слабой аллергенной активностью, не исключается использование еще более высокой сенсибилизирующей дозы – 500 мкг/живот-

ное. При изучении сложных по составу и неотвержденных полимерных продуктов осуществляют комбинированную сенсибилизацию морских свинок (в кожу уха и дополнительно эпикутанно) и/или применяют метод воспроизведения ГЗТ на мышах.

В дополнение к этим обязательным приемам исследований I-го этапа по соответствующим показаниям могут быть использованы также и другие способы сенсибилизации животных. Так, при исследовании химических соединений и продуктов, особенно пастообразных и вязких, загрязняющих кожные покровы рабочих, целесообразна проверка возможности развития контактной аллергии методом многократных эпикутанных аппликаций на морских свинках. Для водонерастворимых промышленных пылей уже на I-м этапе исследования может быть применен способ внутритрахеальной сенсибилизации белых крыс.

Если на I-м этапе исследования аллергенные свойства у изучаемого вещества не выявлены, то его нормируют как вещество общетоксического действия. Если хотя бы один из приемов сенсибилизации позволил выявить аллергенные свойства изучаемого вещества, то обязательно проводят II-й этап исследований.

II-й этап исследований, в зависимости от приема нормирования (по аналогии, ускоренной или полной схеме), включает следующие токсиколого-аллергологические эксперименты.

При нормировании по аналогии проводят сравнение выраженности и частоты сенсибилизации у животных, вызванных введением референс-аллергена и изучаемого вещества, используя методы экспресс-сенсибилизации I-го этапа. При нормировании нерастворимых пылей возможно также применение внутритрахеальной сенсибилизации белых крыс. Для простых химических соединений референс-аллергеном является уже нормированное вещество, сходное по своей химической структуре и содержащее одинаковые ответственные за развитие сенсибилизации активные химические группы. Референс-аллергеном для сложной композиции служит уже нормированная композиция, близкая по составу и содержащая одинаковый ответственный за развитие сенсибилизации ингредиент.

При отсутствии референс-аллергена II-й этап исследований включает экспериментальное определение порогов сенсибилизации: при однократной ингаляции вещества – $Lim_{sens\ ac}$, при многократных ингаляциях – $Lim_{sens\ ch}$. Сравнение величин $Lim_{sens\ ac}$ и $Lim_{sens\ ch}$ с $Lim_{ac}$ и $Lim_{ch}$, установленных в

токсикологических экспериментах по интегральным и специфическим эффектам, позволяет определить, является ли сенсибилизирующее действие лимитирующим. С учетом этих данных обосновывают величину гигиенического норматива (см. раздел 6).

При нормировании сложных химических продуктов сенсибилизацию животных на обоих этапах исследования осуществляют цельным продуктом; при выявлении сенсибилизации для тестирования применяют все основные ингредиенты в чистом виде, а при неизвестном составе – цельный продукт или вытяжку из него (см. раздел 5.3).

## 3. Постановка исследований по выявлению аллергенных свойств

### *3.1. Внутрикожная сенсибилизация морских свинок*

В эксперименте используют молодых морских свинок массой 250—300 г, разделенных на 2 опытных и одну общую контрольную группы по 8—10 животных в каждой. Животных опытных групп сенсибилизируют, вводя однократно в кожу наружной поверхности уха ближе к его основанию 50 (I-я опытная группа) и 200 мкг на животное (2-я опытная группа) изучаемое вещество в объеме 0,02—0,1 мл. В качестве растворителей применяют дистиллированную воду, физиологический раствор, ацетон, спирт, твин-80, диметилсульфоксид и др. При изучении маслообразных продуктов используют водные эмульсии, а для отвержденных полимеров – вытяжки (см. раздел 5.3). Контрольным животным вводят в том же объеме растворитель, эмульгатор или экстрагирующую жидкость.

Выявление сенсибилизации (см. раздел 5) проводят через 8—10 дней. Сильные аллергены в обеих дозах вызывают у морских свинок выраженную сенсибилизацию: среднегрупповой показатель аллергологических тестов статистически достоверно отличается от такового у контрольных животных. Умеренные аллергены выраженную сенсибилизацию вызывают лишь при введении в дозе 200 мкг на животное, а при введении 50 мкг на животное – слабую, при которой сенсибилизация обнаруживается у 1/3—1/2 части животных, а среднегрупповые показатели аллергологических тестов могут не отличаться от таковых у контрольных животных. Слабые аллергены вызывают слабую сенсибилизацию лишь при введении вещества в дозе 200 мкг на животное, при этом положительными могут быть

лишь тесты с клетками крови, а кожные пробы – отрицательными.

