МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)
INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ ISO 10993-10— 2011

ИЗДЕЛИЯ МЕДИЦИНСКИЕ ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ

Часть 10

Исследования раздражающего и сенсибилизирующего действия

(ISO 10993-10:2002, IDT)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2014

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели, основные принципы и порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0—92 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2—2009 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, применения, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН Федеральным государственным унитарным предприятием «Всероссийский научно-исследовательский институт стандартизации и сертификации в машиностроении» (ВНИИНМАШ)

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 29 ноября 2011 г. № 40)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 13 декабря 2011 г. № 1347-ст межгосударственный стандарт ГОСТ ISO 10993-10—2011 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 января 2013 г.

5 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ISO 10993-10:2002 Biological evaluation of medical devices — Part 10: Tests for irritation and delayed-type hypersensitivity (Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 10. Исследования раздражающего и сенсибилизирующего действия).

Сведения о соответствии межгосударственных стандартов ссылочным международным стандартам приведены в дополнительном приложении ДА.

Степень соответствия — идентичная (IDT).

Стандарт подготовлен на основе применения ГОСТ Р ИСО 10993-10—2009

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет

© Стандартинформ, 2014

В Российской Федерации настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Термины и определения 2
4 Основные принципы поэтапного подхода 3
5 Предварительный анализ исследуемых образцов 3
5.1 Общие сведения 3
5.2 Виды материалов 3
5.3 Данные о химическом составе 4
5.4 Характеристика материалов 4
6 Методы исследования раздражающего действия 4
6.1 Методы in vitro 4
6.2 Факторы, влияющие на планирование исследования и выбор методов in vitro 5
6.3 Исследование раздражающего действия на кожу экспериментальных животных 5
6.4 Исследование раздражающего действия на коже человека 8
7 Методы исследования гиперчувствительности замедленного типа 12
7.1 Выбор метода 12
7.2 Выбор концентрации испытуемого образца 12
7.3 Прочие факторы, влияющие на полученные результаты исследований 12
7.4 Метод максимального сенсибилизирующего воздействия 13
7.5 Метод закрытых накожных аппликаций для выявления гиперчувствительности замедленного типа 15
8 Ключевые факторы при интерпретации результатов исследований 17
Приложение А (обязательное) Подготовка материалов для исследования раздражающего и сенсибилизирующего действия 18
Приложение В (справочное) Дополнительные методы исследования раздражающего действия 19
Приложение С (справочное) Дополнительная информация 32
Приложение ДА (справочное) Сведения о соответствии межгосударственных стандартов ссылочным международным стандартам 35
Библиография 37

Введение

Соблюдение положений стандартов серии ISO 10993 «Оценка биологического действия медицинских изделий» позволит обеспечить системный подход к исследованию биологического действия медицинских изделий.

Целью этих стандартов не является безусловное закрепление единообразных методов исследований и испытаний за группами однородных медицинских изделий в соответствии с принятой классификацией их по виду и длительности контакта с организмом человека. Поэтому планирование и проведение исследований и испытаний должны осуществлять специалисты, имеющие соответствующую подготовку и опыт в области санитарно-химической, токсикологической и биологической оценок медицинских изделий.

Стандарты серии ISO 10993 являются руководящими документами для прогнозирования и исследования биологического действия медицинских изделий на стадии выбора материалов, предназначенных для их изготовления, а также для исследований готовых изделий.

В серию ISO 10993 входят следующие части под общим названием «Оценка биологического действия медицинских изделий»:

Часть 1 — Оценка и исследования;

Часть 2 — Требования к обращению с животными;

Часть 3 — Исследования генотоксичности, канцерогенности и токсического действия на репродуктивную функцию;

Часть 4 — Исследование изделий, взаимодействующих с кровью;

Часть 5 — Исследование на цитотоксичность: методы in vitro;

Часть 6 — Исследование местного действия после имплантации;

Часть 7 — Остаточное содержание этиленоксида после стерилизации;

Часть 9 — Основные принципы идентификации и количественного определения потенциальных продуктов деградации;

Часть 10 — Исследование раздражающего и сенсибилизирующего действия;

Часть 11 — Исследование общетоксического действия;

Часть 12 — Приготовление проб и стандартные образцы;

Часть 13 — Идентификация и количественное определение продуктов деградации полимерных медицинских изделий;

Часть 14 — Идентификация и количественное определение продуктов деградации изделий из керамики;

Часть 15 — Идентификация и количественное определение продуктов деградации изделий из металлов и сплавов;

Часть 16 — Моделирование и исследование токсикокинетики продуктов деградации и вымывания;

Часть 17 — Установление пороговых значений для вымываемых веществ;

Часть 18 — Исследование химических свойств материалов;

Часть 19 — Исследование физико-химических, морфологических и топографических свойств материалов;

Часть 20 — Принципы и методы исследования иммунотоксического действия медицинских изделий.

Настоящий стандарт гармонизирован со многими стандартами и руководствами, включая BS 5736, Руководящие документы OECD, Американскую фармакопею и Европейскую фармакопею. Это позволяет настоящему стандарту быть основным документом для выбора и поведения исследований, позволяющих оценить раздражающее и сенсибилизирующее действие, относящиеся к безопасности медицинских материалов и изделий.

Поправка к ГОСТ ISO 10993-10—2011 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 10. Исследования раздражающего и сенсибилизирующего действия

В каком месте	Напечатано	Должно быть		
Предисловие. Таблица согласования	—	Армения	AM	Минэкономразвития Республики Армения

(ИУС № 6 2019 г.)

М Е Ж Г О С У Д А Р С Т В Е Н Н Ы Й С Т А Н Д А Р Т

ИЗДЕЛИЯ МЕДИЦИНСКИЕ
ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ

Часть 10

Исследования раздражающего и сенсибилизирующего действия

Medical devices. Biological evaluation of medical devices.
Part 10. Tests for irritation and delayed-type hypersensitivity

Дата введения — 2013—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт описывает методы оценки возможного раздражающего и сенсибилизирующего действия медицинских изделий и материалов, входящих в их состав.

Настоящий стандарт включает в себя:

a) требования к описанию исследуемых образцов;

b) детальное описание методов исследования;

c) ключевые факторы, влияющие на интерпретацию полученных результатов.

В приложении А приведены инструкции по подготовке образцов для проведения вышеуказанных исследований.

Настоящий стандарт распространяется на категории изделий в соответствии с ISO 10993-1. Подготовку образцов к исследованиям проводят в соответствии с приложением А.

В приложении В приведены дополнительные специфические методы исследования для изделий, используемых интрадермально, орально, вагинально, контактирующих с пенисом, в офтальмологии.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие международные стандарты:

ISO 10993-1:1997* — Biological evaluation of medical devices — Part 1: Evaluation and testing (Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 1. Оценка и исследования)

ISO 10993-2 Biological evaluation of medical devices — Part 2: Animal welfare requirements (Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 2. Требования к обращению с животными)

ISO 10993-9 Biological evaluation of medical devices — Part 9: Framework for identification and quantification of potential degradation products (Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 9. Основные принципы идентификации и количественного определения потенциальных продуктов деструкции)

ISO 10993-12 Biological evaluation of medical devices — Part 12: Sample preparation and reference materials (Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 12. Приготовление проб и стандартные образцы)

ISO 10993-13 Biological evaluation of medical devices — Part 13: Identification and quantification of degradation products from polymeric medical devices (Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 13. Идентификация и количественное определение продуктов деструкции полимерных медицинских изделий)

* Заменен на ISO 10993-1:2003.

Издание официальное

ISO 10993-14 Biological evaluation of medical devices — Part 14. Identification and quantification of degradation products from ceramics (Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 14. Идентификация и количественное определение продуктов деструкции изделий из керамики)

ISO 10993-15 Biological evaluation of medical devices — Part 15. Identification and quantification of degradation products from metals and alloys (Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 15. Идентификация и количественное определение продуктов деструкции изделий из металла и сплавов)

ISO 10993-18 Biological evaluation of medical devices — Part 18. Chemical characterization of materials (Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 18. Исследование химических свойств материалов)

ISO 14555-1 Clinical investigation of medical devices for human subjects — Part 1: General requirements (Клинические исследования медицинских изделий. Часть 1. Общие требования)

ISO 14555-2 Clinical investigation of medical devices for human subjects — Part 2: Clinical investigation plans (Клинические исследования медицинских изделий. Часть 2. Протокол клинических исследований)

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены термины по ISO 10993-1, а также следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 **аллерген:** Вещество или материал, которые способны вызывать специфичную гиперчувствительность таким образом, что при последующем воздействии вещества или материала с аналогичной характеристикой возникает аллергический эффект.

3.2 **контрольный раствор:** Порция раствора, приготовленная так же, как и идентичный раствор, используемый для подготовки исследуемых образцов, предназначенная для определения фонового ответа растворителя.

3.3 **провокационная проба:** Процесс, следующий за фазой индукции, в котором оценивается иммунологический эффект последующих воздействий индуцируемого материала на организм.

3.4 **коррозия:** Медленное разрушение структуры или материала ткани (например, действие сильного раздражителя).

3.5 **гиперчувствительность замедленного типа:** Индукция специфически опосредованной Т-лимфоцитами иммунологической памяти на аллерген, воздействующий на организм, приводящей к реакции гиперсенсибилизации замедленного типа после повторного контакта с аллергеном.

3.6 **доза:** Объем, вводимый в тест-систему за один прием.

3.7 **эритема:** Покраснение кожи или слизистой оболочки.

3.8 **струп:** Корка или бесцветная пленка на коже.

3.9 **индукция:** Процесс, ведущий к образованию *de novo* измененного состояния иммунологической реактивности индивидуума на конкретный материал.

3.10 **раздражитель:** Агент, производящий раздражение.

3.11 **раздражение:** Локализованный неспецифический воспалительный ответ на однократное, повторное или продолжительное применение вещества/материала.

3.12 **некроз:** Гибель одной или более клеток, либо части ткани или органа, ведущая к необратимому поражению.

3.13 **отрицательный контроль:** Материал или вещество, которое при исследовании описанным путем, демонстрирует пригодность для процедуры получения воспроизводимого соответствующего отрицательного, нереактивного или фонового ответа в тест-системе.

3.14 **отек:** Увеличение объема ткани вследствие абнормальной инфильтрации жидкости.

3.15 **положительный контроль:** Материал или вещество, которое при исследовании описанным путем, демонстрирует пригодность для процедуры получения воспроизводимого соответствующего положительного или реактивного ответа в тест-системе.

