

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

«УТВЕРЖДАЮ»  
Заместитель Министра  
здравоохранения – Главный  
государственный санитарный  
врач Республики Беларусь



Н.П. Жукова  
«*Н.П. Жукова*» 2019 г.  
Регистрационный № 020-1118

**МЕТОДЫ ГИГИЕНИЧЕСКОЙ ОЦЕНКИ  
МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ**

инструкция по применению

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

АВТОРЫ: к.м.н. Ильюкова И.И., к.м.н. Петрова С.Ю., Гомолко Т.Н.,  
Борис О.А., Анисович М.В., Грынчак В.А.

Минск, 2019

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ  
Заместитель министра —  
Главный государственный  
санитарный врач

\_\_\_\_\_ Н. П. Жукова  
23.04.2019  
Регистрационный № 020-1118

**МЕТОДЫ ГИГИЕНИЧЕСКОЙ ОЦЕНКИ  
МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ**

инструкция по применению

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

АВТОРЫ: канд. мед. наук И. И. Ильюкова, канд. мед. наук С. Ю. Петрова,  
Т. Н. Гомолко, О. А. Борис, М. В. Анисович, В. А. Грынчак

Минск 2019

## ГЛАВА 1 НАЗНАЧЕНИЕ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

1. Настоящая инструкция по применению (далее — инструкция) предназначена для гигиенической оценки изделий медицинского назначения, медицинской техники и материалов, применяемых для их изготовления (далее — медицинские изделия) и направлена на обеспечение безопасности медицинских изделий в отношении воздействия на организм человека при их применении по назначению.

2. Методы, изложенные в настоящей инструкции, распространяются на все виды медицинских изделий, за исключением изделий, которые не имеют контакта с организмом человека ни непосредственно, ни опосредованно.

3. Настоящая инструкция предназначена для организаций (учреждений), осуществляющих государственный санитарный надзор.

4. Настоящая инструкция вступает в силу 01.06.2019.

## ГЛАВА 2 ТЕРМИНЫ И ИХ ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В инструкции используются следующие термины и определения:

образец — материал для изготовления медицинского изделия, медицинское изделие или его часть, подвергаемые исследованию;

модельная среда — жидкость, которую используют для экстракции мигрирующих веществ из медицинского изделия или материала, применяемого для его изготовления;

острая токсичность — токсическое действие вещества, введенного в одно- или многократной дозе в течение не более 24 ч, которое может выражаться в расстройстве физиологических функций или нарушении морфологии органов экспериментальных животных, а также гибели животных;

отек — усиленный выход жидкости из сосудистого русла в межклеточное пространство ткани, характеризующийся видимым и/или статистически значимым, развивающимся в течение 1 сут, увеличением ее размера (например, набухание век, увеличение толщины кожной складки, лапы или уха животного);

отрицательный контроль — материал или вещество, которое будучи подвергнуто исследованию по описанной методике, показывает пригодность этой методики для получения воспроизводимого, соответствующего отрицательного, неактивного или фонового ответа в тест-системе;

положительный контроль — материал или вещество, которое при исследовании по описанной методике, показывает пригодность этой методики для получения воспроизводимого, соответствующего положительного или реактивного ответа в тест-системе;

исследование на пирогенность — проверка отсутствия в медицинских изделиях химических агентов или других веществ, способных вызвать повышение температуры тела;

раздражение — локальная воспалительная реакция на однократное, повторное или продолжительное воздействие исследуемого вещества;

репрезентативная часть/деталь медицинского изделия — часть/деталь медицинского изделия, в которой содержатся типичные компоненты основного материала, покрытия, клейки, непосредственно или опосредованно контактирующие с организмом человека при применении и отражающие характерное для медицинского изделия потенциальное токсическое свойство;

санитарно-химические исследования — исследования, проводимые с целью определения интегральных показателей суммарного количества мигрирующих из изделий и материалов химических соединений, а также индивидуальных потенциально опасных химических веществ;

эритема — локальное интенсивное покраснение кожи и/или слизистых оболочек.

### ГЛАВА 3 ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ ГИГИЕНИЧЕСКОЙ ОЦЕНКИ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ

1. Объем и методы исследования медицинских изделий определяются продолжительностью их контакта с организмом человека (кратковременный, длительный, постоянный), видом контакта (с кожей, слизистыми оболочками или внутренней средой; непосредственно или опосредованно) согласно приложению 1 к настоящей инструкции.

Программа исследований медицинского изделия, не входящего ни в одну группу гигиенической классификации, разрабатывается индивидуально в соответствии с видом, продолжительностью контакта, назначением изделия. В том случае, когда изделие может быть отнесено более чем к одной группе, устанавливают необходимость выполнения исследований в соответствии с требованиями к каждой группе.

Медицинские изделия кратковременного контакта однократного применения, время контакта которых с организмом человека не превышает 1 мин, не исследуются по показателям допустимого количества миграции химических веществ, а также на устойчивость к коррозии. Для исследования таких изделий применяются токсикологические методы.

2. При исследовании санитарно-химических показателей принимают в расчет состав материала, из которого изготовлено изделие, согласно приложению 2 к настоящей инструкции.

### ГЛАВА 4 ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ЭКСТРАКТОВ (ВЫТЯЖЕК)

1. Исследуются медицинские изделия в состоянии, готовом для применения в медицинской практике, или репрезентативные части/детали готового к

применению медицинского изделия, а также материалы, используемые для изготовления медицинских изделий.

2. Образцы медицинских изделий исследуют в нативном виде или в виде экстрактов (вытяжек). Порошки исследуют в нативном виде или предварительно готовят из них пасты с использованием подходящего растворителя. Жидкости исследуют в нативной форме или после их разведения. Жидкие материалы, такие как спрей или лак, предназначенные к применению в высушенной форме, наносят тонким слоем на стекло, высушивают, затем подвергают экстракции.

Образцы допускается разрезать на части перед экстракцией для улучшения погружения в модельную среду, за исключением случаев, когда разрушение целостности может привести к изменению экстрагирующих свойств поверхности. Разрезание неприемлемо для эластомеров, материалов с покрытием, композитов, ламинатов.

Если исследуемые образцы требуется разрезать на части, следует использовать технические приемы, исключая контаминацию, а также учитывать влияние поверхности среза на результаты исследований.

Медицинские изделия однократного применения, применяемые в стерильном виде, предоставляются для испытаний после стерилизации с указанием ее способа.

3. Для приготовления вытяжек используют следующее оборудование, материалы, реактивы:

весы лабораторные по ГОСТ OIML R 76-1 высокого класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г;

микрометр по ГОСТ 6507;

дозаторы лабораторные по ГОСТ 28311;

термостат электрический суховоздушный с автоматическим терморегулятором до 50 °С, позволяющий поддерживать заданную температуру с погрешностью  $\pm 1$  °С;

термометр жидкостный стеклянный по ГОСТ 29224, с диапазоном измерения температур от 0 до 100 °С, с ценой деления 1 °С;

пинцет медицинский по ГОСТ 21241;

пипетка 1 (2)-1-2-0,5-10 по ГОСТ 29227;

стакан Н-2-10 (25) ТХС по ГОСТ 25336;

цилиндр 1-100-1 по ГОСТ 1770;

бумага фильтровальная лабораторная по ГОСТ 12026;

ножницы по ГОСТ 21239;

пестик 1-2 по ГОСТ 9147;

ступка 2-3 по ГОСТ 9147;

рН-метр любой марки с набором электродов;

стандарт-титры для приготовления буферных растворов для рН-метрии по ГОСТ 8.135 (допускается приготовление буферных растворов по ГОСТ 4919.2);

вода дистиллированная и бидистиллированная по ГОСТ 6709.

Для пробоподготовки и экстракции образцов и их исследования согласно методам, описанным в настоящей инструкции, допускается применение оборудования и материалов, которые имеют те же технические и метрологические

характеристики и назначение, что и указанные в настоящей и последующих главах инструкции оборудование и материалы. При их применении руководствуются рекомендациями изготовителя.

4. Экстракцию осуществляют в чистых, химически инертных, герметичных, безопасных емкостях, имеющих минимальное свободное пространство. Экстракцию следует производить в условиях, исключающих контаминацию.

Экстракция для оценки материала выполняется при использовании условий, имитирующих предполагаемые условия применения изделия. Выбранные температура и продолжительность экстракции не должны влиять на свойства изделия, например, вызывать значительные изменения физических свойств.

В качестве основной модельной среды используют дистиллированную воду. В случае необходимости допустимо использовать модельные среды, приведенные в настоящем пункте:

полярные (например, физиологический раствор, очищенная вода, вода для инъекций);

неполярные (например, рафинированное растительное масло, полиэтиленгликоль 400, глицерин, диметилсульфоксид (ДМСО)).

Могут быть использованы модельные среды смешанного состава (спирт-вода, спирт-физиологический раствор, минимальные среды с содержанием 5–10 % сыворотки теленка, разведенные поверхностно-активные и диспергирующие вещества).

#### 5. Приготовление экстрактов (вытяжек).

Условия получения экстрактов (вытяжек) из медицинских изделий, приведенные в настоящем пункте, являются стандартными для большинства медицинских изделий. Если стандартные условия моделирования неприемлемы, при этом условия клинического применения изделия четко определены в инструктивном документе, выбирают условия экстракции, имитирующие время и температуру воздействия при применении медицинского изделия.

Условия приготовления экстрактов (вытяжек) для различных медицинских изделий приведены в приложении 3 к настоящей инструкции.

5.1. Методика приготовления экстракта (вытяжки) с использованием станда из устройств комплектных эксфузионных, инфузионных и трансфузионных аппаратов и устройств для замещения функций органов и систем организма (аппаратов искусственного кровообращения, искусственной почки, аппаратов для гемосорбции в комплекте с магистралями или без них и их функциональных элементов – волокон, мембран и гемосорбентов), а также магистралей к перечисленным аппаратам приведена в приложении 4 к настоящей инструкции.

5.2. Приготовление экстрактов (вытяжек) из шприцев. Шприцы извлекают из упаковки, через иглу заполняют дистиллированной водой до номинального объема, иглу закрывают колпачком. Заполненные образцы термостатируют в горизонтальном положении при температуре  $37 \pm 2$  °C в течение 1 ч.

5.3. Приготовление экстрактов (вытяжек) из игл. Иглы помещают в дистиллированную воду, соблюдая соотношение 5 см<sup>3</sup> на одну иглу и термостатируют при температуре  $37 \pm 2$  °C в течение 1 ч.

5.4. Приготовление экстрактов (вытяжек) из ваты: модельная среда — вода дистиллированная, отношение массы изделия к объему модельной среды 1 г/200 см<sup>3</sup>, кипячение в течение 15 мин. Исследуют полученный экстракт после охлаждения до комнатной температуры.

5.5. Приготовление экстрактов (вытяжек) из материала стоматологического пломбировочного, костных цементов осуществляют после изготовления слепка согласно инструкции производителя.

В качестве модельной среды используется предварительно подогретая до 40 °С дистиллированная вода в отношении массы образца к объему модельной среды 0,01 г/см<sup>3</sup>.

Образец помещается в сосуд с притертой пробкой, заполненный предварительно подогретой до 40 °С дистиллированной водой, чтобы не осталось свободного воздушного пространства.

Приготовление экстрактов (вытяжек) образцов одного изделия производится в двух сосудах:

первый сосуд с образцом термостатируют в модельной среде при температуре 40 °С в течение 1, 3, 7, 10 сут в динамическом режиме. На каждом сроке модельная среда сливается, тот же образец заливается новой порцией среды. Последний 10-суточный экстракт (вытяжка) используется для санитарно-химических исследований;

второй сосуд с образцом термостатируют в модельной среде при температуре 40 °С в течение 7 сут без смены модельной среды. Готовая вытяжка используется для токсикологических исследований.

5.6. Приготовление экстрактов (вытяжек) из медицинских изделий, контактирующих с прямым кровотоком (например, катетеры внутрисосудистые, контейнеры для хранения крови и ее компонентов, материалы для эмболизации крупных сосудов). Экстракты (вытяжки) готовятся в дистиллированную воду при температуре 37±1 °С. Соотношение между массой образца и объемом модельной среды рассчитывается по формуле 4.1:

$$P = \frac{M}{V} \times K. \quad (4.1)$$

где P — соотношение между массой образца и объемом модельной среды, в г/л;

M — максимальный расход материала на одного пациента (г);

V — объем крови в организме человека (5 л);

K — коэффициент аггравации, равный 10.

Экспозиция составляет 72 ч.

Формула 1 может применяться для расчета соотношения между массой образца и объемом модельной среды при приготовлении экстрактов (вытяжек) из внутриматочных спиралей, имплантируемых изделий (кардиостимуляторы, клипсы, пластины для остеосинтеза) и иных подобных изделий. Экспозиция для имплантируемых изделий составляет 10 сут.

5.7. Условия приготовления экстрактов (вытяжек) из шовного материала: экстракты (вытяжки) готовятся в дистиллированную воду или 0,9 % раствор хлорида натрия при температуре  $37\pm 1$  °С и отношении длины нити к объему модельной среды 0,4 см : 1 см<sup>3</sup>; экспозиция 10 сут.

5.8. Для медицинских изделий, не вошедших в приложение 3 к настоящей инструкции, а также в пп. 5.1–5.7 настоящей инструкции, применяются следующие условия экстракции.

В зависимости от времени контакта медицинского изделия с организмом человека: если время контакта не превышает 10 мин, экспозиция — 4 ч; если время контакта не превышает 24 ч, экспозиция — 24 ч; если время контакта более 24 ч, экспозиция — 72 ч;

в отдельных случаях, если материал подвержен деструкции, сроки экстракции должны соответствовать пику максимальной миграции продуктов деструкции (обычно 20, 30 сут).

Отношение площади поверхности и (или) массы образца к объему модельной среды при экстрагировании приведено в приложении 5 к настоящей инструкции.

Температура экстракции  $37\pm 1$  °С.