### *3.2. Комбинированная сенсибилизация морских свинок*

Сложные продукты и неотвержденные полимеры могут очень плохо всасываться, и в этом случае сенсибилизация у морских свинок не наступает даже при введении в кожу уха 200 мкг/жив. Для окончательного решения о наличии аллергенных свойств при отрицательных результатах аллергологического тестирования животных на следующий день начинают эпикутанные аппликации вещества. После 7-й аппликации повторно проводят тестирование морских свинок.

Концентрацию вещества для эпикутанных аппликаций подбирают в процессе изучения раздражающего кожу действия или в специальном эксперименте: 6—8 морским свинкам массой 250—300 г в течение 7—10 дней (по 5 раз в неделю) наносят по 3 капли изучаемого вещества и его разведений 1 : 2, 1 : 10 и 1 : 100 на выстриженные «окошки» боковой поверхности туловища размером 2 х 2 см. В качестве растворителя удобно использовать летучий не раздражающий кожу растворитель (ацетон, 70°-ный спирт, диметилсульфоксид). Если образуется пленка, то ее через 4 часа смывают, в остальных случаях кожу ничем не обрабатывают. Из нерастворимых веществ готовят мази (лучше на ланолине, а не на вазелине), которые распределяют глазной лопаточкой по поверхности «окошка». Для сенсибилизации выбирают максимальную концентрацию, не вызвавшую развития контактного дерматита.

### *3.3. Определение ГЗТ на мышах*

В опытную и контрольную группы берут по 10 мышей чистой линии (BALB/C, СА-1, ДВА/2) или по 16—20 белых беспородных мышей массой 18—20 г. Животных сенсибилизируют 10 мМ или 100 мкг изучаемого вещества однократно внутрикожно в основание хвоста. Сенсибилизирующая доза вещества эмульгируется в 60 мкл смеси полного адъюванта Фрейнда (ПАФ) и раствора Хенкса pH 7,5, приготовленной в соотношении 1 : 1. Состав ПАФ: 1 мл ланолина, 3 мл вазелинового масла, 5 мг убитой нагреванием вакцины БЦЖ. В этот объем ПАФ добавляют 50 мкл твина-20 и 0,5 мл дистиллированной воды. Смесь автоклавируют. Контрольным животным вводят 60 мкл данной смеси без добавления изучаемого вещества.

Для выявления сенсибилизации через 5 суток в подушечку задней лапы мышей вводят такое же как и при сенсибилизации количество изучаемого вещества (10 мМ или 100 мкг), растворенного (взвешенного) в растворе Хенкса. Через 24 часа измеряют инженерным микрометром МК-0-25 толщину обеих задних лап в мм. О величине отека, т. е. о развитии ГЗТ судят по разнице в толщине обеих задних лап (показатель ГЗТ). У контрольных животных она, как правило, составляет 0,04—0,09 мм. Статистически достоверное превышение среднегруппового показателя ГЗТ опытных животных по сравнению с контрольными свидетельствует о наличии выраженных или умеренных сенсибилизирующих свойств у изучаемого соединения.

*3.4. Многократные эпикутанные аппликации на морских свинках*

Подбор сенсибилизирующей концентрации осуществляют также, как при комбинированной сенсибилизации (см. раздел 3.2). Эпикутанные аппликации проводят по 5 раз в неделю в течение 4 недель (всего 20 аппликаций). Если на 2—3-й неделе опыта у морских свинок появляются признаки контактного дерматита, то сенсибилизирующие аппликации продолжают на другом участке кожи. Выявление сенсибилизации проводят через 1—2 суток после последней аппликации. При этом капельную кожную пробу ставят на противоположном боку.

## 4. Постановка исследований по обоснованию величины гигиенических нормативов

*4.1. Интратрахеальная сенсибилизация белых крыс*

Двум группам белых крыс вводят однократно в трахею 0,5—1,0 мл суспензии максимально измельченной изучаемой пыли в дозах по 50 и 10 мг на подогретом до 37 °С физиологическом растворе. Животным контрольной группы вводят по 1 мл подогретого до 37 °С физиологического раствора.

Процедуру введения лучше осуществлять без наркоза. Для этого крысу фиксируют в вертикальном положении, вводят в ротовую полость металлический зонд, закрепленный на шприце с соответствующей дозой суспензии, проводят его по передней стенке гортани через голосовую щель (возникает ощущение препятствия) до упора в бифуркацию трахеи, слегка приподнимают зонд и осуществляют введение. После введения

животное продолжают держать в вертикальном положении на протяжении нескольких дыхательных движений. При этом хрипы и хлюпающий звук подтверждают проникновение суспензии в легкие.

Тестирование животных всех групп проводят через 5 суток после интратрахеального введения.