3.16 **растворитель:** Материал или вещество, используемое для смачивания, разбавления, суспензирования, экстрагирования или растворения материала испытуемого вещества (например, химикат, наполнитель, среда и т. д.).

3.17 **исследуемый материал:** Материал, изделие, его часть или компонент, пробу которых подвергают биологическому или химическому испытанию.

3.18 **испытуемая проба:** Экстракт или порция исследуемого материала, которую подвергают биологическому или химическому испытанию.

3.19 **изъязвление:** Открытая язва, представляющая разрушение поверхностных тканей.

4 Основные принципы поэтапного подхода

Доступные методы для исследования реакций раздражения или сенсибилизации исследуемых образцов на кожу были разработаны только относительно раздражающего и сенсибилизирующего действия. В настоящем стандарте предложен поэтапный подход, состоящий частично или полностью из следующих этапов:

a) характеристика исследуемого материала, включающая описание химических свойств и анализ испытуемого образца в соответствии с основными положениями ISO 10993-9; ISO 10993-13; ISO 10993-14; ISO 10993-15 и ISO 10993-18;

b) обзор литературы, содержащей оценку химических и физических свойств, а также информацию о потенциально возможном раздражающем и сенсибилизирующем действии компонента исследуемого материала либо о сходных по структуре химических реагентов или веществ;

c) анализ преимуществ существующих методов исследования в условиях *in vitro* по сравнению с методами *in vivo* с целью замены последних на новые, информативные и надежные методы *in vitro*;

d) исследования в условиях *in vivo* на экспериментальных животных.

Примечание — Острые эксперименты на животных должны проводиться для материалов, которые могут и не относиться к сильным раздражающим или сенсибилизирующим агентам при их анализе на этапах a) или b). Материалы, не проявившие острого раздражающего эффекта при однократном воздействии на кожу, далее подвергают исследованиям при многократном воздействии.

Метод положительного контроля для оценки сенсибилизирующего действия [7] необходимо проводить в исследовательской лаборатории, по крайней мере, каждые шесть месяцев для подтверждения надежности используемых методов исследований и демонстрации положительной реакции;

e) неинвазивные методы исследования на добровольцах.

Если исследуемый материал не проявляет токсического, раздражающего и сенсибилизирующего действия при испытаниях на животных, то его раздражающее действие может быть исследовано на коже добровольцев.

5 Предварительный анализ исследуемых образцов

5.1 Общие сведения

Необходимо подчеркнуть, что результатом предварительного анализа может быть заключение о нецелесообразности проведения исследований на раздражающее и сенсибилизирующее действие.

Общие требования приведены в разделе 5 ISO 10993-1.

5.2 Виды материалов

5.2.1 Предварительное описание

Необходимо помнить, что в процессе изготовления и сборки медицинских изделий могут быть использованы различные химические компоненты, например, смазочные материалы или покрытия для оснастки. Кроме того, в химических компонентах, участвующих в процессе изготовления изделия, в конечной продукции могут присутствовать остаточные количества адгезивов, растворителей и стерилизующих агентов, а также продуктов реакции, образующихся в процессе стерилизации. Насколько велик риск того, что эти вещества опасны для здоровья, зависит от склонности к разрушению или деградации конечного изделия.

5.2.2 Керамики, металлы и сплавы

Данные материалы обычно менее сложны относительно входящих в их состав химических веществ, по сравнению с полимерами и материалами из биотканей.

5.2.3 Полимеры

Как правило, данные материалы имеют существенно более сложный состав по сравнению с описанием, приведенным в 5.2.1. Может присутствовать целый ряд примесей, степень полимеризации может варьироваться в широких пределах.

5.2.4 Материалы из биотканей

Эта самая сложная по составу группа материалов. Эти материалы часто содержат остаточные количества веществ, появляющихся в процессе изготовления (например, сшивающие и антимикробные агенты). По плотности образцы одного и того же биологического материала могут отличаться.

Методы настоящего стандарта не предназначены для исследования биотканей, и поэтому они менее адекватны для исследования их раздражающего и сенсибилизирующего действия, чем для материалов другой природы. Например, методы настоящего стандарта не рассматривают сенсибилизирующее действие сшивающих агентов.

5.3 Данные о химическом составе

5.3.1 Общие сведения

Должен быть полностью определен качественный химический состав материала. Необходимо иметь количественные данные относительно биологической безопасности материала. Если количественные данные по биологической безопасности отсутствуют, то этот факт должен быть обоснован и документирован.

5.3.2 Существующие источники сведений о химическом составе

Качественная и количественная информация о составе должна быть получена от поставщика или изготовителя материала.

Для полимеров часто требуется доступ к информации, защищенной правами на интеллектуальную собственность. Для этого необходим договор о конфиденциальности на передачу и использование информации.

Качественная информация о добавках, используемых в процессе переработки (например, вещества, облегчающие высвобождение изделия из формы), также может быть получена от компетентного представителя производства, включая наименование технологических стадий и состав оборудования.

При отсутствии каких-либо данных о составе необходимо по данным литературы найти для аналогичного материала и добавок рекомендуемые соответствующие методы для их анализа.

Примечание — Состав керамики, металлов и сплавов должен быть определен в соответствии с соответствующими стандартами ISO 10993 или ASTM (Американского общества по исследованию материалов). Однако, чтобы получить полные и детальные данные о качественном и количественном составах материала, необходимо затребовать их от поставщика или изготовителя исходного материала, а также получить сведения о дополнительных веществах, используемых в процессе переработки. Могут быть использованы также досье на материал или другие источники, если они доступны.

5.4 Характеристика материалов

Если информация о детальном составе материала недоступна или существует только качественная информация, или может ожидаться, что новые или неизвестные вещества могут появиться в процессе производства, может возникнуть необходимость проведения анализа материала.

Необходимо использовать аналитические подходы, соответствующие исследуемому материалу. Все аналитические методики должны быть обоснованы, утверждены и отражены в отчете. Если значение pH материала (химических растворов) не известно заранее, то оно должно быть измерено, по возможности, до испытаний *in vivo* или *in vitro*. Химический анализ (качественный и количественный) экстрактов может предоставить полезную информацию. В данном контексте необходимо подчеркнуть, что химический анализ экстракта может дать результаты, делающие исследование раздражительности и сенсибилизации ненужным, так как в них уже может содержаться информация по раздражающему и сенсибилизирующему потенциалу соединений, присутствующих в растворе экстракта.

6 Методы исследования раздражающего действия

6.1 Методы *in vitro*

Два метода *in vitro*, исследование на коже крыс методом чрескожного электрического сопротивления (TER) и EPISKIN тест, относятся к международным, официально утвержденным альтернативным методам для оценки коррозионного действия на кожу химических веществ. Однако в настоящее время нет утвержденных методов по исследованию раздражающего действия материалов на кожу.

Национальные и международные организации продолжают работу по разработке и утверждению методов *in vitro* по раздражающему действию на кожу параллельно с поиском серии альтернативных методов; продолжается разработка методов количественной оценки реакции животных и человека для более четкого определения времени завершения исследования с использованием неинвазивных методов, см. С.1 приложения С.

6.2 Факторы, влияющие на планирование исследования и выбор методов *in vitro*

Исследование раздражающего действия медицинских изделий проводят с конечным продуктом и (или) с его экстрактом.

На результаты изучения раздражающего действия оказывают влияние следующие факторы:

- природа изделия, используемого в аппликационном исследовании;
- доза исследуемого материала;
- способ аппликации испытуемого материала;
- степень окклюзии;
- место аппликации;
- продолжительность и число экспозиций;
- методика оценки результатов исследований.

Дополнительная информация приведена в приложении С.

Определенная свобода исследователей в выборе методов и желание модифицировать их для повышения чувствительности в соответствии с условиями применения материалов, частотой и длительностью их использования требуют сравнения результатов исследований, полученных разными организациями. Описанные методики используют для исследования материалов и изделий, имеющих многократный и/или длительный контакт с организмом. После консультаций с изготовителем исследователь должен спланировать эксперимент таким образом, чтобы его продолжительность и/или концентрация испытуемого вещества превышали значения, применяемые в медицинской практике. Увеличение концентрации экстракта из материала учитывают при анализе результатов эксперимента.

При использовании материалов, контактирующих со здоровой и тем более поврежденной кожей, не оправдан даже незначительный риск, однако многие потенциальные раздражители находят широкое применение в связи с преобладанием их полезных свойств.

Следует отметить, что если значение pH испытуемого образца меньше или равно 2,0 или больше или равно 11,5, материал признают потенциальным раздражителем и дальнейшие исследования его не проводят. Экспериментально доказано, что на возникновение серьезных повреждений влияют также концентрация испытуемого вещества, время контакта и его химические и физические свойства. Если при проведении исследований доза материала сознательно завышена, то незначительное неблагоприятное воздействие последнего не всегда является основанием для его запрещения.

6.3 Исследование раздражающего действия на кожу экспериментальных животных

6.3.1 Принцип метода

Оценивают потенциальную способность материала оказывать раздражающее действие на кожу животного. В качестве экспериментальной модели предпочтительнее использовать кролика.

6.3.2 Исследуемый материал

Твердые вещества (включая порошки) или жидкость готовят к исследованиям в соответствии с приложением А.

Для демонстрации чувствительности оценки желательно, дополнительно к отрицательному контролю, ввести положительный контроль для каждого животного. Так как образцы и контроль исследуют в двух местах каждый, то следует применять максимально не более двух исследуемых материалов с контролем на одном животном с использованием при аппликации одного и того же растворителя.

6.3.3 Экспериментальные животные и их содержание

Используют половозрелых молодых кроликов-альбиносов одной линии, любого пола, массой не менее 2 кг.

Акклиматизацию и уход за животными осуществляют в соответствии с ISO 10993-2.

При ожидаемой реакции раздражения для первичной оценки исследуемого материала используют одно животное. Если наблюдается хорошо выраженная положительная реакция (оценочный балл больше двух либо для эритемы, либо для отека, см. таблицу 1), дальнейшие исследования проводят минимум на двух животных.

Если возникновение реакции раздражения маловероятно, то первичную оценку проводят на трех животных.

Если результаты исследований, полученные не менее чем на трех животных, сомнительны или неясны, проводят дополнительные исследования.

6.3.4 Проведение исследований

6.3.4.1 Подготовка животных

Критическим фактором исследования является состояние кожи животного. Используют только животных со здоровой неповрежденной кожей.