5.9. Допускается использовать и другие отношения (масса/объем и площадь поверхности/объем) по сравнению с приведенными в приложении 5 к настоящей инструкции. При приготовлении вытяжек из образцов с высокой впитывающей способностью (порошки, вспененные материалы, изделия с пористой поверхностью) модельную среду добавляют до достижения необходимого объема экстракта (вытяжки). При исследовании абсорбентов и гидроколлоидов определяют «абсорбционную емкость» материала — количество модельной среды, абсорбированной материалом. Например, для получения соотношения 0,1 г/мл образца массой 1,0 г объем вытяжки должен быть на 10 мл больше «абсорбционной емкости» образца.

Для образцов небольшого размера производят экстракцию из нескольких штук изделий одновременно, чтобы объема экстракта (вытяжки) было достаточно для исследования. В зависимости от вида образца выбирают отношение массы (с точностью до 0,1 г) либо площади поверхности образца (с точностью до 1 см<sup>2</sup>) к объему модельной среды.

Если части/материалы образца невозможно разделить, не нарушая их целостности, и вычисленный объем модельной среды не покрывает образец (например, изделия сложной формы), используют минимальное, достаточное для выполнения исследований количество модельной среды, которое покрывает исследуемые поверхности, части образца.

## ГЛАВА 5 МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СЕНСИБИЛИЗИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ НА ЖИВОТНЫХ

1. Методы основаны на изучении потенциальной аллергенной способности в экспресс-тестах путем однократной внутрикожной сенсibilизации,



исключающей влияние факторов, обусловленных физико-химическими свойствами образца и особенностями путей поступления в организм. Это позволяет в короткие сроки получить доказательство аллергизирующих свойств и ориентировочно оценить опасность аллергена по силе специфического действия.

Метод применяется для медицинских изделий, контактирующих со слизистыми оболочками, с поврежденными поверхностями тела, с внутренней средой организма.

2. При проведении исследований используют следующее оборудование, материалы, реактивы:

весы лабораторные по ГОСТ OIML R 76-1 высокого класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г;

микрометр по ГОСТ 6507;

дозаторы лабораторные по ГОСТ 28311;

термостат электрический суховоздушный с автоматическим терморегулятором до 50 °С;

термометр жидкостный стеклянный по ГОСТ 29224 с диапазоном измерения температур от 0 до 100 °С и ценой деления 1 °С;

пинцет медицинский по ГОСТ 21241;

стакан Н-2-10 (25) ТХС по ГОСТ 25336;

цилиндр 1-100-1 по ГОСТ 1770;

вата медицинская гигроскопическая по ГОСТ 5556;

ножницы по ГОСТ 21239;

рН-метр любой марки с набором электродов;

вода дистиллированная и бидистиллированная по ГОСТ 6709;

спирт этиловый ректификат по ГОСТ 5962.

3. Экспресс-сенсibilизация осуществляется на модели воспроизведения гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) на белых мышах. В опытную и контрольную группы берут по 10–12 беспородных белых мышей. Животных сенсibilизируют 10 ммоль или 100 мкг изучаемого вещества однократно внутрикожно в основание хвоста туберкулиновым или микрошприцем. Нативное вещество растворяют в растворе Хенкса (рН 7,5) или стерильном физиологическом растворе таким образом, чтобы сенсibilизирующая доза на 1 животное содержалась в 30 мкл (целесообразно использовать 0,35 % рабочую концентрацию). Для водонерастворимых веществ в качестве растворителей используют диметилсульфоксид, этиловый спирт, ацетон в конечной концентрации не более 20 %, а также автоклавированное вазелиновое или растительное масло. Из рабочей концентрации вещества готовится в соотношении 1:1 смесь с иммуностимулятором — полным адьювантом Фрейнда (ПАФ) при их тщательном эмульгировании (перемешивании на магнитной мешалке). Опытным животным вводится по 60 мкл сенсibilизирующей дозы в ПАФ, контрольным — 60 мкл смеси ПАФ с растворителем (без исследуемого вещества).

При изучении сенсibilизирующей активности изделий из них готовят вытяжки (в раствор Хенкса или физиологический раствор). Условия приготовления вытяжек аналогичны таковым при санитарно-химических исследованиях. Термостатирование при 37 °С в течение 3-х сут.

Для внутрикожного введения применяют смесь испытуемой вытяжки (70 мкл) и ПАФ (30 мкл) на 1 животное.

4. Сенсibilизацию выявляют на 6-е сут опыта провокационными пробами — по тесту опухания лапы мыши и/или тесту опухания уха, а также с использованием лабораторных методик на оценку аллергической реакции, из которых наиболее технически проста в постановке и воспроизводима реакция специфического лейколизиса (РСЛЛ).

#### 4.1. Тест опухания лапы мыши (ТОЛМ).

В подушечку задней лапы (под апоневроз) контрольных и опытных животных вводят разрешающую дозу изучаемого вещества (100-150 мкг). При этом целесообразно для тестирования применять рабочие концентрации вещества, используемые для сенсibilизации, в объеме 40 мкл. Экстракты (вытяжки) из изделий вводят в объеме 100 мкл. О величине отека (показатель ТОЛМ), т. е. развитии ГЗТ, судят по разнице в толщине лапы, измеряемой до и через 24 ч после перкутанного тестирования инженерным микрометром (мм).

Сравнивают среднегрупповые показатели ТОЛМ опытных и контрольных животных в абсолютных (мм) и относительных (балл) единицах. Оценку ТОЛМ в баллах проводят по следующей шкале: 0 баллов — ТОЛМ до 0,1 мм; 1 балл — 0,11–0,20 мм; 2 балла — 0,21–0,30 мм; 3 балла — 0,31–0,40 мм; 4 балла — 0,41–0,50 мм; 5 баллов — 0,51 мм и более. У контрольных животных показатель ТОЛМ не должен превышать 10.

#### 4.2. Тест опухания уха мыши (ТОУМ).

Разрешающую дозу вещества в оптимальной концентрации наносят пипеточным дозатором по 25 мкл на кожу обеих сторон уха, фиксированного у основания глазным пинцетом. Показатель ТОУМ определяют по разнице в толщине уха, измеряемой микрометром до и через 24 ч после эпикутанного тестирования. Оптимальная концентрация вещества не должна вызывать неспецифического раздражения кожи (абсолютный показатель ТОУМ не более 3 мкм) и предварительно подбирается на 3-х интактных мышах. Чаще всего применяют для эпикутанного тестирования 0,1–10 % концентрации, а в качестве растворителей — ацетон, 70 % спирт, диметилсульфоксид, петролейный эфир.

Оценивают ГЗТ по абсолютному (мкм) и относительному (балл) показателю ТОУМ по специальной шкале. Относительный показатель ТОУМ (балл) соответствует величине отека уха (мкм): 0 баллов — 1–2 мкм; 1 балл — 3–7 мкм; 2 балла — 8–12 мкм; 3 балла — 13–17 мкм; 4 балла — 18–22 мкм; 5 баллов — 23 мкм и более и/или наличие геморрагий, некроза.

Сравнивают среднегрупповые абсолютные и относительные показатели ТОУМ контрольных и опытных животных.

#### 4.3. Реакция специфического лейколизиса (РСЛЛ).

Тест применим только для исследования аллергической реакции на образцы, растворимые в воде, диметилсульфоксиде, этиловом спирте и ацетоне. В контрольный ряд видалевских или центрифужных пробирок (по количеству животных контрольной и опытной группы) вносится пипеточным дозиметром по 20 мкл стерильного физиологического раствора или растворителя; в пробирки опытного ряда — 20 мкл исследуемого вещества в рабочей концентрации. Затем в

парные пробирки разливают по 50,0 мкл крови соответствующего животного с гепарином, цитратом натрия или 1,5 % трилоном Б. Пробирки встряхивают и помещают на 2-часовую инкубацию в термостат при 37 °С. Пробирки при термостатировании периодически встряхиваются. После инкубации содержимое пробирок перемешивается и в каждую вносится по 300 мкл 3 % водного раствора уксусной кислоты, подкрашенного раствором метиленового синего. Подсчет абсолютного количества лейкоцитов в парных пробах производят в счетной камере (Горяева или Фукса—Розенталя) и рассчитывают показатель реакции (%) по формуле 5.1:

$$\text{РСЛЛ} = \frac{L_{\text{контроль}} - L_{\text{опыт}}}{L_{\text{контроль}}} \times 100. \quad (5.1)$$

где L — количество лейкоцитов в контрольной и опытной пробах.

Реакцию расценивают как положительную при величине 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 % разведениям на физиологическом растворе. Более высокого разведения требуют вещества, обладающие выраженным раздражающим, и следовательно, цитотоксическим действием на клетки крови.

Конечная концентрация органических растворителей в рабочей дозе не должна превышать 5 %, за исключением диметилсульфоксида.

5. Оценка результатов исследования сенсибилизирующего действия медицинского изделия проводится с учетом статистической значимости возрастания среднегрупповых показателей аллергологического тестирования в опыте по сравнению с контролем по критерию X или t, а также частоте положительных результатов, полученных в тесте на РСЛЛ в соответствии с критериями оценки, приведенными в приложении 6 к настоящей инструкции.

Отсутствие статистической значимости возрастания среднегрупповых показателей аллергологического тестирования (в ТОЛМ, ТОУМ, РСЛЛ) в опыте по сравнению с контролем по критерию X или t, свидетельствует об отсутствии сенсибилизирующего действия.

## ГЛАВА 6 МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ МЕСТНОГО РАЗДРАЖАЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ НА КОЖУ

1. Метод основан на оценке изменения функционального состояния кожи лабораторного животного (проявлений воспалительной реакции — эритемы и/или отека) при нанесении на нее определенной дозы исследуемого образца, по которой судят о наличии и выраженности раздражающего кожу действия.

При значениях рН исследуемого образца менее или равных 2,0, более или равных 11,5, материал признают потенциальным раздражителем и его раздражающее действие не изучают.

2. При исследований используют следующее оборудование, материалы, реактивы:

весы лабораторные по ГОСТ OIML R 76-1 высокого класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г;

микрометр по ГОСТ 6507;

дозаторы лабораторные по ГОСТ 28311;

пинцет медицинский по ГОСТ 21241;

пипетка по ГОСТ 29227;

стакан Н-2-10 (25) ТХС по ГОСТ 25336;

вата медицинская гигроскопическая по ГОСТ 5556;

марля медицинская по ГОСТ 9412;

ножницы по ГОСТ 21239;

вода дистиллированная и бидистиллированная по ГОСТ 6709;

спирт этиловый ректификат по ГОСТ 5962.

3. Местное раздражающее действие водных экстрактов (вытяжек) из образцов на кожные покровы определяется путем расчета индекса местного раздражающего действия ( $I_{cut}$ ).

В качестве подопытных животных используют белых крыс массой 180–220 г.

Формируют однородную по массе (разница не более 10 %) с нормальным состоянием шерстного покрова и кожи группу животных (не менее 3-х особей).

Для каждого исследуемого образца и контрольной пробы за 1 сут до эксперимента на боковых поверхностях туловища животных выстригают (ножницами или электромашинкой) шерсть в виде кожного «окошка» площадью — 2 x 2 см. Между «окошками» шерстный покров составляет не менее 1 см. Применение эпиляторов недопустимо, пригодны для исследования только кожные «окошки» без видимых повреждений.

Исследования выполняют в течение 3-х дней открытым аппликационным способом путем ежедневного равномерного нанесения на кожные «окошки» водного экстракта (вытяжки) в дозе 0,02 см<sup>3</sup> на 1 см<sup>2</sup> кожного «окошка» с помощью пипеточного дозатора, аккуратно втирая экстракт (вытяжку) в поверхность «окошка» стеклянной палочкой. На контрольные «окошки» аналогично наносится дистиллированная вода в том же количестве.

Ежедневная экспозиция составляет 4 ч. На это время животные фиксируются в индивидуальных домиках (для исключения слизывания или механического снятия вещества с кожи) в условиях температуры окружающей среды, равной 17–25 °С.

По окончании экспозиции при необходимости остатки смывают ватным тампоном, смоченным в дистиллированной воде. Манипуляцию проводят аккуратно, не вызывая повреждения кожи, не менее 2-х раз, последним сухим тампоном осушают участок кожи.

4. Через 24 ч после заключительной аппликации водных экстрактов (вытяжек) на опытных и контрольных участках оценивают функциональное

состояние кожи: эритематозную реакцию — визуально по четкости и выраженности тона гиперемии, а также толщину кожной складки (ТКС), измеряемую микрометром до опыта (ТКС<sub>фон.</sub>) и через 24 ч после последнего воздействия (ТКС<sub>апл.</sub>).

Процедура измерения ТКС: фиксируя руками животное, захватывают пальцами рук кожу по обеим сторонам «окошка» и формируют кожную складку. Устанавливают измерительные плоскости микрометра таким образом, чтобы они полностью заходили за край складки в середине кожного «окошка», вращают микровинт за трещотку, сдвигая измерительные плоскости до появления 3-х щелчков. Затем обратным вращением микровинта уменьшают зажим и аналогично повторяют измерение еще дважды. Учитывают результат последнего измерения с точностью до 0,01 мм.

5. Оценку состояния кожи на опытных и контрольных участках по интенсивности эритематозной реакции и по величине отека (нарастанию толщины кожной складки) проводят в баллах согласно таблицам 1 и 2 приложения 7 к настоящей инструкции.

Индекс местного раздражающего кожу действия (далее –  $I_{cut}$ ) в баллах вычисляют по формуле 6.1:

$$I_{cut} = \frac{[(R+T)_0 - (R+T)_k]_1 + [(R+T)_0 - (R+T)_k]_2 + \dots + [(R+T)_0 - (R+T)_k]_n}{n}, \quad (6.1)$$

где  $R$  — выраженность эритематозной реакции в баллах на опытном (о) и контрольном (к) участках;

$T$  — выраженность отека кожи в баллах на опытном (о) и контрольном (к) участках;

1, 2, ..., n — порядковый номер животного;

n — количество животных в группе.