### *4.2. Однократное ингаляционное воздействие*

Однократные ингаляции вещества с целью определения величины $Lim_{sens\ ac}$ целесообразно проводить на морских свинках или белых крысах после нахождения величины $Lim_{ac}$. Для слабых и умеренных аллергенов обычно достаточно проводить ингаляции изучаемого вещества в концентрациях на уровне действующей, пороговой и на порядок ниже таковой по общетоксическому эффекту. При изучении сильных аллергенов приходится еще проводить ингаляции в меньших концентрациях. Длительность каждой ингаляции составляет при установлении нормативов для воздуха рабочей зоны 4 часа, для атмосферного воздуха – 24 часа. Число животных в группе должно быть не менее 10.

Однократные ингаляции следует проводить на крысах с тем, чтобы можно было сравнить величины $Lim_{sens\ ac}$ и $Lim_{ac}$, полученные на одном виде животных. Однако, если на крысах однократная ингаляция не вызывает сенсибилизации, то ее надо повторить на морских свинках.

Выявление сенсибилизации осуществляют через неделю после проведения ингаляции.

За $Lim_{sens\ ac}$ принимают концентрацию вещества, однократная ингаляция которой вызывает сенсибилизацию у 2—5 из 10 животных, проявляющуюся положительными лабораторными тестами и/или провокационными пробами. При этом среднегрупповые значения показателей сенсибилизации могут статистически достоверно не отличаться от контрольных.

### *4.3. Многократное ингаляционное воздействие*

Многократные ингаляции проводят на животных того же вида, на которых установили $Lim_{sens\ ac}$. Продолжительность воздействия составляет: при установлении ПДК в воздухе рабочей зоны 4 часа ежедневно 5 раз в неделю в продолжении 2-х недель, для ПДК в атмосферном воздухе 14 суток непрерывного (круглосуточного) воздействия. Соответственно, через 2 недели проводят первое тестирование животных. При

отрицательном или сомнительном результате ингаляции продолжают еще 2 недели в том же режиме и проводят повторное тестирование. При установлении ПДК в воздухе рабочей зоны общая продолжительность воздействия не должна превышать одного месяца, а для атмосферного воздуха опыт может быть продолжен до 2-х месяцев. Более длительное воздействие нецелесообразно, поскольку оно не ведет к усилению сенсибилизирующего эффекта. Более того, последующие ингаляции могут привести к ослаблению эффекта из-за развития компенсаторных иммунных процессов и существенно затруднят определение пороговой концентрации. Таким образом, 2—4 недельный эксперимент по своему эффекту в принципе равнозначен хроническому токсикологическому эксперименту, что позволяет проводить сравнение величин $Lim_{ch}$ и $Lim_{sens\ ch}$.

Определение пороговой концентрации по сенсибилизирующему эффекту ($Lim_{sens\ ch}$) проводят по тем же принципам, что и при однократном ингаляционном воздействии.

## 5. Методы выявления сенсибилизации

В настоящем документе рекомендованы широко апробированные в токсикологической практике приемы выявления сенсибилизации к химическим соединениям и продуктам: кожные провокационные пробы и лабораторные специфические аллерготесты, основанные на реакции клеток крови на аллерген in vitro. Эти тесты позволяют выявить аллергические реакции разного типа: замедленные (провокационная капельная кожная проба), немедленные реагинового типа (тесты с тучными клетками), а также опосредованные иммунными комплексами (лизис лейкоцитов и тесты с нейтрофилами крови). Рекомендуемые тесты не должны ограничивать инициативу исследования, так как правомерно использование и других методов, как специфической аллергодиагностики, так и неспецифических, свидетельствующих о развитии сенсибилизации у подопытных животных (иммунологических, биохимических, иммуноморфологических и др.).

На всех этапах исследования рекомендуется использовать не менее двух специфических методов выявления сенсибилизации: провокационную пробу in vivo и какой-либо аллерготест in vitro.

*5.1. Провокационная кожная капельная проба на морских свинках*

Для проведения кожной капельной пробы (далее КП) предварительно проводят *подбор тестирующей концентрации* изучаемого вещества на группе интактных морских свинок (6—8 особей). Для этого на боковых поверхностях туловища животного выстригают шерсть на 4—6 участках размером 1 х 1 см, разделенных полосками шерсти. На соответствующий участок наносят по 1—3 капли вещества в определенной концентрации. Обычно испытывают вещество в нативном виде и его двукратные или десятикратные разведения. В качестве растворителя (разбавителя) используют воду, 70°-ный спирт, ацетон, диметилсульфоксид. При этом один из участков кожи должен быть контрольным, на который наносят соответствующий растворитель (разбавитель). Реакцию учитывают визуально через 24 часа.

В качестве тестирующей концентрации выбирают максимальную, нанесение которой на кожу интактных морских свинок не вызывает через 24 часа реакцию раздражения (эритемы, опухания).