За 4—24 ч до начала проведения исследований выстригают шерсть на участках площадью примерно 10 х 15 см по обеим сторонам спины для аппликации и наблюдения.

Примечание — Сбривать шерсть на подготовленных участках необязательно, так как практика показала, что это не влияет на результаты исследований.

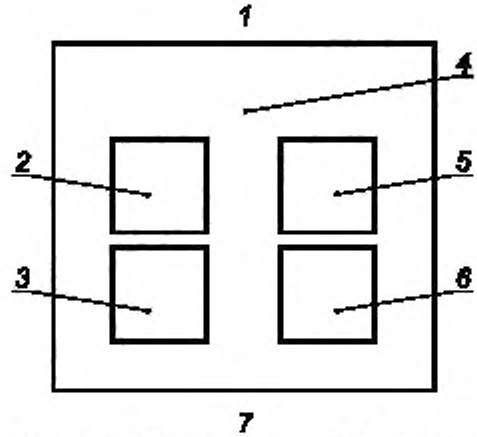
При многократном воздействии исследования проводят в соответствии с 6.3.4.2, 6.3.4.3 или 6.3.4.4 в течение не более 21 сут.

6.3.4.2 Аппликация порошкообразных и жидких образцов

Наносят 0,5 г или 0,5 мл исследуемого материала на кожу с каждой стороны, как показано на рисунке 1.

Порошкообразный исследуемый материал перед нанесением слегка смачивают водой или другим подходящим растворителем.

Участки с нанесенным материалом сверху покрывают кусочками ткани или марли, сложенными вчетверо, площадью 25 х 25 мм и фиксируют полуокклюзионной или окклюзионной повязкой. Время экспозиции — не менее 4 ч. Удаляют защитную повязку и кусочки ткани, отмечают положение участков. Затем удаляют остатки испытуемого вещества соответствующими средствами, например теплой водой или другим растворителем, не оказывающим раздражающего действия, и насухо промокают.



1 — голова; *2* — исследуемая область; *3* — контрольная область; *4* — выстриженная дорсальная область; *5* — контрольная область; *6* — исследуемая область, *7* — хвост

Рисунок 1 — Расположение областей для аппликации

6.3.4.3 Аппликация экстрактов и растворителя

Смачивают соответствующим экстрактом сложенный вчетверо кусочек марли (0,5 мл на кусочек), прикладывают его к участку кожи с каждой стороны спины животного, как показано на рисунке 1. Контрольный кусочек марли, смоченный растворителем, помещают на кожу другого участка.

Покрывают места аппликаций полуокклюзионной или окклюзионной повязкой не менее чем на 4 ч. Затем снимают фиксирующую повязку и отмечают положение участков, удаляют остатки испытуемого вещества подходящими средствами, например теплой водой или другим растворителем, не оказывающим раздражающего действия, и насухо промокают.

6.3.4.4 Аппликация твердых образцов

Прикладывают образцы исследуемого материала на кожу спины каждого кролика с каждой стороны позвоночника, как показано на рисунке 1. Подобным образом прикладывают контрольные образцы на кожу спины каждого кролика. Поверхность твердых образцов (которые при необходимости могут быть измельчены) смачивают водой или другим растворителем, что позволяет обеспечить более плот-

ное прилегание образца к коже (см. приложение А). Если в опыте используют растворитель, учитывают его влияние на результаты эксперимента.

Покрывают исследуемый образец защитным покрытием размерами 25 х 25 мм (таким как подушечка ткани или марли) и фиксируют места аппликации полуокклюзионной или окклюзионной повязкой не менее чем на 4 ч. Затем снимают повязку, отмечают положение участков, удаляют остатки исследуемых материалов подходящими средствами, например теплой водой или другим растворителем, не оказывающим раздражающего действия, и насухо промокают.

6.3.5 Обследование животных

6.3.5.1 Общие положения

Наблюдение за реакцией кожи осуществляют при естественном или близком к естественному искусственном освещении. Описывают и оценивают степень кожной реакции, включая эритему и отек, в соответствии с классификацией, представленной в таблице 1, для каждого участка и каждого интервала времени наблюдения.

Регистрируют результаты в отчете об исследовании.

Примечание — В некоторых случаях можно применять гистологические и неинвазивные методы исследования.

6.3.5.2 Однократный аппликационный метод

При однократном воздействии регистрируют состояние каждого участка кожи, где проводили аппликации, через 1, 24, 48 и 72 ч после удаления образцов. Более длительное наблюдение (но не более 14 сут) проводят при возникновении стойких изменений кожи для определения их обратимости.

Таблица 1 — Система классификации кожных реакций

Реакция	Оценка в баллах
Эритема и образование струпа	
Отсутствие эритемы	0
Очень слабая эритема (едва заметная)	1
Хорошо различимая эритема	2
Умеренная эритема	3
Резко выраженная эритема (темно-красная) с образованием струпа	4
Образование отека	
Отсутствие отека	0
Очень слабый отек (слегка заметный)	1
Заметный отек, выступающий над поверхностью кожи и имеющий четко выраженные границы	2
Умеренный отек (выступающий над поверхностью кожи около 1 мм)	3
Выраженный отек (распространенный, выступающий над поверхностью кожи более чем на 1 мм)	4
Максимально возможное число баллов	8
Примечание — Другие кожные реакции должны быть внесены в отчет об исследовании и зарегистрированы.	

6.3.5.3 Многократный аппликационный метод

При многократном воздействии регистрируют состояние кожи в месте аппликации через 1 ч после удаления образца и непосредственно перед следующей аппликацией. После последней аппликации регистрируют состояние каждого участка через 1, 24, 48 и 72 ч после снятия образцов. Более длительное наблюдение (но не более 14 сут) проводят при стойких изменениях кожи для определения их обратимости.

6.3.6 Оценка результатов

При остром воздействии определяют индекс первичного раздражения (ИПР), при этом для каждого животного складывают баллы первичного раздражения, вызванного исследуемым материалом, включая отеки и эритемы, в каждый интервал времени наблюдения и делят их на общее число наблюдений (на 6 — по 2 на каждый интервал времени). Если в исследованиях использовался контроль,

вычисляют балл первичного раздражения контроля. Для объективности исследований из балла первичного раздражения исследуемого материала вычитают балл первичного раздражения контроля.

Для вычислений используют только данные наблюдений, полученные через 24, 48, 72 ч. Наблюдения, сделанные при определении дозы или позже чем через 72 ч, во внимание не принимают.

Для получения ИПР складывают баллы каждого животного и делят на число особей.

При многократном воздействии определяют индекс суммарного раздражения, при этом для каждого животного складывают баллы раздражения, включая эритемы и отеки, в каждый интервал времени. Делят полученное число на общее число наблюдений и получают средний балл раздражения для каждого животного.

Для получения индекса суммарного раздражения складывают средние баллы раздражения всех подопытных животных и делят на число особей.

Индекс суммарного раздражения сравнивают со значениями, представленными в таблице 2, и регистрируют в отчете об исследовании.

Таблица 2 — Степени ответной реакции на раздражение у кроликов

Ответная реакция	Число баллов
Незначительная	От 0 до 0,4
Слабая	От 0,5 до 1,9
Умеренная	От 2,0 до 4,9
Выраженная	От 5,0 до 8,0

Примечание — Индекс суммарного раздражения позволяет экстраполировать на человека результаты определения ИПР на химические вещества у кроликов, учитывая предыдущий опыт исследования ряда химических веществ на обоих видах.

Для каждого случая определяют максимальный ответ на раздражение, фиксируют время, при котором это раздражение возникает, и его продолжительность.

Оценка в баллах и описания, представленные в таблице 2, характеризуют индексы первичного и суммарного раздражений.

6.3.7 Представление результатов

В отчет об исследованиях включают:

- описание испытуемого образца;
- предполагаемый способ применения материала или изделия;
- подробное описание подготовки образца к исследованиям;
- вид экспериментальных животных;
- способ аппликации исследуемых образцов;
- методы ведения наблюдений и их регистрации;
- оценку результатов.

6.4 Исследование раздражающего действия на коже человека

6.4.1 Введение

В настоящее время прогноз кожного раздражения у человека для определения вредных факторов основан на использовании подопытных животных (см. приложение С). Тем не менее, существуют проблемы экстраполяции от животных на человека. Для химикатов, контакт человека с которыми высок (например, косметика и чистящие средства), оценку риска часто проводят с помощью аппликационного метода на коже человека.

Исследования на человеке могут служить нескольким целям:

a) прямое определение опасности для человека проведением тестирования химикатов на людях, а не на лабораторных животных;

b) предоставление оценки риска для определенных химикатов, контакт человека с которыми высок;

c) облегчение экстраполяции данных, полученных ранее при исследованиях лабораторных животных, на человека.

Настоящий стандарт позволяет прямое получение для человека данных по раздражению кожи в целях определения вредных факторов. Его целью является определение, представляет ли собой материал опасность, ведущую к значительному раздражению кожи после острого воздействия.

Клинические испытания должны проводиться в соответствии с ISO 14155-1 и ISO 14155-2.

Примечание — В С.1 приложения С приведена дальнейшая информация по исследованиям раздражения.

6.4.2 Предварительный анализ

Для уверенности в том, что исследование не представляет собой никакого значительного риска для здоровья, должна быть в наличии адекватная информация по токсичному профилю материала и (где применимо) составляющих его химикатов, включая данные впитывания через кожу.

Материалы не должны испытываться на людях, если

a) в прогнозирующей пробе было показано, что они являются раздражителями, *in vitro* или *in vivo*,

b) в прогнозирующей пробе было показано, что они являются едкими, *in vitro* или *in vivo*,

c) потенциальная едкость для кожи человека может быть спрогнозирована на основе соотношения структура/действие и/или физико-химических свойств, таких как сильная кислота или щелочь,

d) они представляют риск сенсибилизации кожи или дыхательных путей,

e) они представляют любую степень опасности острой токсичности при условиях исследования и/или

f) они представляют любую генотоксичную, репродуктивную или канцерогенную опасность.

Дальнейшие инструкции по выбору добровольцев приведены в 6.4.5.1 и С.1 приложения С.

6.4.3 Принцип метода

Однократную дозу тестируемого материала наносят под окклюзией на кожу добровольцев. Раздражение сводится к минимуму нанесением исследуемого материала на короткие периоды. Более длительные периоды воздействия могут быть приемлемы при определенных условиях.