При исследовании местного действия образцов, которые могут окрашивать кожу (средства накожного применения, кремы и т. п.), оценку функционального состояния кожи проводят только по выраженности отека. В этом случае индекс местного раздражающего кожу действия ( $I_{cut}$ ) в баллах вычисляют по формуле 6.2:

$$I_{cut} = \frac{(T_0 - T_k)_1 + (T_0 - T_k)_2 + \dots + (T_0 - T_k)_n}{n}. \quad (6.2)$$

где  $T$  — выраженность отека кожи в баллах на опытном (о) и контрольном (к) участках;

1, 2, ..., n — порядковый номер животного;

n — количество животных в группе.

6. За результат исследования каждого образца принимают среднее арифметическое результатов определения разницы между суммами оценивающих величин эритемы и (или) отека в баллах на соответствующем опытном и

контрольном участках кожи каждого животного с учетом величины доверительной границы  $L$  при уровне вероятности  $p = 0,95$ .

Местное раздражающее кожу действие у образца отсутствует (условное обозначение  $I_{cut} = 0$  баллов), если значение индекса равно нулю или его сумма с величиной доверительной границы менее 1,0 балла ( $I_{cut} + L$  менее 1,0). При величине  $I_{cut} + L$ , равной 1,0 балла или более исследуемый образец обладает местным раздражающим кожу действием.

7. Определение местного раздражающего действия нативных образцов изделий на кожные покровы в острых и подострых экспериментах. Нативные образцы размером 2,5 x 2,5 см после непосредственного наложения на выстриженные накануне участки кожи белых крыс фиксируют на боковых участках спины животных (при отсутствии самоклеющегося эффекта образцы фиксируют с помощью полос лейкопластыря). Опытная и контрольная группы включают по 3 особи. Экспозиция составляет 24 ч (острый эксперимент), 2–6 сут (подострый эксперимент).

8. Индекс местного раздражающего кожу действия нативных образцов ( $I_{cut}$ ) в баллах определяют согласно пп. 4–6 настоящей инструкции.

## ГЛАВА 7

### МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ РАЗДРАЖАЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ НА СЛИЗИСТУЮ ОБОЛОЧКУ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА

1. Метод основан на оценке наличия и выраженности раздражающего слизистые оболочки действия водных экстрактов (вытяжек) из стоматологических материалов по изменению функционального состояния слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта лабораторных животных (проявление симптомов раздражения — гиперемии, отека) при внесении определенной дозы исследуемого образца.

2. При исследовании используют следующее оборудование, материалы, реактивы:

весы лабораторные по ГОСТ OIML R 76-1 высокого класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г;

дозаторы лабораторные по ГОСТ 28311;

пинцет медицинский по ГОСТ 21241;

ножницы по ГОСТ 21239;

стакан Н-2-10 (25) ТХС по ГОСТ 25336;

вата медицинская гигроскопическая по ГОСТ 5556;

марля медицинская по ГОСТ 9412;

вода дистиллированная и бидистиллированная по ГОСТ 6709;

спирт этиловый ректификат по ГОСТ 5962.

3. Испытания проводятся на белых крысах при внутрижелудочном введении экстрактов (вытяжек).

Для проведения эксперимента формируют 2 группы животных (опытная и контрольная) не менее чем по 5 особей в каждой. Животным опытной группы до кормления ежедневно в течение 10 дней внутрижелудочно вводят по 3 мл

7-суточной вытяжки. Контрольным животным в том же режиме вводят дистиллированную воду.

#### 4. Оценка результатов.

Через 10 дней от начала введения животных умерщвляют методом декапитации и после вскрытия регистрируют реакцию раздражения слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта. При этом макроскопически отмечают явления раздражения на слизистой желудочно-кишечного тракта (гиперемия, отек, образование язв и т. д.).

В случае выявления раздражающего действия у одного животного в группе исследование повторяют с целью исключения артефакта. При выявлении раздражения на слизистой оболочке желудочно-кишечного тракта у 2 и более животных в группе делается вывод о наличии раздражающего действия вытяжки; повторные исследования не проводятся.

## ГЛАВА 8 МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ РАЗДРАЖАЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ НА СЛИЗИСТУЮ ОБОЛОЧКУ ГЛАЗА

1. Принцип метода основан на оценке наличия и выраженности у исследуемого образца ирритативного (раздражающего) слизистые оболочки действия по изменению функционального состояния слизистых оболочек глаз лабораторных животных (проявление симптомов раздражения — гиперемии, отека, слезотечения) при внесении определенной дозы образца/экстракта (вытяжки). Метод адекватно характеризует опасность действия исследуемого образца на слизистые оболочки и других органов (полости рта, верхних дыхательных путей, желудочно-кишечного тракта).

2. Исследования по изучению раздражающего действия на слизистые оболочки глаза не проводят и образец признают потенциальным раздражителем, если:

- образец вызывает механические повреждения;
- образец вызывает раздражение кожи;
- pH образца менее/равен 2 или более/равен 11,5.

3. При исследовании используют следующее оборудование, материалы, реактивы:

весы лабораторные по ГОСТ OIML R 76-1 высокого класса точности, с наибольшим пределом взвешивания 200 г;

медицинские электронные весы для новорожденных — класс точности весов по ГОСТ 29329-92 III (средний);

дозаторы лабораторные по ГОСТ 28311;

пестик 1-2 по ГОСТ 9147;

пипетки разной вместимости 2 класса точности по ГОСТ 29227;

стакан Н-2-10 (20) ТХС по ГОСТ 25336;

ступка 2-3 по ГОСТ 9147;

вата медицинская гигроскопическая по ГОСТ 5556;

марля медицинская по ГОСТ 9412;

бумага фильтровальная лабораторная по ГОСТ 12026;  
рН-метр любой марки с набором электродов;  
стандарт-титры для приготовления буферных растворов для рН-метрии по ГОСТ 8.135 (допускается приготовление буферных растворов по ГОСТ 4919.2);  
вода дистиллированная и бидистиллированная по ГОСТ 6709;  
спирт этиловый ректификат по ГОСТ 5962.

4. В эксперименте используют здоровых молодых половозрелых кроликов одной линии, любого пола, массой от 2 до 3 кг.

Для предварительной оценки используют одно животное.

Если согласно сопроводительной документации на образец реакции раздражения слизистой оболочки не ожидается (например, когда значение рН изделия в пределах 2–11,5 или известно, что в составе изделия нет потенциальных раздражителей), предварительная оценка проводится на 3-х животных.

При выраженной реакции, полученной при предварительной оценке на одном животном, дальнейшие исследования не выполняют.

Если при исследовании твердых, жидких образцов или экстрактов (вытяжек) из них не наблюдается выраженной реакции, далее используют не менее 2-х животных.

5. Жидкий образец в нативном виде закапывают в объеме 0,05 мл в нижний отдел конъюнктивального мешка глаза.

Порошкообразный образец измельчают до пылеобразного состояния и затем, слегка уплотнив, аккуратно вводят в нижний отдел конъюнктивального мешка глаза такое количество образца, которое занимает объем 0,05 мл, но не более 50 мг.

Если исследуемый образец находится в баллоне под давлением, получают некоторое количество этого вещества и вводят 0,05 мл тем же способом, что и жидкий образец.

Образец в аэрозольной упаковке впрыскивают в охлажденную емкость и наносят способом для жидкого образца.

Для изучения раздражительного действия образцов, вызывающих механические повреждения, используются водные экстракты (вытяжки), приготовленные согласно гл. 4 настоящей инструкции.

6. В нижний конъюнктивальный свод правого глаза каждого животного однократно вносят (инстиллируют) пипеточным дозатором исследуемый образец согласно п. 5. гл. 8. настоящей инструкции, слегка оттягивая нижнее веко.

В левый глаз (контрольный) аналогично в том же объеме вносят дистиллированную воду.

7. Визуальное наблюдение за состоянием слизистой оболочки и конъюнктивы глаз подопытных животных с регистрацией признаков раздражения слизистой оболочки (блефароспазм, птоз, слезотечение, инъектирование сосудов, отек век) и их выраженности проводят через 24 ч после инстилляции.

8. Установление раздражительного действия из образцов проводится путем определения индекса раздражительного действия ( $I_{ir}$ ).



Характеристику выраженности симптомов раздражения слизистой оболочки опытного и контрольного глаза и их оценку в баллах проводят согласно приложению 8 к настоящей инструкции.

9. Индекс ирритативного действия на слизистую оболочку глаза ( $I_{ir}$ ) в баллах вычисляют по формуле 8.1:

$$I_{ir} = \frac{[(R + T + B)_0 - (R + T + B)_k]_1 + \dots + [(R + T + B)_0 - (R + T + B)_k]_n}{n} \quad (8.1)$$

где R — выраженность гиперемии в баллах;

T — выраженность отека в баллах;

B — выраженность выделений в баллах;

o — результаты суммарной оценки состояния слизистой оболочки опытного глаза;

k — результаты суммарной оценки состояния слизистой оболочки контрольного глаза;

1, ..., n — порядковый номер животного;

n — количество животных в группе.

10. За результат исследования принимают среднее арифметическое результатов определения разницы между суммами оценивающих величин гиперемии, отека и выделений из глаз в баллах на соответствующем опытном и контрольном глазах у каждого животного с доверительной границей (L) при уровне вероятности  $p = 0,95$ .

Ирритативное действие на слизистые оболочки глаз у исследуемого образца отсутствует (условное обозначение  $I_{ir} = 0$  баллов), если значение индекса равно нулю или его сумма с величиной доверительной границы менее 1,0 балла ( $I_{ir} + L$  менее 1,0). При величине  $I_{ir} + L$ , равной 1,0 балла или более, исследуемый образец обладает ирритативным действием.

## ГЛАВА 9

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕСТНОГО РАЗДРАЖАЮЩЕГО И СЕНСИБИЛИЗИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ НА ДОБРОВОЛЬЦАХ

1. Метод основан на оценке раздражающего действия образца на добровольце постановкой первичной эпикутанной аппликации, которая одновременно является сенсibiliзирующей, и определении сенсibiliзирующей способности образца постановкой провокационной (вторичной) эпикутанной аппликации.

На предварительном этапе для уверенности в том, что образец не представляет значительного риска для здоровья добровольца, анализируется предоставленная информация о его токсических свойствах (острая кожная токсичность, раздражающее действие на кожу и слизистые оболочки, сенсibiliзирующая способность), полученная в исследованиях *in vitro* и *in vivo*.

2. В ходе исследования используют следующее оборудование, материалы, реактивы:

весы лабораторные по ГОСТ OIML R 76 1 высокого класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г;  
дозаторы лабораторные по ГОСТ 28311;  
линейка измерительная металлическая по ГОСТ 427;  
мешалка магнитная;  
ножницы по ГОСТ 21239;  
пинцеты медицинские по ГОСТ 21241;  
палочка стеклянная;  
пестик 1-2 по ГОСТ 9147;  
пипетки разной вместимости 2 класса точности по ГОСТ 29227;  
стакан Н-2-10 (20) ТХС по ГОСТ 25336;  
вата медицинская гигроскопическая по ГОСТ 5556;  
бумага фильтровальная лабораторная по ГОСТ 12026;  
лейкопластырь медицинский;  
марля медицинская по ГОСТ 9412;  
пленка полиэтиленовая, марка Н по ГОСТ 10354;  
фильтр «синяя лента»;  
жидкое мыло по ГОСТ 31696;  
рН-метр любой марки с набором электродов;  
стандарт-титры для приготовления буферных растворов для рН-метрии по ГОСТ 8.135 (допускается приготовление буферных растворов по ГОСТ 4919.2);  
вода дистиллированная и бидистиллированная по ГОСТ 6709;  
спирт этиловый ректификат по ГОСТ 5962.

3. Оценка проводится путем определения индексов раздражающего действия на кожу  $I_{cut}$  и сенсибилизирующей способности  $I_s$  образца.

4. К исследованиям привлекаются лица не моложе 18 лет и не старше 65 лет, добровольно изъявившие желание участвовать в них, на основе двустороннего письменного соглашения.

Предварительно кандидат в добровольцы информируется персоналом исследовательской лаборатории о целях, методах, условиях и порядке проведения, ожидаемых результатах, потенциальном прогнозируемом и непрогнозируемом риске исследования, неудобствах, которые могут быть с ним связаны, о правах добровольца воздержаться от исследования той или иной продукции или аннулировать свое согласие на участие в исследованиях, на защиту от вредного воздействия, на все возможные меры предосторожности и оказание необходимой медицинской помощи (все перечисленное отражается в информированном соглашении с добровольцем).

К исследованиям в качестве добровольца не допускаются лица, имеющие следующие противопоказания по состоянию здоровья (по данным медицинской документации, осмотра врача):

любые нозологические формы заболеваний в острой форме и хронические заболевания в стадии обострения, а также в период реконвалесценции;  
хронические заболевания кожи;

хронические заболевания печени;  
хронические заболевания сердечно-сосудистой системы и бронхолегочного аппарата с выраженной недостаточностью функции;  
органические заболевания центральной нервной системы со стойкими выраженными нарушениями функции, психические заболевания;  
любые аутоиммунные и аллергические заболевания (в т. ч., в анамнезе);  
непереносимость конкретных наименований средств и препаратов;  
беременность и кормление грудью.

Добровольцы обязаны строго выполнять условия информированного соглашения и инструкции персонала.

Группу добровольцев формируют числом не менее 5 человек.

5. Окклюзии для аппликаций на кожу добровольцев изготавливают из медицинской марли в виде четырехслойных тампонов размером  $1 \times 1$  см, с накладками из полиэтиленовой пленки размером  $2 \times 2$  см и полоски медицинского пластыря размером  $3-4 \times 5-6$  см.