*Постановка КП.* На лишенную шерсти кожу бока морских свинок (опытных и контрольных) наносят по 1 капле изучаемого вещества в тестирующей концентрации. Реакцию оценивают визуально через 24 часа по следующей шкале:

0 баллов – видимой реакции нет,

1 балл – слабо розовая эритема по всему участку или по периферии,

2 балла – ярко розовая эритема по всему участку или по периферии,

3 балла – ярко красная эритема по всему участку,

4 балла – опухание кожи с эритемой или без нее,

5 баллов – выраженное опухание, очаговые изъязвления, геморрагии.

*5.2. Провокационный тест опухания уха*

Тест опухания уха (далее ТОУ) как вариант провокационной кожной пробы можно использовать на любом виде лабораторных животных с любыми веществами, в том числе и с красителями.

*Подбор тестирующей концентрации для ТОУ* в принципе не отличается от такового для КП: используются те же растворители (ацетон, 70°-ный спирт) и разведения вещества (от 0,1 до 20 %, реже 50 % или неразведенный продукт). Однако

общее число животных увеличивают, так как на одном животном можно испытывать только две концентрации (по одной на каждое ухо).

*Постановка ТОУ:* предварительно измеряют микрометром в мм толщину средней части ушной раковины, затем на обе поверхности средней трети расправленного и фиксированного пинцетом ушка наносят по 25 мкл испытуемого вещества в рабочей концентрации. Через 24 часа повторно замеряют толщину ушка и вычисляют показатель ТОУ по различию толщины до и после аппликации. ТОУ считают положительным у морских свинок и крыс при показателе 0,03 мм и более, у мышей – 0,01 мм и более. У морских свинок ТОУ можно учитывать в баллах по следующей шкале:

0 баллов – до 0,03 мм,
1 балл – 0,03—0,07 мм,
2 балла – 0,08—0,12 мм,
3 балла – 0,13—0,17 мм,
4 балла – 0,18—0,22 мм,
5 баллов – 0,23 мм и более.

### *5.3. Подбор рабочих доз вещества для постановки специфических аллерготестов с клетками крови животных*

Специфические аллерготесты с клетками крови, как правило, выполняют с 0,1—0,01 %-ными растворами (на физиологическом растворе), поэтому в них можно использовать малорастворимые вещества. Для веществ, не растворяемых в воде даже в таких концентрациях, следует подобрать водорастворимое вещество, имеющее групповую антигенную детерминанту: например, для формальдегидсодержащих полимерных продуктов – растворы формальдегида; для полимерных продуктов, содержащих эпоксигруппы – эпихлоргидрин; для всех соединений хрома – $CrCl_3$; для металла Be и его соединений – сульфат бериллия и т. д. При изучении отвержденных полимеров используют вытяжку: изучаемое вещество и физиологический раствор в соотношении 1 : 1 для полимеризационных и 1 : 10 для поликонденсационных продуктов при инкубации при 37 °С в течение 3—5 суток.

Растворы желательно приготавливать не из технических продуктов, а из химически чистых веществ. Поскольку кислая или щелочная среда может вызвать повреждение клеток крови, следует следить, чтобы pH рабочего раствора была нейтральной или слабо щелочной (pH 7,2—7,4). Если вещество образует нестойкий раствор, рабочие растворы необходимо готовить для

каждого опыта. Стойкие растворы можно хранить в холодильнике в течение месяца, однако при этом следует следить за их стерильностью и в случае помутнения или образования пленки раствор использовать нельзя.

Рабочие дозы (концентрации растворов) испытуемых веществ подбирают путем постановки теста с кровью интактных животных, используя несколько разведений. Для выявления сенсибилизации выбирают максимальную концентрацию раствора, не вызывающую увеличения лизиса или других соответствующих тесту изменений клеток крови по сравнению с контрольной пробой с добавлением только антикоагулянта.

### *5.4. Реакция специфического лизиса лейкоцитов крови*

Реакцию специфического лизиса (далее РСЛЛ) можно выполнять в пробирках, планшетах, меланжерах с гепаринизированной кровью.

*Вариант 1.* В первую пробирку или лунку планшета вносят 0,1 мл физиологического раствора (контрольная проба), во вторую – 0,1 мл физиологического раствора, в котором предварительно растворена рабочая доза испытуемого вещества (опытная проба). Затем в обе пробирки добавляют по 0,1 мл исследуемой крови. Реагирующие системы перемешивают встряхиванием и инкубируют в течение 2 часов при 37 °С. Из каждой пробы кровь переносят по 0,02 мл соответственно в две пробирки или лунки планшета, содержащие для разрушения эритроцитов по 0,4 мл 3 %-ного водного раствора уксусной кислоты.