Основным способом оценки является определение пропорции добровольцев, у которых появилось кожное раздражение, связанное с реакцией на сопутствующий материал положительного контроля.

6.4.4 Описание метода

6.4.4.1 Выбор добровольцев для исследования

Настоящий стандарт предназначен для проведения испытаний на здоровых добровольцах. Выбранным добровольцам должно быть, по меньшей мере, 18 лет; они не должны быть беременными или кормить грудью. Кроме того, добровольцы, с известной чувствительностью к исследуемому материалу или демонстрирующие любые признаки дерматита, должны быть исключены из исследования. Выбор добровольцев должен проходить под наблюдением дерматолога или другого квалифицированного специалиста.

6.4.4.2 Приготовление доз

Жидкие исследуемые материалы обычно используют в неразведенном виде. При исследовании твердых веществ, увлажняют исследуемый материал небольшим количеством воды (обычно 0,2 мл) или, при необходимости, другим подходящим раствором для обеспечения хорошего контакта с кожей. Необходимо учитывать структуру твердого вещества, и выбор подготовки исследуемого материала должен быть обоснован. При использовании увлажненных образцов необходимо убедиться, что каждый субъект получает одинаковое количество исследуемого материала. Используют одинаковое количество воды для увлажнения кожи каждого добровольца в исследовании и отражают это количество документально.

При использовании растворителя необходимо учитывать его влияние на кожное раздражение исследуемым материалом. Если в качестве смачивающего агента для твердых соединений используется растворитель, не являющийся водой, рассматривают возможность применения аппликации с контрольным раствором (контроль растворителя) на каждом субъекте.

6.4.4.3 Проведение исследования

6.4.4.3.1 Число добровольцев

Исследование должно быть выполнено, по меньшей мере, на 30 добровольцах, не менее трети из которых должны быть противоположного пола.

6.4.4.3.2 Способ аппликации исследуемого материала

Наносят исследуемый материал на неповрежденную кожу в приемлемом месте, например, на верхнюю внешнюю часть руки, посредством окклюзионной камеры, содержащей марлевую прокладку. Место нанесения должно быть одинаковым для всех добровольцев и отражено документально. Обычно размер аппликации должен составлять как минимум 1,8 см, предпочтительно 2,5 см в диаметре. Аппликация должна находиться в контакте с кожей с помощью подходящей нераздражающей повязки, включая нераздражающую липкую ленту, в течение всей продолжительности периода воздействия.

Аппликация должна содержать адекватную дозу на площадь единицы. оптимальным считается примерно от 50 до 100 мг исследуемого материала на квадратный сантиметр. При нанесении жидких исследуемых материалов обычно добавляют от 0,2 до 0,4 мл к марлевой прокладке, пока та не становится влажной. При исследовании твердых материалов обычно 0,2 г исследуемого материала смачи-

вают и добавляют к марлевой прокладке. Как альтернативный метод нанесения твердых материалов марлевую прокладку смачивают и исследуемым материалом покрывают весь испытуемый участок.

6.4.4.3.3 Продолжительность воздействия

Во избежание неприемлемо сильных реакций необходимо использовать адаптированный подход к исследованию. Методика последовательной аппликации дает возможность развития положительного, но не тяжелого, ответа на раздражитель. Аппликации применяют прогрессивно, начиная с длительности в 15 и 30 мин, и до 1, 2, 3 и 4 ч. Возможно пропустить 15 и/или 30-минутные периоды воздействия при наличии достаточных признаков того, что чрезмерных реакций не произойдет после 1-часового воздействия. Переход к более длительному воздействию, включая 24-часовое воздействие закрытой аппликацией на новом участке кожи, будет зависеть от отсутствия кожного раздражения (оцениваемого по меньшей мере до 48 ч), возникающего от более краткого воздействия, для обеспечения того, чтобы любая замедленная реакция на раздражитель была адекватно оценена.

Аппликацию материала на более длительный период воздействия всегда проводят на ранее не обработанный участок.

В конце периода воздействия удаляют остатки исследуемого материала, используя, по показаниям, воду или соответствующий растворитель, не меняющий существующей кожной реакции или целостности эпидермиса.

6.4.4.3.4 Ограничения в длительности воздействия

В дополнение к информации об увеличении длительности аппликации, как описано в 6.4.4.3.3, если есть подозрения, что материал может вызвать сильное раздражение, необходимо использовать значительно сокращенное время воздействия, возможно, в ограниченной по численности группе добровольцев. Прогресс исследования затем может быть определен на основе полученных данных. Последующие аппликации наносят только после получения результатов данных после 48/72 ч.

6.4.4.3.5 Клиническое наблюдение и оценка кожных реакций

Обработанные участки осматривают на предмет признаков раздражения и кожную реакцию оценивают немедленно после удаления аппликации и после 1 ч до 2, 24, 48 и 72 ч после удаления аппликации. Если необходимо определить обратимость ответа, период наблюдения может быть продлен более 72 ч. Дополнительно состояние кожи до и после исследования должно быть тщательно описано (например, пигментация и степень увлажнения). Кожное раздражение оценивают и записывают согласно оценочной шкале в таблице 3.

Возможно применение неинвазивных биоинженерных методов (см. приложение С).

Таблица 3 — Исследование раздражения на коже человека, оценочная шкала

Описание ответной реакции	Баллы
Нет реакции	0
Слабо положительная реакция (обычно охарактеризованная легкой эритемой и/или сухостью на большей части обработанного участка)	1
Умеренно положительная реакция (обычно отчетливая эритема или сухость, возможно распространяющаяся за пределы обработанного участка)	2
Сильно положительная реакция (сильная и зачастую распространяющаяся эритема с отеком и/или образованием струпа)	3

Предполагается, что добровольцы с баллом 1 и более после воздействия длительностью менее 4 ч покажут более сильную реакцию при воздействии материала длительностью в 4 ч. Как только была получена оценка 1 балл или выше, необходимость подвергать реагирующего добровольца дальнейшей обработке материалом отпадает. Может понадобиться дальнейшее наблюдение для надлежащего ухода за добровольцем. В дополнение к наблюдению за раздражением любые другие эффекты должны быть отражены документально и полностью описаны. Например, добровольцы должны быть обучены делать комментарии в связи с нанесением аппликаций (например, сенсорные эффекты), а эксперты должны быть готовы отмечать немедленные ответы (например, крапивницу), когда аппликации удалены. Такие наблюдения могут не обозначать раздражающего эффекта, но они должны быть включены в отчет об исследовании, если замечены. При их важности они должны быть учтены в управлении исследованием для обеспечения надлежащего ухода за добровольцами.

Критическими полученными данными является число добровольцев, у которых появилось или ожидалось появление раздражения кожи после воздействия до 4 ч. Время, требующееся для выработки индивидуального ответа (если таковой есть), не является оцениваемой частью результатов; оно имеет отношение только к обеспечению надлежащего ухода за добровольцами.

6.4.4.3.6 Обоснование и выбор вещества для положительного контроля

Так как клинические исследования демонстрируют вариацию в своих ответах на раздражители, необходимо включить положительный контроль для определения адекватности группы испытуемых для обнаружения раздражающих эффектов исследуемого соединения. В качестве положительного контроля предпочтительно использовать 20 %-ный додецилсульфат натрия (SDS), так как его раздражающий эффект хорошо охарактеризован (см. С.1 приложения С). При обосновании возможно использовать другой контроль.

Стандартный положительный контроль может быть включен в качестве опорной точки. Кожное раздражение не является абсолютным феноменом. Любой материал может стать причиной кожного раздражения, в зависимости от дозы, характера и длительности воздействия. Таким образом, исследования раздражения на коже человека почти всегда являются сравнительными и должны быть привязаны к известной химической раздражительности.

6.4.5 Данные и отчетность

6.4.5.1 Данные

Данные, включая результаты воздействия положительного и отрицательного контролей, должны быть суммированы в форме таблицы, показывающей для каждого индивидуума оценку раздражения через 24, 48 и 72 ч после удаления аппликации, а также любые другие наблюдаемые эффекты.

6.4.5.2 Оценка/интерпретация данных

Целью данного исследования является определение, представляет ли собой материал потенциальную опасность, ведущую к значительному раздражению кожи после острого воздействия. Таким образом, если материал вызывает раздражение кожи у объектов исследования с частотой, сходной или превышающей положительный контроль, то он будет рассматриваться как значительный кожный раздражитель. С другой стороны, если материал вызывает раздражение кожи в объектах исследования с частотой, которая значительно меньше положительного контроля, то он не может рассматриваться в качестве значительного кожного раздражителя. Важно, чтобы предварительные данные, полученные в ходе наблюдения за добровольцами, не были спутаны с конечными данными, т.е. пропорцией субъектов, показывающих раздражающую реакцию. Также важно не путать индивидуальные различия в подверженности кожному раздражению с общим потенциалом исследуемого материала к раздражению кожи.

6.4.5.3 Отчет об исследовании

Отчет об исследовании должен содержать следующую информацию:

a) этические аспекты и информационное согласие от добровольцев;

b) данные об исследуемом материале:
- физические параметры и, где применимо, физико-химические свойства;
- идентификационные данные;

c) носитель (растворитель):

- идентификация и обоснование выбора носителя, используемого для увлажнения твердого исследуемого материала;

d) данные о добровольцах:
- число добровольцев, обработанных исследуемым веществом;
- распределение добровольцев по возрасту/полу;

e) результаты:
- уровень ответов в 0; 1,2; 24; 48 и 72 ч и в любое другое время наблюдений;
- занесение в таблицу данных раздражительной реакции для каждого индивидуума в каждый временной период наблюдения (с суммированной частотой показателей раздражительной реакции после, например 24, 48 и 72 ч после удаления аппликации);
- описание всех наблюдаемых реакций на раздражитель;
- описание любых других эффектов в дополнение к наблюдаемому раздражению;
- статистическую обработку результатов (сравнение с положительным контролем, например, используя точный критерий Фишера);
- описание или ссылку на исследование на животных *in vitro* или *in vivo*, если таковое было проведено перед исследованием на добровольцах, включая детали процедуры и полученные результаты с материалами исследования и ссылками;

f) обсуждение результатов.

7 Методы исследования гиперчувствительности замедленного типа

7.1 Выбор метода

Наиболее широко для исследования гиперчувствительности замедленного типа материалов применяют два метода: метод максимального сенсибилизирующего воздействия (GPMT) и метод закрытых накожных аппликаций (Buehler).