6. Для образцов вязкой консистенции (кремо-, геле-, мазе- и пастообразные) — непосредственно на марлевый тампон последовательно наносят шпателем образец в нативном виде и взвешивают на лабораторных весах, доводя массу навески на тампоне до  $(0,05 \pm 0,001)$  г (разовая аппликационная доза).

Для образцов твердой консистенции (например, порошок) — взвешивают на лабораторных весах в стакане 1,0 г исследуемого образца. Кристаллические, крупнозернистые образцы предварительно измельчают до порошкообразного состояния. Готовят исходный раствор, эмульсию или суспензию с массовой долей образца 50 %, дозируя пипеткой (дозатором) в стакан с навеской исследуемой пробы растворитель с последующим интенсивным перемешиванием на магнитной мешалке.

Для оценки конечного продукта (например, салфетки медицинские, бинт, манжета) готовят вытяжку в растворитель при отношении площади образца исследуемой пробы к объему растворителя 1:2 путем вырезания ножницами образца размером  $2,5 \times 2,5$  см (площадь  $4 \text{ см}^2$ ), внесения измельченного ножницами образца в стаканчик ( $10-20 \text{ см}^3$ ), дозирования пипеткой (дозатором)  $8 \text{ см}^3$  растворителя, инкубации в течение 24 ч в суховоздушном термостате при температуре  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  при периодическом (5–6 раз) перемешивании содержимого стаканчика стеклянной палочкой. Водную фазу отделяют фильтрацией в стакан через фильтр «синяя лента» с помощью делительной воронки.

В качестве растворителя используют дистиллированную воду.

Жидкие образцы подвергаются исследованию в нативном виде.

Приготовленные исходные растворы, эмульсии, суспензии, экстракты или нативные жидкие образцы дозируют пипеткой по  $0,05 \text{ см}^3$  на марлевые тампоны, размещенные на полиэтиленовых накладках.

7. Исследования методом закрытой эпикутанной «лоскутной» (компрессной) пробы.

7.1. Постановка первичной эпикутанной аппликации.

Первичную эпикутанную аппликацию выполняют наложением на 24 ч на участок неповрежденной кожи внутренней поверхности предплечья и/или плеча

добровольца (допускается выполнять аппликации на участках кожи в области спины и живота). Аппликация наносится после предварительной обработки кожных участков раствором этилового спирта с объемной долей 60 %.

Контрольную эпикутанную аппликацию выполняют аналогично опытной первичной, дозируя на марлевый тампон  $0,05 \text{ см}^3$  дистиллированной воды.

Первичную и контрольную аппликации через 24 ч снимают, остатки с участков аппликации кожи смывают струей теплой воды с использованием косметического жидкого мыла или ватным тампоном с растворителем, не влияющим на функциональное состояние кожи (например, раствором с объемной долей этилового спирта в пределах 20–60 %). Через 1, 24 и 48 ч регистрируют функциональное состояние кожи на месте аппликации с оценкой выраженности эритематозной реакции.

При возникновении у добровольца в период аппликационной экспозиции негативных субъективных симптомов раздражающего действия (ощущение зуда, жжения, болезненности) даже слабой (переносимой) интенсивности со стороны опытного участка кожи аппликацию немедленно снимают. В этом случае, а также при определении эритемы после первичной аппликации (при отсутствии таковой на контрольном), первичную аппликацию у конкретного добровольца повторяют на другом участке кожи, разбавляя дистиллированной водой исследуемые раствор, эмульсию, суспензию или нативный образец не менее чем в 2 раза.

В случае появления в процессе экспозиции и после завершения повторной первичной аппликации негативных проявлений в виде субъективных симптомов раздражения и (или) эритематозной реакции кожи только у одного добровольца (с повышенной чувствительностью к данному образцу) он исключается из дальнейших исследований.

При регистрации у двух (и более) добровольцев негативных проявлений дальнейшие исследования не выполняют, делают вывод о том, что образец обладает раздражающим действием на кожу (условное обозначение  $I_{\text{cut}} = 1$  балл).

#### 7.2. Постановка провокационной (вторичной) эпикутанной аппликации.

При условии отсутствия субъективных симптомов или объективных признаков раздражающего действия образца ( $I_{\text{cut}} = 0$  баллов) через 24 ч после первичной аппликации на «чистый» участок неповрежденной кожи рядом с первичной аппликацией (на расстоянии не менее 2 см) аналогичным образом накладывают марлевый тампон с той же дозой исследуемого образца, а также выполняют повторную контрольную аппликацию с дистиллированной водой (на том же первичном участке кожи). Участки аппликации отмечают маркером.

Возникновение у одного или нескольких добровольцев в период выполнения провокационной эпикутанной аппликации субъективных симптомов раздражающего действия (зуд, жжение, болезненность), в т. ч., на кожных участках первичной аппликации, свидетельствует о повышенной чувствительности. Эпикутанную пробу с исследуемым образцом немедленно прекращают, делают вывод о том, что образец обладает сенсibilизирующей способностью (условное обозначение  $I_s = 1$  балл).

Провокационную и контрольную эпикутанную аппликации через 24 ч снимают, остатки с участков аппликации кожи смывают струей теплой воды с

использованием косметического жидкого мыла или ватным тампоном, смоченным раствором с объемной долей этилового спирта 20 %, и после этого через 1, 24 и 48 ч одновременно на опытных и контрольном кожных участках аппликаций визуально регистрируют характер и выраженность объективных кожных симптомов и учитывают выраженность субъективных симптомов сенсibiliзирующего действия.

#### 8. Учет и оценка результатов первичной аппликации.

Оценку раздражающего действия образца проводят у каждого добровольца по визуальному учету наличия и интенсивности эритематозной реакции кожи на участках первичной и контрольной эпикутанных аппликаций через 1, 24 и 48 ч с оценкой ее выраженности в баллах по шкале в соответствии с таблицей 1 приложения 9 к настоящей инструкции.

#### 9. Учет и оценка результатов провокационной аппликации.

Учет сенсibiliзирующего действия исследуемых образцов проводят у каждого добровольца через 24, 48 и 72 ч после завершения провокационной эпикутанной аппликации по наличию и интенсивности субъективных симптомов, а также объективных проявлений воспалительной реакции кожи на участках провокационной (вторичной) и контрольной эпикутанных аппликаций с оценкой их выраженности в баллах по таблице 2 приложения 9 к настоящей инструкции.

Возможное раздражающее и сенсibiliзирующее действие образца при остром воздействии на кожу человека оценивают по индексам раздражающего действия на кожу  $I_{cut}$  и сенсibiliзирующей способности  $I_s$  исследуемого образца в баллах, вычисляемых по формуле 9.1:

$$I_{cut}(I_s) = ((H_o - H_k)_1 + (H_o - H_k)_2 + \dots + (H_o - H_k)_n) / n. \quad (9.1)$$

где  $H$  — выраженность у добровольца симптомов раздражающего действия (эритематозной реакции кожи) или объективных и субъективных симптомов сенсibiliзирующего действия в баллах соответственно на участках кожи первичной или провокационной опытной и контрольной эпикутанных аппликаций;

о — опытная аппликация;

k — контрольная аппликация;

1, 2, , , n — порядковый номер добровольца;

n — число добровольцев.

За результат исследований раздражающего действия или сенсibiliзирующей способности принимают среднее арифметическое результатов определения разницы выраженности эритематозной реакции кожи на участке первичной аппликации или выраженности объективных и субъективных симптомов сенсibiliзирующего действия в баллах на участке кожи провокационной и соответствующих участках контрольных эпикутанных аппликаций с учетом величины доверительной границы  $L$  при уровне вероятности  $p = 0,99$ .

Расчет величины доверительной границы случайной погрешности измерения проводят в соответствии с приложением 10 к настоящей инструкции.

10. Раздражающее действие образца при контакте с кожей отсутствует ( $I_{\text{cut}} = 0$  баллов), если значение индекса равно нулю или сумма индекса с величиной доверительной границы менее одного балла ( $I_{\text{cut}} + L < 1,0$ ).

Сенсибилизирующая способность образца при контакте с кожей отсутствует ( $I_s = 0$  баллов), если значение индекса равно нулю или сумма индекса с величиной доверительной границы менее одного балла ( $I_s + L < 1,0$ ).

Образец обладает раздражающим действием и (или) сенсибилизирующей способностью и потенциально аллергоопасен (условное обозначение соответственно  $I_{\text{cut}} = 1$  балл и  $I_s = 1$  балл), если сумма значения соответствующего индекса и величины доверительной границы равна или превышает 1,0 балл ( $I_{\text{cut}} + L \geq 1,0$ ;  $I_s + L \geq 1,0$ ).

## ГЛАВА 10 МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ НА ПИРОГЕННОСТЬ *IN VIVO*

1. Метод заключается в оценке пирогенных реакций вытяжек из образцов путем анализа изменения температуры тела у лабораторных кроликов после внутривенной инъекции исследуемой вытяжки из образца.

Тест на пирогенность *in vivo* предназначен для определения пирогенности, обусловленной материалом, эндотоксином грамотрицательных бактерий или бактериальным экзотоксином.

В тесте на пирогенность *in vivo* исследуются стерильные изделия или материалы.

Исследование пирогенности *in vivo* выполняют в случаях:

запуска нового производства;

изменения технологического процесса;

для вновь разработанных медицинских изделий.

2. Испытания производят на здоровых кроликах обоего пола, не альбиносах, массой 2–3,5 кг, содержащихся на полноценном рационе.

Каждый кролик должен находиться в отдельной клетке в помещении, изолированном от шума с температурой окружающего воздуха 18–22 °С (колебания температуры не должны превышать 3 °С) и относительной влажностью 40–80 %. При уборке клеток и взвешивании животных оберегают от возбуждения (шума и резких движений). В течение недели, предшествующей опыту, кролики не должны терять в массе, взвешивают их до дачи корма не менее 3-х раз через день.

3. При исследовании используют следующее оборудование, материалы, реактивы:

весы лабораторные по ГОСТ OIML R 76-1 высокого класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г;

медицинские электронные весы для новорожденных — класс точности весов по ГОСТ 29329-92 III (средний);

шприцы инъекционные однократного применения по ГОСТ 24861-91;  
пинцет медицинский по ГОСТ 21241;  
стакан Н-2-10 (25) ТХС по ГОСТ 25336;  
термометр электронный для измерения температуры тела;  
цилиндр 1-100-1 по ГОСТ 1770;  
вата медицинская гигроскопическая по ГОСТ 5556;  
марля медицинская по ГОСТ 9412;  
ножницы по ГОСТ 21239;  
вода дистиллированная и бидистиллированная по ГОСТ 6709;  
спирт этиловый ректификат по ГОСТ 5962;  
раствор физиологический стерильный апиrogenный (0,9 % раствор натрия хлорида для инъекций).

#### 4. Приготовление экстракта (вытяжки).

Посуда для приготовления экстрактов, шприцы и иглы для инъекций должны быть стерильными и апиrogenными, что обеспечивается нагреванием при температуре 250 °С в течение 30 мин в сухожаровом шкафу. Для приготовления экстрактов используют апиrogenный 0,9 % раствор натрия хлорида для инъекций. Допускается использовать для приготовления вытяжки воду дистиллированную и бидистиллированную стерильную. При этом после завершения экстракции в вытяжку добавляют навеску соли натрия хлорида для получения 0,9 % раствора натрия хлорида, который используют в эксперименте. Медицинские изделия, применяемые для инфузий, трансфузий и хранения жидкостей (например, системы инфузионные, шприцы, контейнеры), наполняются модельной средой до полного заполнения.

5. Испытание производится в отдельной комнате с постоянной температурой, не отличающейся от температуры помещения, в котором кролики постоянно содержались до опыта, более чем на  $\pm 2,00$  °С. Все манипуляции во время экспериментов должны производиться с соблюдением правил асептики.

До и во время эксперимента животные корм не получают, воду дают без ограничения.

Кролики, впервые отобранные для испытаний на пирогенность, проверяются на реактивность путем внутривенного введения 3,0 мл/кг веса животного 0,9 % стерильного апиrogenного раствора хлорида натрия. Пригодными для экспериментов считаются кролики, демонстрирующие индивидуальное изменение температуры не более чем на  $\pm 0,40$  °С.

Для исследования одной вытяжки из образца используют 3-х кроликов. Группа должна состоять из животных, разнящихся между собой по весу не более чем на 0,5 кг.

Ректальную температуру у кроликов измеряют с точностью до 0,1 °С медицинским электронным термометром с термочувствительным датчиком. Датчик термометра вводят в прямую кишку на глубину 5–7,5 см (в зависимости от массы кролика) за внутренний сфинктер на время, необходимое для достижения максимальной температуры. Исходная температура животных должна быть в пределах 38,50–39,50 °С и не различаться в группе более чем на 1,00 °С. Кролики с температурой выше 39,50 °С для опыта не пригодны.

## 6. Описание эксперимента.

Перед введением вытяжки у кроликов дважды с интервалом 30 мин измеряют температуру. Различия в показаниях температуры не должны превышать  $\pm 0,20$  °С, в противном случае кролики для испытания не используются. Результат последнего измерения принимают за исходную температуру.

Стерильную вытяжку, приготовленную на 0,9 % растворе хлорида натрия, предварительно нагретую до 37 °С, в количестве 3,0 мл/кг массы тела кролика вводят в ушную вену в течение 2 мин не позднее 15–30 мин после последнего измерения температуры. Для каждого кролика берут отдельные стерильные шприц и иглу. Последующие измерения температуры после внутривенного введения вытяжки производят трижды: первое измерение проводят через 30 мин после внутривенного введения вытяжки; второе — через 1 ч после первого; третье — 1 ч после второго.

Животным группы отрицательного контроля вводится 0,9 % стерильного апиrogenного раствора хлорида натрия в объеме 3,0 мл/кг массы тела кролика.

## 7. Учет и оценка результатов.

Учитывается максимальное повышение температуры из трех измерений у каждого кролика по сравнению с исходным значением. В случае снижения индивидуальной температуры тела кроликов в ответ на внутривенное введение такое изменение температуры учитывают как нулевое.