*Вариант 2.* В два меланжера до метки 0,5 набирают кровь экспериментальных животных, затем в первый меланжер до метки 1 добавляют 5 %-ный раствор лимоннокислого натрия, приготовленный на физиологическом растворе (контрольная проба), во второй (до той же метки 1) – 5 %-ный раствор лимоннокислого натрия, в котором предварительно растворена рабочая доза испытуемого вещества (опытная проба). Меланжеры встряхивают и инкубируют при 37 °С в течение 2-х часов. Затем в оба меланжера до метки II набирают 3—5 %-ный водный раствор уксусной кислоты, подкрашенный метиленовым синим.

Подсчет абсолютного количества лейкоцитов проводят в счетной камере крови или на пикаскеле. При использовании меланжеров до заполнения камеры предварительно сливают 3—4 капли.

Показатель РСЛЛ рассчитывают по формуле:

$$\text{показатель РСЛЛ} = \frac{Л\ контроль - Л\ опыт}{Л\ контроль} \cdot 100\ \%$$

Реакцию расценивают как положительную при показателе лизиса лейкоцитов 10 % и выше. Показатель РСЛЛ выше 20 % свидетельствует о высоком уровне сенсибилизации животных.

Рабочие концентрации химических аллергенов не должны вызывать лизис более 9 % лейкоцитов интактных животных и наиболее часто соответствуют 0,5—0,05 %-ным разведениям на физиологическом растворе; более высокого разведения требуют вещества, обладающие выраженным раздражающим, а следовательно, цитотоксическим действием на клетки крови.

*5.5. Реакция специфического повреждения нейтрофилов*

Для постановки реакции специфического повреждения нейтрофилов (далее тест ППН) в качестве антикоагулянта применяют 5 %-ный водный раствор цитрата натрия или 1,5 %-ный раствор ЭДТА (Хелатон-3), приготовленный на физиологическом растворе (следить за pH раствора).

Рабочую концентрацию изучаемого вещества готовят на том же антикоагулянте, который добавляют к крови. Рабочая концентрация не должна вызывать повреждение более, чем 4 % нейтрофилов интактных животных в I-м варианте теста ППН и 7 % во 2-м варианте.

*Постановка теста ППН.* В первую силиконированную центрифужную пробирку (опытная проба) вносят 0,1—0,2 мл раствора изучаемого вещества в рабочей концентрации, во вторую (контрольная проба) - такой же объем только антикоагулянта. Затем в обе пробирки добавляют такой же объем крови обследуемого животного, после чего пробирки осторожно перемешивают и выдерживают в течение 1 ч при комнатной температуре.

Далее тест ППН может выполняться по любому из двух вариантов.

*Вариант 1.* После окончания инкубации из обеих пробирок готовят на предметном стекле мазки средней толщины, которые фиксируют и окрашивают методом, используемым при окраске мазков для подсчета лейкоцитарной формулы. Под иммерсией просчитывают 100 нейтрофилов, учитывая число клеток с отчетливым хроматинолизом, пикнозом, фрагментацией ядер, гиперхроматозом или кариолизисом.

*Вариант 2.* После окончания инкубации снова осторожно перемешивают и добавляют в обе пробирки по 0,02 мл рабочего водного раствора акридин оранжевого (1 : 20000). Данный раствор хранят в холодильнике не более 2-х недель. Для его приготовления используют водный раствор акридин оранжевого в разведении 1 : 100, который можно хранить в темном флаконе в холодильнике несколько месяцев. Через 5 минут по 1 капле содержимого из каждой пробирки переносят на два предметных стекла, накрывают покровным стеклом и через 3—5 минут исследуют в ЛЮМАМе с иммерсией. Подсчитывают 100 нейтрофилов, которые хорошо определяются благодаря обилию рубиновых гранул на фоне тусклого зеленого свечения цитоплазмы.

Нормальные неповрежденные нейтрофилы имеют овальную или круглую форму. Поврежденные нейтрофилы распознают по характерным амебоидным выпячиваниям (увеличение подвижности клеток) и морфологическим изменениям (неровные «разорваные» края с начинающимся разрежением цитоплазмы по краям клетки, вакуолизация цитоплазмы, дегрануляция, огрубление хроматинового рисунка ядра).

Показатель реакции высчитывают путем деления на 100 разницы в числе поврежденных нейтрофилов в опытной и контрольной пробах. Величина показателя 0,05 и более в первом варианте и 0,08 и более во втором варианте свидетельствует о сенсибилизации животного.

### *5.6. Реакция специфической дегрануляции тучных клеток*

Реакция дегрануляции тучных клеток (далее РДТК) является аналогом базофильного теста и может выполняться на морских свинках и крысах, у которых содержание базофилов в крови крайне низкое.