Метод максимального сенсибилизирующего воздействия более чувствителен и является предпочтительным для простых веществ. Этот метод применим для исследования экстрактов. Однако значимость этого метода показана для простых химических веществ.

Недавно был утвержден в качестве международного метод оценки простых химических веществ — местная проба на лимфоузле мыши (LLNA) как альтернатива оценке на коже морских свинок [83].

Примечание — Перечень альтернативных методов приведен в приложении С.

7.2 Выбор концентрации испытуемого образца

7.2.1 Общие сведения

Данные методы для исследования потенциального сенсибилизирующего действия простых химических веществ рекомендованы только для одного значения концентрации на каждое исследование. Однако результаты исследования сильно зависят от дозы введенного вещества. Если метод используется для оценки сенсибилизирующего действия экстракта, рекомендуется проведение количественного и качественного анализа его состава.

7.2.2 Индукционная фаза

Скорость сенсибилизации в большой степени зависит от индукционной дозы, которая должна вызывать умеренное раздражение кожи. Если порог раздражения кожи не достигнут, то выбирают более высокую концентрацию, но которая не должна сказываться на здоровье животного. Индукционную дозу выбирают на основе предварительных экспериментов. Неразбавленные экстракты на основе известных растворов для парентерального введения не нуждаются в предварительных исследованиях.

7.2.3 Провокационная фаза

Концентрацию провокационной пробы также определяют в ходе предварительных экспериментов на животных, ранее не подвергавшихся воздействию исследуемого материала. Концентрация провокационной пробы должна быть ниже порога концентрации, вызывающей раздражение кожи. Рекомендуется использовать более чем одну концентрацию для провокационной пробы для того, чтобы сделать более легкой оценку результатов (см. С.2 приложения С).

7.3 Прочие факторы, влияющие на полученные результаты исследований

При выборе метода учитывают биохимические и физические характеристики исследуемого материала. Метод максимального воздействия требует внутрикожного введения, следовательно, если исследуемый материал нельзя ввести внутрикожно, необходимо использовать альтернативный метод.

Выбранный растворитель должен повышать чувствительность метода благодаря частичному растворению материала и проникновению в более глубоко лежащие слои кожи. Концентрация исследуемого материала должна быть максимально возможной, но не оказывать влияния на интерпретацию результатов. Важным фактором при местном воздействии является концентрация материала на поверхности кожи, а не его объем. Большинство исследователей предпочитает растворы, потому что дисперсии склонны к образованию осадка, что затрудняет точное дозирование. Примерами носителей для внутрикожной инъекции служат солевой раствор, пропиленгликоль и растительное масло.

Расхождение в результатах, полученных разными лабораториями, возможно по нескольким причинам. В процедуре испытаний важно следующее: окружающие условия, место испытания на животном, метод удаления волос или химической депиляции, тип пластыря, объем исследуемого материала, качество окклюзии, время экспозиции и осмотра животных. Реактивность животных также изменяется в зависимости от генетических факторов и сезонных колебаний.

Сравнение подопытных животных с положительной реакцией с животными контрольных групп дает возможность адекватно выявить положительную реакцию, при этом тяжесть возникших патологических изменений также имеет значение для интерпретации результатов. Пограничные реакции в

спорных случаях лучше всего разрешаются повторным исследованием. Гистопатологические исследования, как показано, не помогают в оценке результатов.

Чтобы гарантировать воспроизводимость и чувствительность испытательной процедуры, тесты с известными контактными аллергенами, например меркаптовензотиазолом (mercaptobenzothiazole), гексиломом коричным альдегидом (hexyl cinnamic aldehyde) и бензокаином (benzocaine), должны регулярно выполняться.

7.4 Метод максимального сенсибилизирующего воздействия

7.4.1 Цель исследования

Исследование проводят для определения потенциальной способности материала оказывать сенсибилизирующее действие на кожу морских свинок.

7.4.2 Подготовка исследуемого материала

Твердые вещества (включая порошки) или жидкость готовят к исследованиям в соответствии с приложением А. Концентрация пробы должна быть максимально возможной, но не мешать интерпретации результатов (см. 7.4.4.2).

7.4.3 Экспериментальные животные и их содержание

Используют здоровых молодых половозрелых морских свинок-альбиносов одной линии, любого пола, массой до начала эксперимента 300—500 г. В эксперименте не используют беременных самок или животных после спаривания.

Акклиматизацию и содержание животных осуществляют в соответствии с ISO 10993-2.

Предварительные тесты должны быть выполнены на одном наборе животных, чтобы определить оптимальные концентрации для исследования (см. 7.4.4.2).

Для исследования порошкообразных или жидких материалов используют не менее 10 животных на каждый исследуемый образец, и не менее пяти животных составляют контрольную группу. Для проведения предварительных исследований используют дополнительное число животных.

При исследовании экстрактов также используют не менее 10 животных для каждого экстракта, и не менее пяти морских свинок составляют контрольную группу для каждого раствора. Для проведения предварительных исследований используют дополнительное число животных.

Если испытание на 10 опытных и пяти контрольных животных полностью отрицательное, маловероятно, что дальнейшее испытание на 10 опытных и пяти контрольных животных даст положительные результаты. Однако, если проявятся какие-нибудь сомнительные реакции, перепроверка должна быть выполнена (см. 7.4.6). Если сомнительные реакции остаются, проводят новое исследование на минимум 20 опытных и 10 контрольных животных.

7.4.4 Проведение исследования

7.4.4.1 Подготовка

Шерсть на подопытных участках кожи тщательно выстригают до начала исследования.

Доза, вводимая внутрикожно в каждый исследуемый участок, составляет 0,1 мл.

Для аппликаций пропитывают испытуемой пробой фильтровальную бумагу или гигроскопичную марлевую подушечку (4—8 $см^2$), которые прикладывают на выстриженные участки кожи и фиксируют окклюзионной повязкой вокруг тела животного.

7.4.4.2 Предварительные исследования

Предварительные испытания предназначены, чтобы определить концентрацию испытуемой пробы, которая будет использоваться в основном исследовании, см. 7.4.4.3.

Неразведенные экстракты при использовании известных растворителей не нуждаются в предварительном испытании.

Должно быть рассмотрено возможное влияние введения полного адъюванта Фрейнда (FCA) в сочетании с испытуемым материалом во время основного теста и, таким образом, возможное искажение результатов.

Согласно применению испытывают крайние разведения на трех животных.

Через 24 ч снимают повязку и образцы и оценивают состояние опытных участков на наличие эритемы и отека в соответствии с таблицей 4 (по классификации Magnusson и Kligman).

Для индукционной фазы в основном тесте выбирают самую высокую концентрацию, которая не вызывает более чем очень слабую эритему, и не оказывает общего отрицательного воздействия на животных.

Таблица 4 — Система классификации реакции кожи

Описание ответной реакции	Баллы
Нет видимых изменений	0
Дискретная или очаговая эритема	1
Умеренная и сплошная эритема	2
Интенсивная эритема и припухлость	3

7.4.4.3 Основной тест

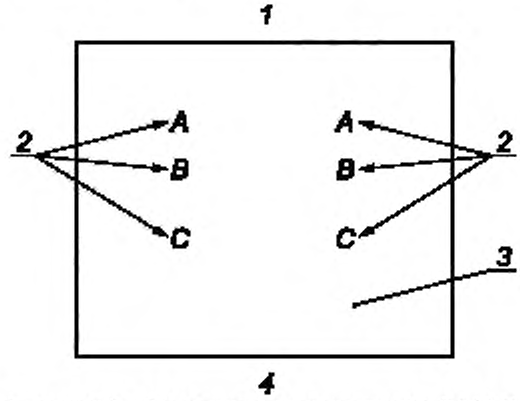
7.4.4.3.1 Внутрикожная индукционная фаза

Каждому животному в выстриженные участки кожи (*A*, *B* и *C*) в соответствии с рисунком 2 проводят парные внутрикожные инъекции в объеме 0,1 мл.

A: Смесь полного адъюванта Фрейнда с выбранным растворителем в соотношении V/V= 50/50. Необходимо использовать физиологический солевой раствор (в соответствии с Британской Фармакопеей, Фармакопеей США или эквивалентный) для водорастворимых материалов.

B: Испытуемый образец (неразведенный экстракт), контрольным животным вводят только растворитель.

C: Испытуемый образец в концентрации, выбранной для участка *B*, эмульгированный с полным адъювантом Фрейнда в соотношении *V/V* = 50/50 и растворителем (50 %); контрольным животным вводят только эмульсию контрольного раствора с адъювантом.



1 — голова; *2* — 0,1 мл внутрикожная инъекция (см. 7.4.4.3.1); *3* — выстриженная внутрилопаточная область; *4* — хвост

Рисунок 2 — Расположение участков внутрикожной инъекции

7.4.4.3.2 Местная индукционная фаза

Через семь дней (± 1 день) после внутрикожной индукционной фазы начинают накожные аппликации исследуемого материала на участки инъекций, на внутрилопаточную область каждого животного, используя для этого пропитанные кусочки фильтровальной бумаги или марли площадью 8 см^2.

При этом используют концентрацию согласно 7.4.4.3.1 для участка *B*. Если максимальная концентрация, которая может быть достигнута в 7.4.4.3.1, не вызывает раздражения, предварительно обрабатывают область аппликации 10 %-ным раствором натрия додецил сульфата, вмассировав в кожу за (24 ± 2) ч до аппликации. Накладывают окклюзионную повязку. Удаляют повязку через (48 ± 2) ч.

Предпочтительны свежеприготовленные экстракты. Если экстракты приготовлены ранее чем за 24 ч, то стабильность экстрактов при хранении должна быть проверена.

Процедуру с контрольными животными повторяют в том же режиме, используя только контрольный раствор.

7.4.4.3.3 Провокационная фаза

Через 14 дней (± 1 день) после завершения местной индукционной фазы провоцируют всех опытных и контрольных животных испытуемым материалом. Для этого проводят аппликации исследуемого

материала в концентрации согласно 7.4.4.3.1 для участка *C*, на интактные участки кожи бока каждого животного, используя фильтровальную бумагу или гигроскопичную марлевую подушечку. Разбавления этой концентрации могут также быть наложены к другим интактным участкам подобным образом. Накладывают фиксирующую окклюзионную повязку. Удаляют повязку и аппликации через (24 ± 2) ч.

7.4.5 Обследование животных

Осматривают поверхность участков, где проводили провокационную пробу подопытных и контрольных животных, через 24; 48 ч после снятия повязки. Для визуализации реакций кожи рекомендуют использование естественного или освещения с полным спектром.