Вытяжка из изделия считается апиrogenной, если сумма максимальных повышений температуры у 3-х кроликов меньше или равна 1,40 °С, при этом индивидуальное повышение температуры у кролика должно быть не более 0,50 °С.

В случаях, когда сумма повышений температур у 3-х кроликов превышает 1,40 °С (т. е., 1,41 °С и более), испытания этой же вытяжки повторяют на 3-х других кроликах. Вытяжка из изделия считается апиrogenной, если сумма повышений температуры у 6 кроликов меньше или равна 2,80 °С, при этом индивидуальное повышение температуры у кролика не более 0,50 °С.

8. Кролики, бывшие в опыте, могут быть использованы повторно в исследованиях на пирогенность, но не ранее, чем через 3-е сут, при условии, что испытываемая вытяжка была апиrogenной. В случае если испытываемая вытяжка оказалась пирогенной, кролики могут быть использованы для дальнейших опытов через 2 недели.

## ГЛАВА 11

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ НА ПИРОГЕННОСТЬ В LAL-ТЕСТЕ

1. Методы основаны на оценке потенциальной пирогенности исследуемого образца путем детекции содержания эндотоксина *in vitro*.

Содержание бактериальных эндотоксинов определяют с помощью реактива, представляющего собой лизат клеток крови (амебоцитов) мечехвоста *Limulus polyphemus* (LAL-реактив). LAL-реактив специфически



реагирует с бактериальными эндотоксинами, в результате чего происходит изменение реакционной смеси, пропорциональное концентрации эндотоксина.

В LAL-тесте возможно определение эндотоксина в вытяжках качественным методом (гель-тромб метод) или количественным (хромогенный метод на основе ферментной реакции окрашивания после расщепления синтетического пептид-хромогенного комплекса).

Испытание осуществляют любым методом, описанным в настоящей главе инструкции. В случае сомнений или разногласий окончательное заключение принимают на основании результатов, полученных при испытании с помощью гель-тромб метода.

2. Гелевый метод основан на энзиматической реакции, при которой бактериальный эндотоксин (пироген) вызывает мутность и загущение LAL-реактива вплоть до образования плотного геля.

2.1. При исследовании используют следующее оборудование, материалы, реактивы:

набор для теста (LAL-реактив, вода для бактериального эндотоксина (далее — вода для БЭТ), блокатор глюкозана, бактериальный эндотоксин);

дозаторы лабораторные с переменным объемом 0,1-5000 мкл по ГОСТ 28311;

пробирки биологические круглодонные 16 x 100 мм из стекла марки НС-1 по ГОСТ 19808-86;

дозаторы лабораторные с переменным объемом 0,1-5000 мкл по ГОСТ 28311;

настольный шейкер;

баня водяная с терморегулятором, позволяющая поддерживать температуру (по ГОСТ 12026).

Материалы не должны содержать эндотоксины.

2.2. Описание испытания.

В круглодонные пробирки диаметром 10 мм вносят равные объемы испытуемого раствора и LAL-реактива (по 0,1 мл). Реакционные смеси аккуратно перемешивают и инкубируют при температуре  $37 \pm 1$  °С в течение  $60 \pm 2$  мин. Во время инкубирования следует избегать вибрации и ударов. По истечении указанного срока визуально регистрируют результаты как положительные или отрицательные.

2.3. Оценка результатов.

Положительная реакция (+) характеризуется образованием плотного геля, который не разрушается при аккуратном однократном переворачивании пробирки на 180°; отрицательная (–), напротив, отсутствием такого геля, т. е. эндотоксина (апирогенность образца).

3. В основе хромогенного кинетического метода оценки уровня эндотоксинов лежит ферментативная реакция; в результате которой эндотоксин, содержащийся в исследуемой пробе, активирует в лизате профермент, который в свою очередь способствует возникновению активного фермента, катализирующего отщепление п-нитроанилина (pNA, краситель) в бесцветном субстрате.

3.1. Набор для теста включает отрицательный контроль, которым является вода для БЭТ, и стандарт эндотоксинов. Стандарт эндотоксина растворяется в апиrogenной воде согласно инструкции производителя таким образом, чтобы получился базовый раствор эндотоксина с содержанием 50 МЕ/мл. Другие стандартные растворы для построения калибровочного графика получают разведением базового раствора. Калибровочная кривая и тестирование проб делаются одновременно в двух параллельных сериях по методике согласно инструкции фирмы-производителя.

3.2. При исследовании используют следующее оборудование, материалы, реактивы:

набор для теста (лизат с хромогенным субстратом, рабочий стандартный эндотоксин, вода для БЭТ, буфер для устранения возможного интерференционного эффекта, блокатор глюкозонамов);

микротитрационная планшета;

пробирки биологические круглодонные 16 x 100 мм из стекла марки НС-1 по ГОСТ 19808-86;

дозаторы лабораторные с переменным объемом 0,1-5000 мкл по ГОСТ 28311;

настольный шейкер;

аналитические весы с точностью 0,01 мг;

баня водяная с терморегулятором, позволяющая поддерживать температуру по ГОСТ 12026;

калиброванный цифровой таймер;

ридер микропланшетный (фотометр);

компьютер с программным обеспечением для ридера (фотометра).

Материалы не должны содержать эндотоксины.

3.3. Описание исследования.

В лунки микротитрационной планшета (в двух повторностях, по 2 на каждую группу) раскапывают исследуемую вытяжку, отрицательный контроль (воду для БЭТ) и растворы разведенного эндотоксина в заданных концентрациях. Туда же добавляется смесь хромогенного субстрата и лизата амебоцитов, планшет помещается для термостатирования в условиях, установленных производителем LAL-реактива (обычно  $37 \pm 1$  °C). Для дозирования каждого стандарта и каждой пробы всегда используется новый наконечник. После инкубации планшет помещается в ридер (фотометр) для фотометрического измерения высвобождаемого рNA (при 405 нм). Концентрация эндотоксина в пробе рассчитывается относительно калибровочного графика.

3.4. Оценка результатов.

Вытяжка из образца считается апиrogenной, если концентрация эндотоксинов статистически значимо (по критерию Стьюдента  $t$ ,  $p < 0,05$ ) не превышает значений отрицательного контроля. Оценка результатов проводится при условии соблюдения критериев достоверности теста, указанных в инструкции фирмы-производителя тест-набора.

## ГЛАВА 12

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ НА ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ

1. Методы основаны на оценке *in vitro* жизнеспособности клеток млекопитающих в условиях их культивирования в контакте с образцом или вытяжкой. Цитотоксическое действие образца или вытяжки определяется следующим биологическим параметрам: лизис клеток, замедление их роста, угнетение метаболической активности, потеря способности размножаться и т. д.).

Исследования на цитотоксичность производят на перевиваемых клеточных линиях, а также первичных клеточных культурах фибробластов, керато-, гепато-, тимоцитов и т. д.

2. Для приготовления вытяжек могут использоваться различные модельные среды: культуральная среда с сывороткой, культуральная среда без сыворотки, физиологический солевой раствор, раствор Хонкса, очищенная вода, 0,1 % раствор диметилсульфоксида в культуральной среде.

Если необходимо, материалы, являющиеся суперабсорбентами, предварительно погружают в питательную среду, используемую для культивирования, а потом переносят в культуру, чтобы избежать сорбции культуральной среды в сосуде, используемом для исследования.

Жидкости тестируют прямым осаждением или осаждением на биологически инертную абсорбирующую матрицу (фильтровальные диски).

Для исследования используют только стерильные вытяжки или образцы.

Если вытяжки перед исследованием фильтруют, центрифугируют или обрабатывают каким-либо другим способом, это вносится в окончательный отчет.

3. Для экспресс-тестирования цитотоксичности образцов/вытяжек используется метилтетразолиевый тест (МТТ).

Для дополнительного исследования (например, уточнения механизма цитотоксического действия) образцов/вытяжек могут применяться цитофлуориметрические, микроскопические методы анализа скорости роста культуры (прижизненный подсчет клеток), скорости клеточного деления (анализ распределения по стадиям клеточного цикла), клеточной гибели (некроз, апоптоз), повреждения ДНК (comet-тест, микроядерный тест, тест на индукцию хромосомных aberrаций). Длительность инкубации с образцом или вытяжкой может составлять 1–14 сут в зависимости от свойств изделия, выбранного метода исследования.

4. Метод оценки цитотоксичности медицинских изделий в МТТ тесте.

В основе метода МТТ лежит способность митохондриальных дегидрогеназ живых клеток восстанавливать желтую соль бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия (МТТ) в пурпурно-синие внутриклеточные кристаллы формазана, растворимые в ДМСО. Уменьшение оптической плотности в опытных пробах по сравнению с контрольными, регистрируемое на планшетном ридере (фотометре), является основанием для заключения о цитотоксическом действии вещества на клетки.

4.1. Для исследования используют следующее оборудование, материалы, реактивы:

питательная среда DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium);  
эмбриональная телячья сыворотка;  
L-глутамин;  
раствор антибиотиков (AAS, Antibiotic-antimycotic solution);  
раствор трипсина-ЭДТА 0,25 %;  
диметилсульфоксид;  
МТТ (бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия или набор для МТТ (например, CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS), Promega, США);  
раствор физиологический стерильный (0,9 % раствор натрия хлорида для инъекций);  
флаконы культуральные площадью 25 см<sup>2</sup>;  
пробирки центрифужные типа эппендорф 1,5-2,0 мл;  
пробирки центрифужные 15 мл;  
планшеты культуральные плоскодонные 96-луночные;  
ламинарный бокс 2 класса биобезопасности;  
СО<sub>2</sub>-инкубатор;  
центрифуга настольная для пробирок на 15 мл;  
микроскоп инвертированный;  
камера Горяева для подсчета клеток;  
дозаторы лабораторные с переменным объемом 0,1-5000 мкл по ГОСТ 28311;  
дозаторы 8-канальные с переменным объемом 20-100 мкл;  
планшетный ридер (фотометр) со светофильтрами, близкими к 490, 530 и 620 нм.

4.2. В каждом эксперименте присутствуют пробы отрицательного, положительного контролей и контроля неспецифического окрашивания образца.

Отрицательный контрольный образец — в качестве контроля для материала или изделия используется, например, полиэтилен высокой плотности, в качестве контролей для вытяжек — модельная среда.

Положительный контрольный образец — в качестве контроля для материала или изделия используется, например, стабилизированный оловоорганический поливинилхлорид; разведения фенола или этанола — в качестве контроля для вытяжек.

Контроль неспецифического окрашивания образца — модельная среда с образцом или вытяжкой помещается в лунки без клеточного материала.

#### 4.3. Проведение исследования.

Для исследования используется приготовленная суспензия клеток — 500 тыс. клеток в 10 мл полной питательной среды (90 % DMEM, 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 2 mM L-глутамин и 1 % AAS). Клетки высеваются в 96-луночный планшет в количестве 100 мкл клеточной суспензии на лунку (5 тыс. клеток в каждой лунке) и помещаются для культивирования в СО<sub>2</sub>-инкубатор.

Спустя 24 ч культивирования в лунках планшета (не менее 6 на каждую группу эксперимента) меняют культуральную среду на модельную с

исследуемыми образцами или вытяжками, растворами или образцами отрицательного и положительного контролей. В предварительно оставленные лунки без клеточного материала добавляется модельная среда (не менее 6 лунок), модельная среда с исследуемым образцом или вытяжкой (не менее 6 лунок). После периода инкубации (длительностью 24 ч) определяют эффект цитотоксичности.

Для этого клетки инкубируются в течение 2 ч с 20 мкл рабочего раствора МТТ (5 мг/мл физиологического раствора) в условиях CO<sub>2</sub>-инкубатора. Через 2 ч в лунках с культурой клеток модельная среда заменяется на раствор ДМСО. Планшет аккуратно встряхивается до растворения кристаллов формазана. С помощью планшетного ридера (фотометра) определяется оптическая плотность каждой лунки и фоновое поглощение (методика окрашивания и измерения может быть видоизменена в соответствии с рекомендациями производителя используемого реактива).

#### 4.4. Оценка и интерпретация результатов.

В исследовании оценивается выживаемость клеток в присутствии испытуемого вещества. Рассчитывается по формуле 12.1:

$$\text{Выживаемость} = (\text{ОП}_o - \text{ОП}_c) / (\text{ОП}_k - \text{ОП}_c) \times 100 \%. \quad (12.1)$$

где ОП<sub>o</sub> — средняя оптическая плотность опытных лунок;

ОП<sub>к</sub> — средняя оптическая плотность в лунках отрицательного контроля;

ОП<sub>с</sub> — средняя оптическая плотность модельной среды.

Образец обладает цитотоксичностью, если выживаемость клеток в пробах опытной группы 70 % и менее.

5. Исследование цитотоксичности медицинских изделий методом анализа роста клеток в культуре.

Оценивается цитотоксическое действие образцов/вытяжек на рост и деление клеток в культуре методом подсчета количества клеток в течение 14 сут культивирования.

5.1. Для исследования используют следующее оборудование, материалы, реактивы:

питательная среда DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium);

эмбриональная телячья сыворотка;

L-глутамин;

раствор антибиотиков (AAS, Antibiotic-antimycotic solution);

раствор трипсина-ЭДТА 0,25 %;

пробирки центрифужные типа эппендорф 1,5-2,0 мл;

пробирки центрифужные 15 мл;

планшеты культуральные плоскодонные 6- или 12-луночные или чашки

Петри;

ламинарный бокс 2 класса биобезопасности;

CO<sub>2</sub>-инкубатор;

центрифуга настольная для пробирок на 15 мл;

микроскоп инвертированный;  
камера Горяева для подсчета клеток;  
дозаторы лабораторные с переменным объемом 0,1-5000 мкл по ГОСТ 28311.