Исследование выполняют под наркозом или сразу после декапитации животного. Для этого ножницами вскрывают брюшную стенку по средней линии и осторожно (лучше пальцами в резиновых напальчниках, а не пинцетом) вытягивают наружу наиболее длинную петлю перистальтирующего кишечника (5 см или несколько длиннее). Раскладывают петлю на подставленное предметное стекло так, чтобы раскрылись 3 крупных сегмента брыжейки. После этого отсекают с двух сторон участок петли кишечника, края которого должны на 0,5 см свешиваться за край стекла. Затем на каждый сегмент первого, контрольного, препарата наносят по 40 мкл физиологического раствора, а на каждый сегмент второго, опытного,

препарата наносят по 20 мкл свежей аутосыворотки (приготовленной в день исследования из крови, взятой из подъязычной вены) и по 20 мкл изучаемого вещества в рабочей концентрации, приготовленной на физиологическом растворе. Оба препарата инкубируют 5 минут при 37 °С, удаляют жидкую фазу путем промокания фильтровальной бумагой края наклоненного стекла и при необходимости еще раз осторожно расправляют брыжейку. Сразу производят окраску препаратов, заливая их на 1—1,5 минуты 1 %-ным раствором на метиловом спирте эозинметиленового красителя (по Май-Грюнвальду). Краску удаляют промыванием слегка наклоненного препарата водой из пипетки и оставляют до полного просушивания на воздухе (обычно 24 часа). На высушенном препарате скальпелем удаляют весь участок кишечника и перегородки между секторами брыжейки.

Микроскопируют препараты с иммерсией (увеличение 10 х 80), просчитывают по диагонали 50 тучных клеток, учитывая среди них поврежденные формы. Поврежденными следует считать тучные клетки с нарушенной мембраной и выходом гранул за ее пределы (дегрануляция), а также полностью поврежденные. Рассчитывают показатель РДТК по формуле:

$$\text{показатель ДТК} = \frac{\%\ \textit{поврежденных ТК в опытном препарате}}{\%\ \textit{поврежденных ТК в контрольном препарате}}$$

Реакцию расценивают как положительную при показателе 1,31 и выше.

Рабочие концентрации химических веществ для РДТК наиболее часто соответствуют 0,01—0,001 %-ным разведениям на физиологическом растворе, при действии которых у контрольных животных показатель ДТК не должен превышать 1,0±0,3.

### *5.7. Реакция непрямой дегрануляции тучных клеток*

Данный тест (далее РНТДК) основан на реакции клеток – мишеней (тучные клетки белых крыс) на воздействие на них in vitro аллергических антител, содержащихся в сыворотке крови подопытных животных, и изучаемого вещества (аллергена).

Для получения пула тучных клеток интактным белым крысам под эфирным наркозом вводят внутрибрюшинно 6—10 мл подогретого до 37 °С физиологического раствора, смешанного с 0,5 мл гепарина. После легкого массажа брюшной стенки ножницами делают разрез длиной 1,5—2,2 см по средней

линии живота, переворачивают тушку разрезом вниз и собирают экссудат, стекающий с петель кишечника, в центрифужную пробирку, смоченную гепарином. Экссудат центрифугируют в течение 5 мин при 1500 об/мин, надосадок сливают, а осадок для получения взвеси тучных клеток перемешивают.

Для выполнения РНДТК в 2 лунки планшета или 2 пробирки вносят по 0,05 мл взвеси тучных клеток и 0,05 мл сыворотки обследуемого животного. Затем в 1-ю пробу (контрольную) добавляют 0,05 мл физиологического раствора, во 2-ю пробу (опытную) - 0,05 мл физиологического раствора, в котором растворена рабочая доза изучаемого вещества (0,01—0,001 %-ные растворы, которые не должны вызывать спонтанного повреждения более 5 % клеток-мишеней). Затем на одно обезжиренное предметное стекло, предварительно окрашенное на 2-х концах стекла в виде квадратов 0,3 %-ным спиртовым раствором нейтрального красного и высушенного при комнатной температуре, наносят по капле из каждой пробы. Каждую каплю накрывают покровным стеклом, края которого смазаны вазелином, и инкубируют при 37 °С в течение 15 мин.

Препараты микроскопируют при увеличении 20 х 80. В каждом препарате подсчитывают 50 тучных клеток. Вычисление показателя РНДТК и его оценку проводят как и в разделе 5.6 при постановке РДТК.