Описывают и оценивают степень кожной реакции, включая эритему и отек, в соответствии с таблицей 4 (по Magnusson и Kligman) для каждого участка и в каждый интервал времени наблюдения.

Настоятельно рекомендуется, чтобы описание было сделано без учета предварительного воздействия, чтобы минимизировать погрешность в оценке результатов.

7.4.6 Оценка результатов

Если оценка в баллах, полученная в подопытной группе, равна 1 или выше, о наличии сенсибилизации говорят в том случае, если у контрольных животных этот показатель менее 1 балла. Если оценка в баллах у контрольных животных равна 1 или выше, то реакция кожи подопытных животных, которая превышает самую сильную реакцию, наблюдаемую в контроле, является результатом сенсибилизации.

Если реакция сомнительная, проводят дополнительную провокационную пробу. Результат испытания может быть представлен как частота положительных результатов провокационной пробы в опытной и контрольной группах.

Иногда в подопытной группе у большего, чем в контроле, числа животных выявлена ответная реакция, однако интенсивность реакции не выше, чем у контрольных животных. В этом случае проводят дополнительную провокационную пробу для получения более четкого ответа организма. При необходимости дополнительную провокационную пробу проводят в срок от 1 до 2 недель после первой провокации. При этом применяют описанный выше метод, используя другой бок животного.

Рекомендуется использовать новую контрольную группу с введением адъюванта.

7.4.7 Отчет об исследовании

В отчет об исследовании включают:

a) описание исследуемого материала или изделия;

b) предполагаемый способ применения материала или изделия;

c) подробное описание подготовки образца к исследованию;

d) описание экспериментальных животных;

e) способ нанесения испытуемых проб;

f) маркировку участков введения и их описание;

g) данные наблюдений;

h) оценку результатов.

7.5 Метод закрытых накожных аппликаций для выявления гиперчувствительности замедленного типа

7.5.1 Цель исследования

Оценивают потенциальную способность материала оказывать кожное сенсибилизирующее действие на морских свинках.

7.5.2 Подготовка испытуемого образца

Если материал не может быть использован как есть, он должен быть подготовлен в соответствии с приложением А, с использованием полярного и неполярного растворителей. Форма и размеры конкретных устройств (например, электродов) должны быть учтены.

7.5.3 Экспериментальные животные и их содержание

Используют здоровых молодых половозрелых морских свинок-альбиносов одной линии, любого пола, массой до начала эксперимента 300—500 г. В эксперименте не используют беременных самок или животных после спаривания.

Акклиматизацию и содержание животных осуществляют в соответствии с ISO 10993-2.

Предварительные тесты должны быть выполнены на одном наборе животных, чтобы определить оптимальные концентрации для исследования (см. 7.5.4.2).

Для исследования порошкообразных или жидких материалов используют не менее 10 животных на каждый исследуемый образец, и не менее 5 животных составляют контрольную группу. Дополнительное число животных используют для проведения предварительных исследований.

При исследовании экстрактов также используют не менее 10 животных для каждого экстракта, и не менее пяти морских свинок составляют контрольную группу для каждого раствора. Дополнительное число животных используют для предварительных исследований.

Если испытание на 10 опытных и пяти контрольных животных полностью отрицательное, маловероятно, что дальнейшее испытание на 10 опытных и пяти контрольных животных даст положительные результаты. Однако, если проявятся какие-нибудь сомнительные реакции, должна быть выполнена перепроверка (см. 7.5.6). Если сомнительные реакции остаются, проводят новое исследование на минимум 20 опытных и 10 контрольных животных.

7.5.4 Проведение исследования

7.5.4.1 Подготовка

Шерсть на подопытных участках кожи тщательно выстригают до начала эксперимента. Для всех способов применения пропитывают исследуемым материалом фильтровальную бумагу или гигроскопичную марлевую подушечку соответствующих размеров, прикладывают ее к выстриженному участку и фиксируют окклюзионной повязкой на 6 ч.

Чтобы обеспечить плотное прилегание испытуемого образца к коже, животное рекомендуется фиксировать.

Если используют обертывание, его адекватность должна быть оценена в каждом эксперименте.

7.5.4.2 Предварительные испытания

Предварительные испытания проводят для того, чтобы определить концентрацию исследуемого материала, которая будет использована в основном испытании в соответствии с 7.5.4.3.

Медицинские изделия, предназначенные для типичного использования, и неразведенные экстракты, полученные при использовании обычных растворителей, не требуется подвергать предварительному тестированию.

Для всех способов применения пропитывают исследуемым материалом фильтровальную бумагу или гигроскопичную марлевую подушечку соответствующих размеров, прикладывают ее к выстриженному участку и фиксируют окклюзионной повязкой на 6 ч.

Описывают и оценивают степень кожной реакции, включая эритему и отек, в соответствии с таблицей 4 (по Magnusson и Kligman) для каждого участка через 24 и 48 ч после удаления повязки.

Выбирают:

a) для индукционной фазы в основном испытании — наивысшую концентрацию, которая вызывает незначительную эритему, но не оказывает общего отрицательного влияния на организм животного;

b) для провокационной фазы в основном эксперименте — наивысшую концентрацию, которая не вызывает эритемы.

7.5.4.3 Основное испытание

7.5.4.3.1 Индукционная фаза

Наносят испытуемый образец актуальным способом на выстриженную область левой верхней части спины каждого животного, используя адекватный путь и концентрации, выбранные по 7.5.4.2, перечисление a). Удаляют фиксирующие приспособления и повязку через 6 ч. Повторяют эту процедуру последовательно три дня в неделю в течение трех недель. Контрольным животным проводят все процедуры в том же режиме, используя при этом только контрольный раствор.

7.5.4.3.2 Провокационная фаза

Через 14 дней (± 1 день) после последней индукционной аппликации проводят провокационную пробу с испытуемым материалом. Провокационную пробу проводят способом однократной местной аппликации на выстриженный, интактный участок кожи каждого животного, используя соответствующий исследуемый материал в концентрации, выбранной в 7.5.4.2, перечисление b). Удаляют фиксирующие приспособления и повязку через 6 ч.

7.5.5 Обследование животных

Через (24 ± 2) ч после первой или второй провокационной пробы проводят:

a) удаление шерсти у всех животных на подопытных участках и окружающей их коже с помощью депилятора, имеющегося в продаже, в соответствии с прилагаемой к нему инструкцией или

b) выбривание шерсти у всех животных на подопытных участках и окружающей их коже.

Полностью обмывают теплой водой лишенную волос область и высушивают кожу полотенцем перед возвращением животных в клетки. Не менее чем через 2 ч после описанной выше процедуры

удаления шерсти оценивают состояние исследуемых участков в соответствии с таблицей 4. Осмотр повторяют через (48 ± 2) ч после провокационного воздействия.

Использование естественного или освещения с полным спектром рекомендуют для визуализации реакций кожи.

Настоятельно рекомендуется, чтобы описание было сделано без учета предварительного воздействия, чтобы минимизировать погрешность в оценке результатов.

7.5.6 Оценка результатов

Если оценка в баллах, полученная в подопытной группе, равна 1 или выше, о наличии сенсибилизации говорят в том случае, если у контрольных животных этот показатель менее 1 балла. Если оценка в баллах у контрольных животных равна 1 или выше, то реакция кожи подопытных животных, которая превышает самую сильную реакцию, наблюдаемую в контроле, является результатом сенсибилизации.

Если реакция сомнительная, проводят дополнительную провокационную пробу. Результат испытания может быть представлен как частота положительных результатов провокационной пробы в опытной и контрольной группах.

Иногда в подопытной группе у большего, чем в контроле, числа животных выявлена ответная реакция, однако интенсивность реакции не выше, чем у контрольных животных. В этом случае проводят дополнительную провокационную пробу для получения более четкого ответа организма. При необходимости дополнительную провокационную пробу проводят в срок от 1 до 2 недель после первой провокации. При этом применяют описанный выше метод, используя другой бок животного.

Рекомендуется использовать новую нативную контрольную группу.

7.5.7 Отчет об исследовании

В отчет об исследовании включают:

a) описание исследуемого материала или изделия;

b) предполагаемый способ применения материала или изделия;

c) подробное описание подготовки образца к исследованию;

d) описание экспериментальных животных;

e) способ нанесения испытуемых проб;

f) маркировку участков введения и их описание;

g) данные наблюдений;

h) оценку результатов.

8 Ключевые факторы при интерпретации результатов исследований

Методы, включенные в настоящий стандарт, являются важным инструментом при разработке безопасной продукции при условии, что их выполняет и интерпретирует обученный персонал.

Обнаруженное любым из методом сенсибилизирующее действие не является причиной невозможности применения данного материала или изделия, так как объем образца при проведении испытаний может существенно превышать объем, используемый в реальных условиях. Найденный любым утвержденным методом отрицательный эффект свидетельствует о необходимости дальнейшего анализа, что позволит уменьшить риск исследований на коже человека.

При интерпретации результатов не следует опираться только на исследования, полученные методами, изложенными в настоящем стандарте. Отрицательный результат не всегда исключает возможность того, что продукция может вызывать аллергическую реакцию кожи. Как отрицательный, так и положительный результаты должны быть тщательно проверены для исключения ложного вывода. Для обоснования результата его необходимо проверить, используя другие источники информации, такие как:

a) претензии со стороны изготовителя и покупателя;

b) опыт работы с изделиями, содержащими сходные составляющие;

c) результаты диагностических тестов в дерматологических клиниках;

d) ретроспективные эпидемиологические данные.

Приложение А
(обязательное)

Подготовка материалов для исследования раздражающего и сенсибилизирующего действия

А.1 Общие положения

При изучении раздражающего и сенсибилизирующего действия и интерпретации результатов учитывают свойства исследуемого материала или изделия, продолжительность, частоту, способ и степень его контакта с организмом. Одним из важных условий проведения исследований является подготовка исследуемого материала.

А.2 Материалы для прямого контакта

А.2.1 Твердые материалы

Твердые материалы подходящей формы (лист, пленка и т. д.) исследуют, не подвергая изменениям, используя образцы размерами 2,5 х 2,5 см и толщиной не более 0,5 см. Образцы отрицательного контроля готовят аналогичным образом.

Отрицательный контроль должен быть близок по физическим параметрам с испытуемым материалом и не должен быть раздражителем.