5.2. В исследовании должны присутствовать пробы отрицательного и положительного контролей. В качестве контролей используются образцы и растворы, описанные в п. 4. гл. 12 настоящей инструкции.

5.3. В ходе исследования используется приготовленная суспензия клеток — 50 тыс. клеток/мл полной питательной среды (90 % DMEM, 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 2 mM L-глутамин и 1 % AAS). Клетки высеваются в 6- или 12-луночный планшет (возможно использование чашек Петри) и помещаются для культивирования в CO<sub>2</sub>-инкубатор. Исследование можно выполнять при более редкой плотности культуры (при длительном эксперименте, если известно, что для клеточной линии удвоение клеток в культуре 24 ч и менее).

В течение последующих 14 дней производится подсчет под микроскопом количества клеток в каждой контрольной и опытной лунке (не менее 3 на группу) в 1, 3, 5, 7, 10 и 14-е сут культивирования.

5.4. Оценка и интерпретация результатов.

В исследовании регистрируется изменение количества клеток в опытных лунках по сравнению с контрольными. Образец обладает цитотоксичностью, если количество клеток в опытных лунках статистически значимо уменьшается по сравнению с лунками отрицательного контроля в любой анализируемой точке эксперимента.

## ГЛАВА 13 МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ ГЕМОЛИТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ

1. Метод основан на оценке гемолитического действия исследуемого образца путем измерения *in vitro* количества эритроцитов, подвергшихся гемолизу (по количеству высвобожденного гемоглобина), при добавлении к эритроцитарной взвеси вытяжки из образца.

2. При исследовании используют следующее оборудование, материалы, реактивы:

весы лабораторные по ГОСТ OIML R 76-1 высокого класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г;

дозаторы лабораторные по ГОСТ 28311;

термостат электрический суховоздушный с автоматическим терморегулятором до 50 °С, позволяющий поддерживать заданную температуру с погрешностью ±1 °С;

термометр жидкостный стеклянный по ГОСТ 29224 с диапазоном измерения температур от 0 до 100 °С и ценой деления 1 °С;

центрифуга лабораторная медицинская по ГОСТ 12.2.025-76, класс защиты 1 тип Н, способная обеспечить скорость не менее 900 об/мин (900 g);

фотоколориметр КФК-2 по ГОСТ 15150-69;

холодильник бытовой по ГОСТ 16317;

пинцет медицинский по ГОСТ 21241;  
пипетка 1 (2)-1-2-0,5-10 по ГОСТ 29227;  
стакан Н-2-10 (25) ТХС по ГОСТ 25336;  
цилиндр 1-100-1 по ГОСТ 1770;  
кюветы прямоугольные кварцевые для спектрофотометров по ГОСТ 20903-75;  
вата медицинская гигроскопическая по ГОСТ 5556;  
марля медицинская по ГОСТ 9412;  
бумага фильтровальная лабораторная по ГОСТ 12026;  
ножницы по ГОСТ 21239;  
пестик 1-2 по ГОСТ 9147;  
ступка 2-3 по ГОСТ 9147;  
рН-метр любой марки с набором электродов; стандарт-титры для приготовления буферных растворов для рН-метрии по ГОСТ 8.135 (допускается приготовление буферных растворов по ГОСТ 4919.2);  
вода дистиллированная и бидистиллированная по ГОСТ 6709;  
спирт этиловый ректификат по ГОСТ 5962;  
раствор физиологический стерильный, апиrogenный (0,9 % раствор натрия хлорида для инъекций).

3. Для приготовления взвеси эритроцитов может быть использована эритроцитарная масса или цитратная кровь, заготовленная на 3,9 % растворе цитрата натрия в соотношении 1 : 9 от 2-х белых крыс, ранее не используемых в токсикологических экспериментах (кровь от разных крыс заготавливается в разные пробирки). Срок хранения цитратной крови (эритроцитарной массы) — 72 ч при 4 °С.

Цитратная кровь (эритроцитарная масса) в объеме 5 мл центрифугируется 10 мин при ускорении 600 g. Надосадочная жидкость отделяется. К осадку добавляется 8 мл стерильного 0,9 % раствора хлористого натрия. Содержимое аккуратно перемешивается и центрифугируется 10 мин при 600 g. Надосадочная жидкость отделяется. Операция отмывания эритроцитов повторяется 3–4 раза. После отмывания надосадочная жидкость должна быть прозрачной, бесцветной при визуальной оценке, не иметь видимых следов гемолиза. Если надосадочная жидкость не отвечает указанным требованиям, эритроциты не могут быть использованы для приготовления взвеси эритроцитов.

Приготовление 10 % взвеси эритроцитов: для получения 10 % взвеси эритроцитов 1 мл осадка клеток смешивают с 9 мл 0,9 % раствора хлористого натрия. Полученную взвесь эритроцитов можно хранить не более 24 ч в холодильнике при температуре от -4 до -6 °С.

4. Приготовление контрольных проб.

Проба отрицательного контроля готовится путем смешивания 0,5 мл 10 % взвеси эритроцитов и 5 мл 0,9 % раствора хлористого натрия.

Пробу положительного контроля (со 100 % гемолизом эритроцитов) получают добавлением к 0,5 мл 10 % взвеси эритроцитов 5 мл дистиллированной воды.

Пробы положительного и отрицательного контролей готовятся для каждого образца эритроцитарной взвеси.

#### 5. Ход исследования.

В 3 пробирки разливается по 0,5 мл 10 % взвеси эритроцитов, затем добавляется по 5 мл вытяжки (до определения гемолитического действия к вытяжке, приготовленной на дистиллированной воде, добавляется хлористый натрий 9 мг/мл для превращения дистиллированной воды в изотонический раствор).

Смесь помещается в термостат на 1 ч при температуре 37 °С, затем центрифугируется в течение 20 мин при 900 g.

Все манипуляции по отношению к контролю и пробе со 100 % гемолизом проводятся параллельно с опытными пробами. Надосадочная жидкость отделяется для измерений оптической плотности.

6. Оптические измерения производятся на фотоколориметре при длине волны 540 нм, толщина кюветы 1 см.

Гемолиз рассчитывают в процентах по формуле 13.1:

$$\% \text{ гемолиза} = (\text{ОПоп} - \text{ОПк}^-) / \text{ОПк}^+ * 100 \%. \quad (13.1)$$

где ОПоп — средняя оптическая плотность в пробах опытной группы;

ОПк<sup>-</sup> — средняя оптическая плотность в пробах группы отрицательного контроля;

ОПк<sup>+</sup> — средняя оптическая плотность в пробах группы положительного контроля.

Если значение оптической плотности раствора превышает область значений шкалы фотоэлектроколориметра, раствор подвергается последовательному разведению в 2 и 4 раза с измерением оптической плотности на каждом шаге разведения.

#### 7. Оценка результатов.

Исследуемый образец не обладает гемолитическими свойствами, если процент гемолиза составляет менее 2 % во всех 3-х пробах. Если % гемолиза хотя бы одной пробы более 2 %, опыт повторяют с кровью другой крысы. При получении такого же результата опыт повторяют с аналогично приготовленной вытяжкой образца. В случае получения аналогичного результата исследуемая вытяжка считается гемолитически активной, и дальнейшие исследования не выполняются.

Если оптическая плотность контрольной пробы (10 % эритроцитарная взвесь с 0,9 % раствором хлористого натрия) составляет 0,03 и более, результаты всего опыта признаются недостоверными и не учитываются.

Оптическая плотность раствора со 100 % гемолизом должна быть не менее 0,8 и не более 1. В случае отклонения от указанных пределов опыт повторяется с заново приготовленной эритроцитарной взвесью.

Для обеспечения статистической значимости результатов опыты ставят не менее чем на 5 образцах крови.



## ГЛАВА 14

### МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ НА ТЕПЛОКРОВНЫХ ЖИВОТНЫХ

1. Принцип метода заключается в исследовании острой системной токсичности на лабораторных животных для получения общей информации об опасности острого воздействия применения медицинского изделия.

При планировании эксперимента принимают в расчет физические и химические свойства изделия, включая рН, стабильность, вязкость, буферные качества, растворимость и стерильность.

2. Для эксперимента могут использоваться белые мыши или крысы, кролики. Используются здоровые, не инфицированные, молодые половозрелые животные известного происхождения. В случае использования самок они должны быть не рожавшими и не беременными.

В опыте и контроле используют не менее чем по 5 животных, масса которых не должна отличаться более чем на 20 %. Допускается использование 1 контрольной группы животных на 6 и менее опытных групп.

3. При исследовании используют следующее оборудование, материалы, реактивы:

весы лабораторные общего назначения 2 класса точности по ГОСТ 24104 с пределом взвешивания 1000 г;

весы аналитические электронные с пределом допускаемой погрешности  $\pm 0,0001$  г;

стерилизатор сухожаровой с автоматической регулировкой температуры (100-220) °С по ГОСТ 24437;

анализатор потенциометрический с погрешностью измерений  $\text{pH} \pm 0,1$  (рН-метр) с набором электродов по ГОСТ 19881;

холодильник бытовой с морозильной камерой по ГОСТ 16317;

баня водяная с терморегулятором, позволяющая поддерживать температуру  $55 \pm 0,5$  °С по ГОСТ 12026 или инактиватор;

стаканы химические 50-100 см<sup>3</sup>;

цилиндры по ГОСТ 1770 и колбы по ГОСТ 25336 разной вместимости (10, 100, 1000 см<sup>3</sup>);

штативы для пробирок;

шпатели стеклянные;

рН-метр любой марки с набором электродов;

стандарт-титры для приготовления буферных растворов для рН-метрии по ГОСТ 8.135 (допускается приготовление буферных растворов по ГОСТ 4919.2);

вода дистиллированная и бидистиллированная по ГОСТ 6709;

спирт этиловый ректификат по ГОСТ 5962;

раствор физиологический стерильный, апирогенный (0,9 % раствор натрия хлорида для инъекций).

4. Описание исследования. В зависимости от агрегатного состояния образцы вводятся в нативном виде (для жидких) или в виде вытяжки в модельную среду.

Контрольной группе животных в эквивалентном объеме вводится дистиллированная вода или модельная среда.

5. Изучаемая доза образца обосновывается в зависимости от химического состава, назначения и способа применения конкретного медицинского изделия. При исследовании острой токсичности животных подвергают воздействию однократной дозы или при необходимости многократными долями, вводимыми в течение 24 ч. Максимальные объемы дозировки для введения приведены в приложении 11 к настоящей инструкции.

6. Путь введения нативного образца или вытяжки из него в организм животного, по возможности, наиболее приближается к использованию по назначению. Если выполнение данного условия невозможно, обосновывается альтернативный путь введения. Примеры путей введения приведены в приложении 11 к настоящей инструкции.

7. Состояние животных оценивается по следующим показателям:

общее состояние животных: поведение, подвижность, поедание корма, состояние шерстного покрова — сразу после введения и через 1, 2, 4, 24 ч после введения;

масса тела до введения вытяжки и через 24 ч натощак;

макроскопическая оценка состояния внутренних органов и тканей при вскрытии, для чего спустя 24 ч после введения вытяжек животных (первой — контрольной группы, затем — опытной) умерщвляют, обращая внимание на область введения, состояние подкожной клетчатки, брюшины, мышц брюшной стенки, регионарных лимфатических узлов и их протоков, внутренних органов;

относительный коэффициент массы (ОКМ) внутренних органов: печени, почек, селезенки, сердца, надпочечников.

По всем измеряемым показателям проводят последующую статистическую обработку цифровых данных с использованием критерия Стьюдента  $t$ .

8. В случае получения достоверной разницы между опытной и контрольной группами по двум из исследуемых показателей ( $p < 0,05$ ) вытяжка из изделия считается токсичной.

При обнаружении достоверного отличия по одному из изучаемых показателей или гибели опытных животных исследование повторяют на удвоенном количестве животных.

При гибели хотя бы одного опытного животного при повторном исследовании испытуемый образец считается токсичным.

## ГЛАВА 15 МЕТОД ИСПЫТАНИЯ НА КОРРОЗИОННУЮ СТОЙКОСТЬ

1. Принцип метода заключается в оценке устойчивости к коррозии образца путем визуального анализа его поверхности после термостатирования в 10 % растворе лимонной кислоты.

2. При испытании используют следующее оборудование, материалы, реактивы:

весы лабораторные общего назначения 2 класса точности по ГОСТ 24104 с пределом взвешивания 200 г;

весы аналитические электронные с пределом допускаемой погрешности  $\pm 0,0001$  г;

часы по ГОСТ 10733-98;

термостат с диапазоном рабочих температур 28-55 °С, позволяющий поддерживать заданную температуру с допустимой погрешностью  $\pm 1$  °С по ТУ 9452-002-00141798-97;

анализатор потенциометрический с погрешностью измерений  $\text{pH} \pm 0,1$  (рН-метр) с набором электродов по ГОСТ 19881;

стаканы химические 50-100 см<sup>3</sup>;

цилиндры по ГОСТ 1770 и колбы по ГОСТ 25336 разной вместимости (10, 100, 1000 см<sup>3</sup>);

штативы для пробирок;

шпатели стеклянные;

марля медицинская по ГОСТ 9412;

ножницы по ГОСТ 21241;

вода дистиллированная и бидистиллированная по ГОСТ 6709;

раствор физиологический стерильный, апиrogenный (0,9 % раствор натрия хлорида для инъекций);

лимонная кислота по ГОСТ 908-2004.

3. В ходе испытания образец погружают в 10 % раствор лимонной кислоты при температуре  $20 \pm 5$  °С и выдерживают в растворе в течение 5 ч, затем промывают проточной водой и кипятят в дистиллированной воде в течение 30 мин, после чего выдерживают в дистиллированной воде в течение 24 ч. Затем образец вынимают из воды, высушивают испарением, протирают сухой хлопчатобумажной тканью и осматривают на наличие следов коррозии.

4. Оценка результатов.

Любое пятно, не исчезающее после тщательного протирания, рассматривают как явную коррозию.