### *5.8. Оценка результатов выявления сенсибилизации*

При проведении исследований 1-го этапа оценивают частоту развития сенсибилизации и ее интенсивность по среднегрупповым показателям всех использованных провокационных и специфических аллергологических тестов. Класс аллергенной активности изучаемого вещества определяют по табл. 1: к 1-му классу относят сильные, ко 2-му - умеренные и к 3-му - слабые аллергены. В случае различия эффекта по частоте проявления сенсибилизации и величинам среднегрупповых показателей различных провокационных и/или специфических аллергологических тестов аллергенную активность вещества оценивают по наиболее выраженному показателю.

При проведении ингаляционных экспериментов II этапа исследований за действующую концентрацию принимают такую, при действии которой сенсибилизация развивается более чем у половины животных, а среднегрупповые показатели аллергологических тестов статистически достоверно отличаются от таковых у контрольных животных. За пороги острого и хронического сенсибилизирующего действия принимают кон-

центрации, при действии которых (одно- или многократно, соответственно) сенсибилизация развивается у 2—5 из 10 животных, причем среднегрупповые показатели существенно не отличаются от таковых у контрольных животных.

## 6. Обоснование величины гигиенических нормативов

Обоснование величины санитарного стандарта промышленного химического аллергена при проведении полной схемы исследований начинают со сравнения $Lim_{sens\ ch}$ с $Lim_{ch}$. В зависимости от их соотношения определяют прием обоснования ПДК и наличие пометки А (аллерген).

При установлении ПДК *в воздухе рабочей зоны* руководствуются следующими положениями.

• *Если лимитирующим критерием является токсичность*, т. е. величины порогов сенсибилизации выше величин порогов токсичности, то вещество практически не представляет опасности как аллерген, и его нормируют как обладающее общетоксическим действием; при этом пометка А (аллерген) не ставится.

• *Если пороговые величины общетоксического и сенсибилизирующего действия существенно не отличаются или равны*, то вещество следует рассматривать как потенциально опасное в плане развития токсикоаллергических поражений и его нормируют по общетоксическому действию, сопровождая пометкой А (аллерген).

Таблица 1

**Классификация веществ по силе аллергенной активности**

| Метод сенсибилизации | Классы аллергенной активности | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | по частоте развития сенсибилизации | | | по достоверности отличия среднегрупповых показателей в опытных и контрольной группах | | |
| | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| Морские свинки – 200 мкг<br>в кожу уха 50 мкг | >5 из 10<br>>5 из 10 | >5 из 10<br>≤5 из 10 | ≤5 из 10<br>0 | ≤0,05<br>≤0,05 | ≤0,05<br>>0,05 | >0,05<br>– |
| Морские свинки – комбинированно | >5 из 10 | >5 из 10 | ≤5 из 10 | ≤0,05 | ≤0,05 | >0,05 |

Продолжение таблицы 1

| Метод сенсибилизации | Классы аллергенной активности | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | по частоте развития сенсибилизации | | | по достоверности отличия среднегрупповых показателей в опытных и контрольной группах | | |
| | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| Морские свинки – эпикутанно | >5 из 10 | >5 из 10 | ≤5 из 10 | ≤0,05 | ≤0,05 | >0,05 |
| Мыши – в кожу основания хвоста | не учитывают | | | ≤0,05 | ≤0,05 | >0,05 |

• *Если лимитирующим критерием является сенсибилизация*, т. е. величины порогов сенсибилизации ниже пороговых величин токсичности, то вещество представляет опасность как этиологический фактор аллергических заболеваний, его расценивают как промышленный химический аллерген и нормируют по сенсибилизирующему действию с пометкой А (аллерген). При этом коэффициент запаса для химического аллергена определяют по табл. 2.

Таблица 2

**Коэффициенты запаса к Limsens ch при установлении ПДК в воздухе рабочей зоны**

| Величина $Lim_{sens\ ch}$ в мг/м$^3$ | Величина коэффициентов запаса |
|---|---|
| до 1,0 | 10 |
| 1,0—5,0 | 5 |
| более 5,0 | 3 |

При установлении ПДК вредных веществ, обладающих сенсибилизирующим действием, *в атмосферном воздухе* рекомендуются более строгие критерии, учитывая, что воздействию подвергаются дети, люди пожилого возраста и лица, имеющие различные заболевания. В этом случае учитывают не только величину порога хронического сенсибилизирующего действия, но также зону хронического сенсибилизирующего действия, определяемую по формуле:

$$Z_{sens\ ch} = \frac{Lim_{integr\ ch}}{Lim_{sens\ ch}}$$

Далее, в соответствии с величиной $Z_{sens\ ch}$, определяют коэффициент запаса к $Lim_{sens\ ch}$ по табл. 3. Полученную величину ПДК по сенсибилизирующему эффекту сравнивают с ПДК по общетоксическому действию и в качестве гигиенического норматива выбирают наименьшую величину ПДК. Пометку А (аллерген) ставят в соответствии с принципами обоснования ПДК в воздухе рабочей зоны.