Твердый материал может быть измельчен (исключая возможное загрязнения), если при этом полностью сохраняются его свойства или он в достаточной степени увлажнен водой или подходящим растворителем, не обладающим раздражающим действием, что обеспечивает более тесный контакт материала с кожей.

Керамические материалы измельчают, однако следует помнить, что физико-химические свойства керамики меняются при ее переходе в порошкообразное состояние.

Порошки (например, суперабсорбенты) исследуют при непосредственном нанесении или после приготовления из них пасты с использованием подходящего растворителя, при этом параллельно со смешанным, растворенным или суспендированным исследуемым материалом в качестве контрольного раствора используют этот растворитель.

Примечание — Площадь поверхности и/или размер частиц — важные факторы в биологических реакциях, таких как фагоцитоз, который играет важную роль в воспалительном и иммунном ответах.

А.2.2 Жидкие материалы

Жидкие материалы исследуют непосредственно или в виде растворов с использованием подходящего растворителя, при этом параллельно со смешанным, растворенным или суспендированным исследуемым материалом в качестве контрольного раствора используют этот растворитель.

А.3 Экстракты из испытуемых материалов

Твердые материалы испытывают, подвергая исследованию экстракты из них. Если испытывают экстракты, то они должны быть подготовлены в соответствии с ISO 10993-12, с использованием полярных, неполярных и/или других подходящих растворителей, если это необходимо.

Параллельно с экстрактом из исследуемого материала в качестве контроля используют экстрагирующий растворитель.

А.4 Растворители

Если испытуемый материал подвергают экстракции, разбавлению, суспендированию или увлажнению, следует использовать соответствующий растворитель, не обладающий раздражающим действием. Список соответствующих растворителей рассматривается в ISO 10993-12.

А.5 Стерильные испытуемые материалы

Если изделие поступает в продажу стерильным, то перед изучением исследуемый материал подвергают стерилизации тем же методом. Существуют определенные трудности при исследовании образцов, стерилизованных окисью этилена, поскольку окись этилена и продукты ее деструкции могут оказывать биологическое действие в исследованиях, рекомендованных настоящим стандартом. При обнаружении любого неблагоприятного воздействия на организм проводят исследования, позволяющие дифференцировать, вызвана ли обнаруженная реакция действием самого изучаемого материала или она обусловлена остаточным количеством окиси этилена. Если выявлено первичное раздражающее действие, образец исследуют до и после стерилизации окисью этилена.

Приложение В
(справочное)

Дополнительные методы исследования раздражающего действия

В.1 Общие положения

Следующие специальные методы нужно считать дополнительными к базовым исследованиям, они не заменяют основные. Если эти методы применяют, то необходимо объяснить их выбор. Они рекомендуются для медицинских изделий, имеющих соответствующее специфическое применение.

В.2 Внутрикожная реакция

В.2.1 Принцип метода

Исследование проводят для определения потенциальной возможности материала оказывать раздражающий эффект после внутрикожной инъекции экстракта из материала.

В.2.2 Исключение из исследования

Материал, вызывающий раздражение кожи, глаз или слизистой, или материал, значение pH которого меньше или равно 2 или больше или равно 11,5, внутрикожным исследованиям не подвергают.

В.2.3 Исследуемый материал

Испытуемый образец должен быть экстрактом, приготовленным в соответствии с приложением А. Большое число участков на каждом животном может быть подготовлено вместе с соответствующим отрицательным контролем или контролем растворителя.

В.2.4 Экспериментальные животные и их содержание

Используют молодых здоровых половозрелых кроликов-альбиносов любого пола, одной линии, массой не менее 2 кг.

Акклиматизацию и содержание животных осуществляют в соответствии с ISO 10993-2.

Для предварительной оценки исследуемого материала в опытную и контрольную группы берут по две особи.

При неудовлетворительных или сомнительных результатах, полученных при предварительной оценке, проводят дополнительные исследования.

В.2.5 Процедура исследований

За 4 — 18 ч до начала исследования, подстригают мех на спинах животных, оставляя достаточное расстояние с обеих сторон позвоночного столба для инъекции экстрактов.

Вводят внутрикожно 0,2 мл экстракта, полученного с полярным растворителем на пяти участках на одной стороне каждого кролика (см. рисунок В.1). Используют иглу для внутрикожных инъекций наименьшего диаметра, соответствующего вязкости исследуемого материала.

Точно так же вводят 0,2 мл контроля полярного растворителя на следующих пяти участках, на том же самом боку каждого кролика (см. рисунок В.1).

Повторяют все процедуры для экстрактов, полученных с неполярным растворителем и контролем неполярного растворителя на другом боку каждого кролика (см. рисунок В.1).

Если используют другие растворители, повторяют вышеупомянутые процедуры для экстрактов, полученных с другими растворителями и контрольными группами растворителей.

В.2.6 Обследование животных

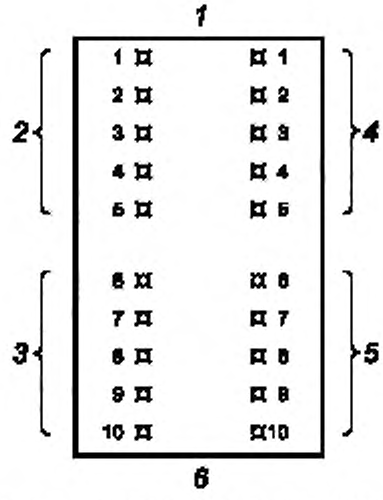
Отмечают состояние мест инъекции непосредственно сразу, через 24, 48 и 72 ч после введения.

Оценивают степень тканевой реакции, включая эритему и отек, в соответствии с классификацией, представленной в таблице В.1, для каждого места инъекции и каждого интервала времени наблюдения и регистрируют результаты.

Примечание — Внутрикожная инъекция масла часто вызывает воспалительную реакцию.

Внутривенное введение соответствующих витальных красителей, таких как трипановый синий или Evans blue, сделанное перед последним обследованием животных (72 ч после инъекции), позволяет лучше оценить реакцию на внутрикожное введение вещества, окрашивая места возникшего раздражения.

Для оценки, по возможности, применяют методы, наименее травмирующие животных.



1 — голова; *2* — инъекция 0,2 мл полярного экстракта; *3* — инъекция 0,2 мл контроля полярного растворителя; *4* — инъекция 0,2 мл неполярного экстракта; *5* — инъекция 0,2 мл контроля неполярного растворителя; *6* — хвост

Рисунок В.1 — Расположение участков инъекции

Таблица В.1 — Система оценки внутрикожных (интрадермальных) реакций

Реакция	Оценка в баллах
Эритема и образование струпа	
Отсутствие эритемы	0
Очень слабая эритема (едва заметная)	1
Хорошо различимая эритема	2
Умеренная эритема	3
Резко выраженная эритема (темно-красная) с образованием струпа	4
Образование отека	
Отсутствие отека	0
Очень слабый отек (едва заметный)	1
Хорошо различимый отек	2
Умеренный отек (выступающий над поверхностью кожи около 1 мм)	3
Резко выраженный отек (распространенный, выступающий над поверхностью кожи более чем на 1 мм)	4
Максимально возможное число баллов	8
Примечание — Другие реакции, возникшие в месте инъекции, должны быть отмечены в отчете об исследовании.	

В.2.7 Оценка результатов

После 72-часовой оценки, складывают все баллы эритемы и отека для каждого испытуемого образца и контрольного раствора. Делят каждую сумму на 12 (2 животных × 3 периода оценки × 2 оцениваемые категории), чтобы определить среднее значение для каждого испытуемого образца и соответствующего контрольного раствора. Требования испытания выполнены, если разница между средним значением в опытной группе и соответствующим контролем меньше или равна 1,0.

Если в любой период наблюдения средняя реакция на испытуемый образец больше, чем средняя реакция на контроль растворителя, повторяют исследование, используя трех дополнительных кроликов. Требования ис-

пытания выполнены, если разница между средним значением в опытной группе и соответствующим контролем меньше или равна 1,0.

B.2.8 Протокол исследований

Протокол исследований должен включать:
a) описание испытуемых образцов;
b) предполагаемый способ применения материала или изделия;
c) подробное описание подготовки образцов к исследованиям;
d) описание экспериментальных животных;
e) метод инъекции;
f) описание процедуры снятия показаний;
g) ведение наблюдений и их регистрацию;
h) оценку результатов.

B.3 Исследование глазного раздражающего действия

B.3.1 Общие положения

Исследование глазного раздражающего действия проводят, только если данные по безопасности не могут быть получены другими средствами, и только для материалов, которые контактируют с глазами или веками.

Примечание — Тест-системы *in vitro* находятся в стадии разработки. Когда эти методы будут валидированы, их можно будет применять взамен этого *in vivo* метода.

B.3.2 Принцип метода

Исследование проводят для определения потенциальной возможности материала оказывать раздражающий эффект на ткани глаза.

B.3.3 Исключение из исследования

Материал и/или готовый продукт, вызывающий явную коррозию и сильное раздражение кожи не подвергают исследованию на глазах. Любой материал, вызывающий раздражение кожи, или материал, pH которого ≤ 2 или ≥ 11,5, исследованиям не подвергают и признают потенциальным раздражителем глаз.

B.3.4 Исследуемый материал

Если исследуемый материал представляет собой жидкость, закапывают 0,1 мл в нижний отдел конъюнктивального мешка глаза.

Твердый или гранулированный продукт измельчают до пылеобразного состояния и затем, слегка уплотнив, аккуратно вводят в нижний отдел конъюнктивального мешка глаза такое количество материала, которое занимает объем 0,1 мл, но не более 100 мг.

Примечание — Некоторые материалы нельзя исследовать непосредственно на слизистой глаза, так как возникают механические повреждения.

Если исследуемый материал находится в баллоне под давлением, получают некоторое количество этого вещества и вводят 0,1 мл так же, как для жидких веществ.

Материал в аэрозольной упаковке:

a) разбрызгивают в течение 1 с с расстояния 10 см непосредственно на поверхность открытого глаза или

b) впрыскивают в охлажденную емкость и наносят так же, как жидкие продукты.

Если исследованиям подвергают экстракт из образцов, его приготавливают в соответствии с приложением А. Закапывают 0,1 мл экстракта в нижний отдел конъюнктивального мешка глаза.

В идентичных условиях готовят контроль с использованием полярных и неполярных растворителей в отсутствии испытуемого вещества.

B.3.5 Экспериментальные животные и их содержание

Используют здоровых молодых половозрелых кроликов-альбиносов одной линии, любого пола, массой от 2 до 3 кг.