## ГЛАВА 16

### МЕТОД ИЗМЕРЕНИЯ ИЗМЕНЕНИЯ ВЕЛИЧИНЫ pH

1. Величина pH является интегральным показателем и характеризует кислотность или основность вытяжки из медицинского изделия.

2. При исследовании используют следующее оборудование, материалы, реактивы:

весы лабораторные общего назначения 2 класса точности по ГОСТ 24104 с пределом взвешивания 1000 г;

весы аналитические электронные с пределом допускаемой погрешности  $\pm 0,0001$  г;

стерилизатор сухожаровой с автоматической регулировкой температуры (100-220) °С по ГОСТ 24437;

анализатор потенциометрический с погрешностью измерений  $pH \pm 0,1$  (рН-метр) с набором электродов по ГОСТ 19881;

холодильник бытовой по ГОСТ 16317;

термостат с диапазоном рабочих температур 28-55 °С, позволяющий поддерживать заданную температуру с допустимой погрешностью  $\pm 1$  °С по ТУ 9452-002-00141798-97;

анализатор потенциометрический с погрешностью измерений  $pH \pm 0,1$  (рН-метр) с набором электродов по ГОСТ 19881;

рН-измерительная электродная система: например, система с одним или двумя стеклянными электродами, регулирование и техническое обслуживание которой проводят в соответствии с инструкциями изготовителя;

стаканы химические 50-100 см<sup>3</sup>,

цилиндры по ГОСТ 1770 и колбы по ГОСТ 25336 разной вместимости (10, 100, 1000 см<sup>3</sup>);

штативы для пробирок;

шпатели стеклянные;

марля медицинская по ГОСТ 9412;

ножницы по ГОСТ 21241;

буферные растворы: рН 7, рН 4 и рН 10 (промышленно доступные стандартные растворы или растворы, приготовленные в лаборатории с подробным описанием приготовления и датой окончания срока годности);

вода дистиллированная и бидистиллированная по ГОСТ 6709;

спирт этиловый ректификат по ГОСТ 5962;

раствор физиологический стерильный, апиrogenный (0,9 % раствор натрия хлорида для инъекций).

Для калибровки используют рН-метр и рН-измерительную электродную систему. Калибруют систему измерения (т. е. рН-метр и рН-измерительную электродную систему) в соответствии с инструкцией изготовителя с использованием, по меньшей мере, двух соответствующих буферных растворов.

3. В ходе испытания исследуемую вытяжку из образца и контрольный раствор переносят в химические стаканы и дают возможность взвесить осесть в течение 1 мин.

Обеспечиваются одинаковые температурные условия для вытяжек, контрольного раствора, стандартных растворов, используемых для калибровки. Электроды погружают в вытяжку, включают секундомер и через 1 мин, не перемешивая, записывают значение рН.

4. Результаты измерений вычисляют по формуле 16.1:

$$\Delta pH = (pH)_b - (pH)_k \quad (16.1)$$

где  $\Delta pH$  — изменение величины рН;

$(pH)_b$  — величина рН вытяжки;

$(pH)_k$  — величина рН контрольного раствора.

Величину  $(pH)_b$  рассчитывают как среднее арифметическое значение трех результатов параллельных определений вытяжки, которые считаются

приемлемыми (с доверительной вероятностью 0,95), если расхождение между наибольшим и наименьшим результатами определений не превышает 0,05 ед. рН.

Величину (рН)<sub>k</sub> рассчитывают как среднее арифметическое значение трех результатов параллельных определений контрольного раствора, которые считаются приемлемыми (с доверительной вероятностью 0,95), если расхождение между наибольшим и наименьшим результатами определений не превышает 0,02 ед. рН.

Численное значение результатов определения округляют до десятых долей рН.

## ГЛАВА 17 МЕТОДЫ ОРГАНОЛЕПТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Методы органолептических исследований позволяют провести оценку наличия и интенсивности запаха образцов и вытяжек из них, а также прозрачности и окрашивания вытяжек.

2. Для органолептических исследований привлекаются лица, которые могут четко различать запах образцов. Каждый дегустатор (не менее 3 человек на 1 исследование) заносит результаты в индивидуальную дегустационную карту по форме согласно приложению 12 к настоящей инструкции.

3. Оценка интенсивности запаха образца изделия проводится по пятибалльной шкале:

0 баллов — запах не отмечается ни одним из дегустаторов;

1 балл — едва заметный запах;

2 балла — запах слабый, не привлекающий внимания, но обнаруживаемый, если указать на него;

3 балла — отчетливый, легко обнаруживаемый запах;

4 балла — обращающий на себя внимание и вызывающий отрицательный отзыв запах;

5 баллов — запах настолько сильный, что вызывает неприятные ощущения.

4. Для органолептических исследований вытяжек используют следующее оборудование, материалы, реактивы:

колба коническая с притертой пробкой КН-1 по ГОСТ 25336;

цилиндр 1-100-1 по ГОСТ 1770;

вода дистиллированная и бидистиллированная по ГОСТ 6709.

5. При органолептическом исследовании вытяжек из образцов экстрагируемых изделий отмечают прозрачность (мутность, осадок), наличие окрашивания вытяжки и ее запах.

6. Запах и его интенсивность определяют сразу после окончания соответствующей экспозиции во всех вытяжках из исследуемых образцов при температурах, предусмотренных условиями моделирования, путем закрытой дегустации.

7. Для исследования запаха вытяжек в четыре колбы с притертыми пробками вместимостью до 100 мл вносят: в три по 50 мл контрольной пробы, в одну — 50 мл исследуемой вытяжки. Предварительно каждому дегустатору предлагают открыто ознакомиться с запахом контрольного раствора. Для этого

одну из трех колбочек встряхивают, открывают пробку и предлагают слегка втянуть в нос воздух из колбы. После этого проводят закрытую дегустацию растворов в оставшихся трех колбочках, чтобы выявить наличие запаха исследуемой вытяжки.

8. Оценивают интенсивность запаха вытяжек из изделий в соответствии с трех-балльной шкалой:

0 баллов — запах отсутствует, различия не обнаружены ни одним из дегустаторов;

1 балл — слабый запах, различия заметны и установлены половиной дегустаторов;

2 балла — заметный запах, различия легко определяемы всеми дегустаторами;

3 балла — сильный запах, явно заметный и вызывающий отрицательный отзыв у дегустаторов.

Из всех полученных результатов определения интенсивности запаха рассчитывают среднее арифметическое.

Приложение 1  
(обязательное)

**Объем исследований медицинских изделий**

Вид изделий	Подвид изделий	Группа изделий по продолжительности контакта: I – кратковременный (до 24 ч) II – длительный (1-30 сут) III – постоянный (более 30 сут)	Цитотоксическое действие	Раздражающее действие	Сенсибилизирующее действие <sup>1</sup>	Пирогенность	Гемолитическое действие	Острая токсичность	Органолептические свойства <sup>2</sup>	Устойчивость к коррозии	Санитарно-химические показатели	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Изделия, контактирующие с поверхностью тела (кожа, слизистые оболочки)	кожа	I	-	+	+	-	-	-	+	-	+	
		II	-	+	+	-	-	-	+	-	+	
		III	-	+	+	-	-	-	+	-	+	
	слизистые оболочки	I	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+
		II	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+
		III	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+
	поврежденные или подверженные опасности повреждения поверхности	I	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		II	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		III	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Изделия контактирующие с внутренней средой организма	мягкие ткани, непрямой кровоток	I	-	-	+	+	+	+	+	+	+
		II	+	-	+	+	+	+	+	+	+
		III	+	-	+	+	+	+	-	+	+
	система кровообращения	I	-	-	+	+	+	+	+	+	+
		II	+	-	+	+	+	+	+	+	+
		III	+	-	+	+	+	+	-	+	+
Имплантируемые изделия	кровь, кость, мягкая ткань	II	+	-	+	+	+	+	+	+	
		III	+	-	+	+	+	+	+	+	
Стоматологические материалы	-	I	-	+	+	+	+	+	-	-	
		II	-	+	+	+	+	+	-	-	
		III	-	+	+	+	+	+	-	-	
Изделия опосредованного контакта	кожа	-	-	+	-	-	-	-	+	-	
	слизистые оболочки	-	-	+	-	-	-	-	+	-	
	внутренняя среда	-	-	-	-	+	+	+	+	-	
Примечания: 1) + — исследование показателя проводится; 2) - — исследование показателя не проводится.											

1. Определяется для медицинских изделий и материалов, обладающих потенциальной сенсibiliзирующей способностью, и для вновь разработанных медицинских изделий.

2. Не определяются в стоматологических пломбировочных материалах, кремах, гелях, жидкостях и прочих изделиях, имеющих свойственный им запах.



Приложение 2  
(обязательное)

**Перечень приоритетных химических веществ, мигрирующих из изделий в модельные среды**

Наименование материала	Показатели
1	2
Полимерные материалы и пластические массы на их основе (в т. ч. синтетические ткани):	
Полиэтилен, полипропилен	Формальдегид, ацетальдегид, метиловый, изопропиловый спирт
Полистирол, в т. ч. вспененный	Стирол, формальдегид
Сополимер стирола с акрилонитрилом	Стирол, акрилонитрил, формальдегид
Сополимер стирола с метилметакрилатом	Стирол, метилметакрилат, формальдегид, метиловый спирт
Сополимер стирола с метилметакрилатом и акрилонитрилом	Стирол, метилметакрилат, формальдегид, метиловый спирт, акрилонитрил
Сополимер стирола с бутадиеном	Стирол, ацетальдегид
Поливинилхлорид	Винил хлористый, бензол
Пластифицированный поливинилхлорид	Винил хлористый, бензол, дибутилфталат, диоктилфталат
Винилацетаты	Винилацетат, формальдегид, ацетальдегид
Полиакрилаты	Метилакрилат, метилметакрилат, формальдегид, акрилонитрил
Полиорганосиликосаны (силиконы)	Формальдегид, ацетальдегид, метиловый спирт
Капрон (полиамид 6, поликапроамид)	Капролактам, бензол, фенол
Нейлон (полиамид 66)	Гексаметилендиамин, метиловый спирт
АБС-пластики	Стирол, акрилонитрил, $\alpha$ -метилстирол, бензол
Поликарбонат	Фенол, формальдегид
Полиуретаны	Формальдегид, фенол
Полиэфиры (полиэтиленоксид)	Формальдегид, ацетальдегид
Полипропиленоксиды	Формальдегид, ацетон
Полифениленоксид	Фенол, формальдегид, метиловый спирт
Полиэтилентерефталат	Формальдегид, ацетальдегид, метиловый спирт, диметилтерефталат
Поликарбонат	Фенол
Полисульфон	Фенол, формальдегид
Изоцианат (полиол)	Фенол, формальдегид, метанол

1	2
Полифениленсульфид	Фенол, ацетальдегид, формальдегид
При использовании фенолформальдегидных смол	Фенол, формальдегид
При использовании кремнийорганических смол	Формальдегид, фенол, ацетальдегид
При использовании эпоксидных смол	Эпихлоргидрин, формальдегид
Фторопласты	Формальдегид, фтор-ион (суммарно)
Фторэст	Формальдегид, диоктилфталат, дибутилфталат
На основе фенолоальдегидных смол	Формальдегид, ацетальдегид, фенол
На основе гликолиевой кислоты	Формальдегид, метанол, этиленгликоль
Полиформальдегид	Формальдегид, ацетальдегид
Аминопласты	Формальдегид
Иономерные смолы	Формальдегид, цинк, метиловый спирт
Эфирцеллюлозные пластмассы и бумага	Формальдегид, метиловый спирт
Коллаген (биополимер)	Формальдегид, метиловый спирт
Ткани:	
Натуральные	Формальдегид
Вискозные	Формальдегид, дибутилфталат, диоктилфталат
Ацетатные	Ацетальдегид, формальдегид, дибутилфталат, диоктилфталат
Парафины и воски	Формальдегид, ацетальдегид, гексан, гептан
Стекло (в зависимости от окраски)	свинец, кадмий, бор, алюминий (мышьяк, кобальт, хром, медь)
Металлы и сплавы:	
Сталь нержавеющая	Марганец, хром, кадмий, никель, свинец, железо, цинк
Медь	Медь
Титановый сплав	Титан, железо, алюминий, хром, марганец
Цинк и его сплавы	Цинк, железо, свинец, кадмий, медь
Сплавы алюминия	Алюминий, марганец, железо, медь, цинк
Латунь и сплавы меди	Медь, цинк, железо, свинец
Резина	Формальдегид, диоктилфталат, тиурам, дибутилфталат, каптакс
Латекс натуральный	Формальдегид
Латекс вулканизированный	Формальдегид, тиурам, дибутилфталат

1	2
	Каучуки синтетические:
Стирольные	Стирол, формальдегид
Изопреновые	Формальдегид, изопропиловый спирт
Хлоропреновые	Формальдегид
Нитриловые	Акрилонитрил, формальдегид
Полимерные материалы и композиты, предназначенные для пломбирования кариозных полостей и зубных каналов, цементы для фиксации протезов	Метилметакрилат, эпихлоргидрин, цинк

Приложение 3  
(обязательное)

**Условия приготовления экстрактов (вытяжек) из медицинских изделий (материалов)**

Наименование группы изделий	Наименование изделий	Модельная среда	Соотношение		Температура экстракции, °С	Продолжительность экстракции, ч
			площади поверхность и к объему модельной среды, см <sup>2</sup> /см <sup>3</sup>	количества образцов к объему модельной среды, шт/см <sup>3</sup>		
1	2	3	4	5	6	7
Материалы и изделия для офтальмологии	Оправы очковые, линзы очковые	Вода дистиллированная	-	3/500	37±1	24±2
	Интраокулярные и контактные линзы	Вода дистиллированная/ 0,9 % раствор хлористого натрия	1/1	-	37±1	24±2
	Глазные пипетки	Вода дистиллированная	-	Заполнение номинальным объемом	37±1	2±0
Мебель, приборы, приспособления	Датчики, электроды, контактирующие с кожей, слизистыми покровами, манжеты	Вода дистиллированная/ 0,9 % раствор хлористого натрия	1/10	-	37±1	2±0,1
	Автономные желудочно-кишечные электростимуляторы	Вода дистиллированная/ 0,9 % раствор хлористого натрия	-	1/100	37±1	24±2