Таблица 3

**Коэффициенты запаса к $Lim_{sens\ ch}$ при установлении ПДК в атмосферном воздухе**

| Величина $Z_{sens\ ch}$ | Величины коэффициентов запаса |
|---|---|
| менее 1,0 | Нормируют только по токсичности |
| 1,0 | 3 |
| более 1,0 и менее 3,0 | 5 |
| более 3,0 | 10 |

Так, если величины порогов хронического, токсического и сенсибилизирующего совпадают и составляют 0,01 мг/м$^3$, то $Z_{sens\ ch}$ будет равна 1,0. В этом случае, согласно табл. 3, коэффициент запаса по сенсибилизирующему действию не может быть менее 3,0, а величина ПДК составит 0,003 мг/м$^3$. Если по токсичности положен коэффициент запаса, равный 2,0, т. е. величина ПДК составит 0,005 мг/м$^3$, рекомендуется наименьшая величина ПДК, т. е. 0,003 мг/м$^3$. Но если в разбираемом примере коэффициент запаса по токсичности должен быть не менее 5,0, т. е. определенная по данному эффекту величина будет еще меньше (0,002 мг/м$^3$), то выбирается она.

*При обосновании ОБУВ ускоренным методом*, т. е. по величине расчитывают зону сенсибилизирующего действия вещества по нижеприведенной формуле и уменьшают величину ОБУВ, расчитанную по общетоксическому действию, во столько раз, сколько составляет $Z_{sens\ ac}$:

$$Z_{sens\ ac} = \frac{Lim_{ac}}{Lim_{sens\ ac}}$$

Так, если расчетным путем по токсичности определена величина ОБУВ как 0,2 мг/м$^3$, а $Z_{sens\ ac}$ равна 4, то ОБУВ испытуемого вещества с учетом сенсибилизирующего действия составит 0,05 мг/м$^3$ (0,2 : 4). Пометку А (аллерген) ставят в

соответствии с принципами, используемыми при обосновании ПДК.

При нормировании по аналогии в случае совпадения частоты и интенсивности сенсибилизации, вызванной веществом, с таковыми от воздействия референс-аллергена, ПДК или ОБУВ устанавливают на уровне величины норматива референс-аллергена с пометкой А (аллерген). При существенном отклонении частоты и интенсивности сенсибилизации по сравнению с таковыми от воздействия референс-аллергена, проводят II этап исследований и руководствуются вышеизложенными положениями обоснования величины ПДК или ОБУВ.

Класс опасности определяют по общепринятым в профилактической токсикологии правилам.

Клинико-гигиеническую проверку безопасности величины ПДК, установленной в эксперименте на животных, осуществляют путем сравнения условий труда и состояния здоровья работающих с использованием общепринятых в профилактической токсикологии приемов, а также на основании эпидемиолого-аллергологического обследования работающих, включая выборочное специфическое иммуноаллергологическое тестирование с целью выявления частоты и выраженности сенсибилизации к данному производственному аллергену.

Приложение
(Справочное)

## Библиографические сведения

1. Постановка исследований по гигиеническому нормированию промышленных аллергенов в воздухе рабочей зоны. Методические рекомендации. № 2121—80 от 23.01.1980 Минздрав СССР. Рига, 1980.

2. Временные методические указания по обоснованию предельно допустимых концентраций загрязняющих веществ в атмосферном воздухе населенных мест. № 4681—88 Минздрав СССР. М., 1989.

3. Методы лабораторной специфической диагностики профессиональных аллергических заболеваний химической этиологии. Методические рекомендации № 10—8/94 от 25.12.1979 Минздрав СССР. М., 1980.

4. Алексеева О. Г., Дуева Л. А. Аллергия к промышленным химическим соединениям. М.: Медицина, 1978.—242 с.

5. Дуева Л. А., Коган В. Ю., Суворов С. В., Штеренгарц Р. Я. Промышленные аллергены. М.: Центр Международных Проектов Госкомприроды СССР. М., 1989.—203 с.

**Требования к постановке экспериментальных исследований по обоснованию предельно допустимых концентраций промышленных химических аллергенов в воздухе рабочей зоны и атмосферы**

**Методические указания**
**МУ 1.1.578—96**

Редактор Акопова Н. Е.
Технический редактор Киселева Ю. А.

Подписано в печать 6.02.97

Формат 60х90/16. Печ. л. 1,5
Тираж 500 экз. Заказ 32

ЛР № 020877 от 20.05.94 г.

Министерство здравоохранения Российской Федерации
101431, Москва, Рахмановский пер., д. 3

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован
Информационно-издательским центром Минздрава России
125167, Москва, проезд Аэропорта, 11

gost.e-ecolog.ru