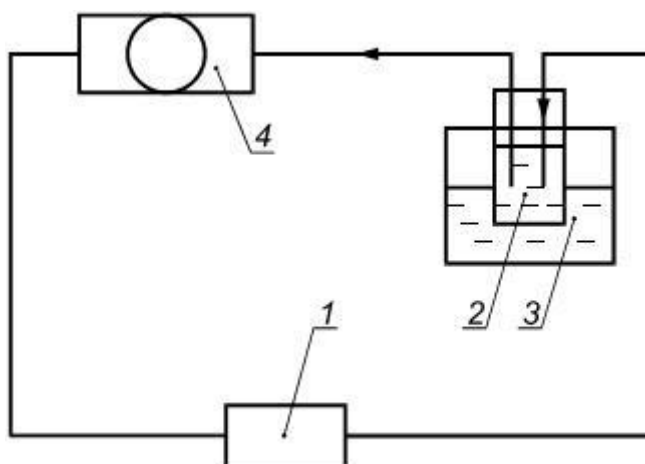
	Камеры неонатальные инкубаторы, устройства и принадлежности	Вода дистиллированная/ 0,9 % раствор хлористого натрия воздух (в климатической камере)	1/1  1/10	-	37±1  40±1	72±2  24±2
	Корпуса и детали медицинских приборов и аппаратов, камеры для гипербарической оксигенации, защитные средства от рентгеновского излучения	Воздух (в климатической камере)	1/10	-	23	24
Изделия, контактирующие с кожей и слизистыми оболочками	Бинт, марля перчатки медицинские пакеты перевязочные стерильные и нестерильные	Вода дистиллированная/ 0,9 % раствор хлористого натрия	1/1	-	37±1	24±2
	Презервативы, в т. ч. для медицинских целей; перчатки хирургические, смотровые, анатомические, пальчики	Вода дистиллированная/ 0,9 % раствор хлористого натрия	-	1/50	37±1	2±0
		Воздух	1/2,75		25	24
	Пластыри медицинские	Вода дистиллированная	1/1	-	37±1	24±2

1	2	3	4	5	6	7	
Хирургическая одежда и белье	Постельное белье, одежда медицинского персонала, подкладочные клеенки, лечебное белье (чулки, носки, гольфы, трусы, пояса, бандажи), белье хирургическое	Воздух (в эксикаторе)	1/10	-	37±1	24±2	
		Вода дистиллированная	1/10		37±1	24±2	
Упаковка для лекарственных средств из стекла, пластика	Тара для лекарственных средств, контактирующих с внутренними средами организма, а также лекарственных средств наружного применения	40 % раствор спирта	-	заполнение номинальным объемом	37±1	240±2	
		Бумажная упаковка	Воздух (в эксикаторе)	1/10	-	37±1	24±2
		Лабораторная посуда для клинико-биохимических и иммунологических исследований	Вода дистиллированная/ 0,9 % раствор хлористого натрия	-	заполнение номинальным объемом	37±1	24±2

### Приготовление экстракта (вытяжки) с использованием стенда

Стенд предназначен для приготовления экстрактов (вытяжек), которые используются при санитарно-химическом и токсикологическом исследовании медицинских изделий: устройств комплектных эксфузионных, инфузионных и трансфузионных, аппаратов и устройств для замещения функций органов и систем организма (аппаратов искусственного кровообращения, искусственной почки, аппаратов для гемосорбции в комплекте с магистралями или без них и их функциональных элементов – волокон, мембран и гемосорбентов), а также магистралей к перечисленным аппаратам.

Функциональная схема стенда должна соответствовать приведенной на рисунке



- 1 — исследуемый образец (при испытании эксфузионных, инфузионных и трансфузионных устройств последовательно соединяются три изделия);  
2 — стеклянная емкость, заполненная дистиллированной водой (для эксфузионных, инфузионных и трансфузионных устройств — 250 мл, для оксигенаторов — 1000 мл, для всех остальных видов изделий — 500 мл); 3 — термостат ( $37\pm 1$ ) °С;  
4 — перистальтический насос, подключенный к испытательному контуру через силиконовую трубку минимально возможной длины и обеспечивающий циркуляцию дистиллированной воды в контуре со скоростью потока 1 л/ч для эксфузионных, инфузионных и трансфузионных устройств; для остальных изделий скорость потока указана в инструкции по применению изделия

**Рисунок — Стенд для приготовления экстракта (вытяжки)**

Через замкнутый контур в режиме рециркуляции в течение 2 ч с указанной скоростью потока пропускают соответствующий объем дистиллированной воды при температуре  $37\pm 1$  °С. Через 2 ч, не нарушая герметичности контура, извлекают колбу с приготовленной вытяжкой из термостата, охлаждают до комнатной температуры. В первую очередь непосредственно из контура

производят отбор проб для хроматографического определения этиленоксида, циклогексанона и тетрагидрофурана путем прокола иглой шприца полимерной трубки устройства. Остальную часть вытяжки сливают в стеклянную емкость со шлифом.

В качестве контрольного раствора используют соответствующий объем дистиллированной воды, пропущенной через замкнутый контур в тех же условиях, но без присоединения изделий.



Приложение 5  
(обязательное)

**Соотношение площади поверхности и (или) массы образца и объема  
модельной среды при экстрагировании**

Толщина изделия, мм	Соотношение при экстракции
Менее 0,5	6 см <sup>2</sup> /мл
Более 0,5	3 см <sup>2</sup> /мл
Неравномерная	0,1 г/мл

Приложение 6  
(справочное)

**Оценка сенсibiliзирующей способности медицинских изделий**

Критерии	Классы аллергенной активности			
	I	II	III	IV
Частота положительных кожных тестов у подопытных животных, %	>75	>50	<50	<25
Статистическая значимость различий показателей кожных реакций в опытной и контрольной группах (I-II классы по критерию X; III-IV — по критерию t)	<0,01	<0,05	<0,05	>0,05
Примечания: 1) I — сильные; 2) II — выраженные; 3) III — умеренные; 4) IV — слабые аллергены.				

**Оценка состояния кожи при изучении местного раздражающего действия**

Таблица 1. — Оценка выраженности эритематозной реакции, баллы

Визуальная оценка интенсивности эритемы	Оценка (баллы)
Отсутствие эритемы	0
Слабая (слабо-розовый фон)	1
Умеренно выраженная (розово-красный тон)	2

Таблица 2. — Оценка выраженности отека

Оценка интенсивности	Вид животных, белые крысы	Оценка, (баллы)
	$TKC_{\text{аплл.}} - TKC_{\text{фон.}}, \text{ мм}$	
Отсутствие	0-0,09	0
Слабая	0,1-0,39	1
Умеренная	0,4-0,69	2

Приложение 8  
(справочное)

**Оценка симптомов раздражающего действия на слизистую оболочку  
глаз кроликов**

Симптомы раздражения	Характеристика выраженности симптомов	Оценка (баллы)
Гиперемия конъюнктивы и слизистой оболочки век	Отсутствие видимого покраснения, четкий сосудистый рисунок	0
	Сосуды инъецированы (расширены)	1
	Отдельные сосуды трудно различимы, легкое покраснение слизистой оболочки	2
	Диффузное глубокое покраснение	3
Отек век	Отсутствие видимых изменений	0
	Слабые отеки (набухшие веки)	1
	Выраженный отек с частичным выворачиванием век	2
	В результате отека глаз закрыт наполовину	3
	В результате отека глаз закрыт полностью	4
Выделения из глаза	Отсутствие выделений	0
	Минимальное количество в углу глаз	1
	Количество выделений увлажняет веки	2
	Количество выделений увлажняет веки и окружающие ткани	3

Приложение 9  
(справочное)

**Оценка симптомов сенсibilизирующего и раздражающего действия  
при испытаниях на добровольцах**

Таблица 1. — Шкала оценки выраженности эритематозной реакции кожи добровольцев

Визуальный учет наличия и интенсивности эритемы	Оценка (баллы)
Отсутствие эритемы	0
Слабая эритема (розовый тон)	1
Умеренно выраженная эритема (розово-красный тон)	2
Выраженная эритема (красный тон)	3
Резко выраженная эритема (ярко-красный тон)	4

Таблица 2. — Шкала оценки сенсibilизирующего действия изделия при контакте с кожей человека

Характеристика и выраженность объективных кожных и субъективных клинических симптомов	Оценка (баллы)
Отсутствие видимых изменений кожи и субъективных симптомов	0
Слабая эритема (розовый тон) на участке вторичной аппликации	1
Слабая эритема (розовый тон) на участке первичной аппликации, умеренно выраженная эритема (розово-красный тон) на участке вторичной аппликации, слабые (переносимые) ощущения зуда, жжения, болезненности на участках аппликаций	2
Выраженная эритема (ярко-красный тон), первичные экссудативные или пролиферативные высыпания на участках первичной и вторичной аппликаций, выраженные ощущением зуда, жжения, болезненности	3

**Алгоритм расчета величины доверительной границы  
случайной погрешности измерения**

Величину доверительной границы  $L$  случайной погрешности измерения рассчитывают по формуле П10.1:

$$L = t \cdot S_{\bar{x}}, \quad (\text{П10.1})$$

где  $t$  — коэффициент Стьюдента, который в зависимости от доверительной вероятности  $P$  и числа результатов наблюдений  $n$ , находят по таблице распределения Стьюдента;

$S_{\bar{x}}$  — средняя квадратическая погрешность результатов одиночных измерений, которая вычисляется по формуле П10.2:

$$S_{\bar{x}} = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}, \quad (\text{П10.2})$$

где  $\sigma$  — среднее квадратичное отклонение результатов измерения;  
 $n$  — число результатов наблюдений.

Среднее квадратичное отклонение результатов измерения оценивают по формуле П10.3:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}. \quad (\text{П10.3})$$

где  $\sum(x_i - \bar{x})^2$  — сумма квадратов отклонений отдельных значений результатов измерения  $x_i$  от средней арифметической  $\bar{x}$ .

## **Введение экстрактов (вытяжек) при определении общетоксического действия**

### *Внутрибрюшинный путь введения*

Исследуемую стерильную вытяжку вводят непосредственно в брюшную полость.

При вычислении частоты дозы необходимо учитывать, что предметы исследования, вводимые этим путем, абсорбируются в основном портальной циркуляцией, и таким образом, до поступления в общее кровообращение, должны пройти через печень.

Исследования системной токсичности внутрибрюшинным путем могут быть приемлемы для изделий, контактирующих с брюшной полостью, которая способствует вымыванию химических веществ. Это также является приемлемым путем, если экстракт не должен вводиться внутривенно, например, при использовании вытяжки неполярных масел или при возможном наличии частиц. Такой путь введения предпочтительнее фильтрации для внутривенной инъекции.

### *Накожный путь введения*

На выстриженный участок спины лабораторных животных (4 x 5 см для белых крыс, 7 x 9 см для кроликов) наносят нативный образец или вытяжку из него и втирают в кожу стеклянной палочкой. Для предотвращения слизывания животными фиксируют в специальных домиках до высыхания вещества или вытяжки, но не менее чем на 4 ч.

Исследование системной токсичности дермально может быть приемлемо для изделий, контактирующих с кожными покровами.

### *Внутримышечный путь введения*

Исследуемые образцы вводят непосредственно в мышечную ткань путем инъекции.

Исследование системной токсичности внутримышечным путем может быть приемлемо для изделий, контактирующих с мышечной тканью, которая способствует вымыванию химических веществ.

### *Пероральный путь введения*

Исследуемые образцы вводятся через зонд. До их введения экспериментальные животные должны голодать. Период голодания может быть от нескольких часов до одной ночи, с более короткими периодами для животных с более высокой скоростью метаболизма. После периода голодания животные должны быть взвешены, затем исследуемый образец вводят однократной дозой, основываясь на массе тела. После введения исследуемого образца прием пищи может быть отложен на дополнительные 34 ч. При введении дозы долями в

течение определенного периода необходимо предоставлять животным пищу и воду в зависимости от длительности периода

Исследование системной токсичности оральным путем может быть приемлемо для изделий, прямо или косвенно контактирующих со слизистой оболочкой ротовой полости, или для продукции с другим энтеральным назначением.

*Внутрикожный путь введения*

Исследуемые образцы вводят непосредственно во внутрикожную область путем инъекции.

Исследование системной токсичности внутрикожным путем может быть приемлемо для изделий, контактирующих с организмом внутрикожно, например, препаратов для контурной пластики лица.

*Подкожный путь введения*

Исследуемые образцы вводят непосредственно в подкожную область путем инъекции или имплантации.

Исследование системной токсичности подкожным путем может быть приемлемо для изделий, контактирующих с подкожной средой.

Экстракты (вытяжки) в зависимости от пути введения вводятся в объемах, указанных в таблице.

Максимальные объемы для введения экстракта (вытяжки) при изучении общетоксического действия

Вид	Подкожный, мл/кг	Внутримышечный, мл/кг	Внутрибрюшинный, мл/кг	Внутрижелудочный, мл/кг	Внутрикожный, мл/кг
Крыса	20	1	20	50	20
Мышь	50	2	50	50	50
Кролик	10	1	20	20	10



**Образец формы дегустационной карты для проведения  
органолептических испытаний образцов**

**ДЕГУСТАЦИОННАЯ КАРТА**

ФИО дегустатора	
Дата проведения исследования	

№ п/п	Коды образцов	Наименование образцов
1		
2		
...		

№ обр. п/п	Органолептический признак				
	мутность	осадок	окрашивание	запах, в баллах	привкус
1					
2					
...					

Подпись \_\_\_\_\_