Акклиматизацию и содержание животных осуществляют в соответствии с ISO 10993-2.

Для предварительной оценки исследуемого материала используют одно животное.

Если никакой реакции не ожидается, предварительная оценка может быть проведена на трех животных.

При выраженной реакции (см. таблицу B.2), полученной при предварительной оценке на одном животном, дальнейшие исследования не проводят.

Если при исследованиях твердых или жидких материалов не наблюдается выраженной реакции, далее используют не менее двух животных, а при исследовании экстрактов из материалов — не менее двух животных на каждый экстракт.

Если результаты исследований, полученные не менее чем на трех животных, сомнительны или неясны, дополнительные исследования обосновывают.

В.3.6 Процедура исследований

За 24 ч до начала испытания визуально проверяют оба глаза каждого кролика на предмет обнаружения отклонений от нормы.

Если обнаружится отклонение от нормы любого глаза, то следует взять другое животное.

При осмотре можно использовать 2 %-ный раствор флуоресцеина натрия (в соответствии с Британской фармакопеей) для более четкого выявления изменений роговицы. Рекомендуется использовать офтальмоскоп, ручную щелевую лампу или другие устройства.

Вводят исследуемый материал, как указано в В.3.4, в один глаз.

После инстилляции веки соединяют и держат в таком положении в течение 1 с.

Другой глаз каждого животного служит контрольным, на нем выполняют все процедуры, используя контрольный раствор.

Если в остром эксперименте исследуемый материал не проявил выраженной реакции, допускается проведение повторных процедур с перерывом в 72 ч.

Продолжительность исследования определяют в соответствии с продолжительностью воздействия материала или изделия на организм при его применении в медицинской практике.

В.3.7 Обследование животных

Оба глаза животного, которому однократно инстиллировали исследуемый материал, осматривают через 1, 24, 48 и 72 ч после воздействия.

Если имеются стойкие изменения, проводят постоянное наблюдение (но не более 21 сут) для оценки их прогрессирования и обратимости. При обнаружении тяжелых повреждений постоянные наблюдения не проводят.

Примечание — FDA требует проведения исследование контактных линз в течение 21 сут по 8 ч в день. Это требование является исключением из настоящего стандарта.

Оценивают и регистрируют любые наблюдаемые реакции в соответствии с классификацией, представленной в таблице В.2.

Таблица В.2 — Система оценки повреждения глаза

Реакция	Оценка в баллах
1 Роговица	
Степень помутнения (площадь поражения)	
Отсутствие	0
Генерализованное или диффузное помутнение, детали радужной оболочки хорошо различимы	1*
Легко различимое полупрозрачное помутнение, детали радужной оболочки замутнены	2*
Опалесцирующее помутнение, детали радужной оболочки не различимы, размер зрачка определить невозможно	3*
Помутнение светонепроницаемо, радужная оболочка не видна	4*
Площадь пораженной роговицы	
Одна четверть (или менее)	0
Более одной четверти, но меньше половины	1
Более половины, но меньше трех четвертей	2
Более трех четвертей и площадь всего глаза	3
2 Радужная оболочка	
Нормальная	0
Складчатость выше нормы, заметное набухание, сосуды инъецированы (один или все указанные симптомы), радужная оболочка реагирует на свет (реакция положительная)	1*

Окончание таблицы В.2

Реакция	Оценка в баллах
Реакция на свет отсутствует, увеличение кровоизлияний (один или все симптомы)	2*
3 Конъюнктива	
Краснота (относится к конъюнктиве век и глазного яблока, исключая роговицу и радужную оболочку)	
Нормальные сосуды	0
Сосуды заметно инъецированы (выше нормы)	1
Более выраженная диффузная краснота, отдельные сосуды плохо различимы	2*
Диффузная резко выраженная краснота	3*
Хемоз (отек конъюнктивы)	
Отсутствие отека	0
Слегка заметный отек (включая мигательную перепонку)	1
Выраженный отек с частичным выворотом век	2*
Отек с половинным закрытием века	3*
Отек с закрытием века от половинного до полного	4*
Выделения	
Отсутствие выделений	0
Незначительные выделения, отличающиеся от нормальных (не учитывать наличие выделений во внутреннем углу глаза, наблюдаемое и у контрольных животных)	1
Выделения на веках и шерсти вокруг глаз	2
Выделения на веках, шерсти вокруг глаз и значительной площади мордочки	3
* Положительный результат.	

Животным, которым проводят многократные инстилляции, глаза осматривают до начала процедуры, непосредственно после нее и через 1 ч после каждой процедуры.

Если наблюдается выраженное раздражение после последней процедуры, наблюдение продолжают. Наблюдение продолжают в случае изменений роговицы или других признаков раздражения глаза для оценки прогрессирования и обратимости возникших патологических процессов.

Оценивают и регистрируют любые наблюдаемые реакции в соответствии с классификацией, представленной в таблице В.2.

Немедленный вывод животных из эксперимента проводят с использованием гуманных методов эвтаназии в следующих случаях:

a) тяжелые поражения глаз (такие, как изъязвление или образование струпа на конъюнктиве, перфорация на роговице, скопление крови и гноя в передней камере глаза) или

b) кровотечение или нагноение или

c) серьезные изъязвления роговицы.

Животное выводят из эксперимента при обнаружении максимального, в соответствии с системой оценки (см. таблица В.2), действия:

- отсутствия светового рефлекса (степень поражения 2 радужной оболочки) или помутнения роговицы (степень 4) без видимого улучшения в течение 24 ч;
- сильного воспаления конъюнктивы (хемоз степени 4 совместно с гиперемией степени 3) без видимого улучшения через 48 ч.

В.3.8 Оценка результатов

Выявленные различия в состоянии испытуемого и контрольного глаза описывают и объясняют, используя классификацию в таблице В.2.

a) Острое воздействие

Если при воздействии исследуемого материала в подопытном глазу более чем у одного животного обнаружены патологические изменения (оценка со знаком сноски в таблице В.2), считают, что материал обладает раздражающим действием, и дальнейшие исследования не проводят.

Если патологические изменения выявлены в подопытном глазу только одного из трех кроликов или при сомнительных результатах, исследования продолжают.

Если при продолжении воздействия патологические изменения на опытных глазах (оценка со знаком сноски в таблице В.2) обнаруживаются более чем у половины кроликов на любой стадии обследования, считают, что материал обладает раздражающим действием.

При тяжелом поражении глаза даже у одного животного материал признают раздражителем.

b) Повторное воздействие

Если при повторном воздействии на глаз более чем у половины животных исследуемой группы возникают патологические изменения (оценка со знаком сноски в таблице В.2) на любой стадии обследования, признают исследуемый материал раздражителем.

В.3.9 Протокол исследований

Протокол исследований должен содержать:

a) описание испытуемых образцов;

b) предполагаемый способ применения материала или изделия;

c) подробное описание подготовки образцов к исследованиям;

d) описание экспериментальных животных;

e) метод инъекции;

f) описание процедуры снятия показаний;

g) ведение наблюдений и их регистрации;

h) оценку результатов.

В.4 Исследование раздражающего действия на слизистую ротовой полости

В.4.1 Общие положения

Исследование раздражающего действия на слизистую ротовой полости проводят для материалов с контактом указанного вида, если данные по безопасности не могут быть получены другими средствами.

В.4.2 Принцип метода

Исследование проводят для определения потенциальной возможности материала оказывать раздражающий эффект на ткани ротовой полости.

В.4.3 Исключение из исследования

Любой материал, вызывающий раздражение кожи или глаз, или материал, значение pH которого менее или равно 2 или более или равно 11,5, исследованиям не подвергают и признают потенциальным раздражителем тканей ротовой полости.

В.4.4 Исследуемый материал

Подготовку исследуемых материалов проводят в соответствии с приложением А.

В.4.5 Экспериментальные животные и их содержание

Используют молодых здоровых половозрелых сирийских хомячков инбредной линии обоих полов.

Акклиматизацию и содержание животных осуществляют в соответствии с ISO 10993-2.

На шею каждого хомячка надевают воротник шириной 3—4 мм, располагающийся так, чтобы не мешать нормальному питанию и дыханию, но препятствовать выталкиванию шарика изо рта. Взвешивают животных ежедневно в течение 7 дней. Следят за массой каждого животного и, если необходимо, поправляют воротник. Если масса животного резко уменьшается, его исключают из опыта.

Для предварительной оценки исследуемого материала используют не менее трех хомячков.

Примечание — Дополнительно могут быть использованы животные, подвергаемые воздействию отрицательного контроля или контрольного раствора, при необходимости. Если результаты в предварительном испытании сомнительные, то проводят дополнительные исследования.

В.4.6 Процедура исследований

Снимают с каждого животного воротник и выворачивают защечный мешок. После промывания защечного мешка физиологическим раствором обследуют его слизистую на наличие любых изменений.

Твердые образцы в виде таблеток или шариков диаметром не более 5 мм помещают непосредственно в защечный мешок. Жидкими материалами или экстрактами пропитывают ватные шарики, регистрируют используемый при этом объем и помещают в один защечный мешок каждого животного. Вместо этого можно таким же

объемом наполнить защечный мешок. Другой защечный мешок без образца является контролем. Все процедуры с контрольными животными проводят параллельно.

По необходимости снимают воротник и возвращают животных в клетку.

Продолжительность контакта с материалом зависит от реального времени воздействия изделия при применении в медицинской практике, но не должна быть менее 5 мин. После воздействия снимают воротник, удаляют ватный тампон и промывают защечный мешок физиологическим раствором, стараясь не загрязнить второй мешок.

При остром воздействии указанную процедуру повторяют каждый час в течение 4 ч.

При многократном воздействии число аппликаций, их продолжительность и интервалы между аппликациями зависят от особенностей применения изделия в медицинской практике.

В.4.7 Обследование животных

Макроскопическое исследование защечных мешков проводят после извлечения таблетки или шарика и непосредственно перед следующей аппликацией, если она необходима.

Оценивают состояние слизистой защечных мешков и степень реакции в соответствии с таблицей В.3 на каждый интервал времени наблюдения для каждого животного. Регистрируют результаты в отчете об исследовании.

Через 24 ч после последнего воздействия макроскопически исследуют защечные мешки, умерщвляют животных гуманными методами и берут образцы тканей с соответствующих участков защечного мешка. Помещают их в соответствующий фиксатор до обработки для гистологических исследований.

Таблица В.3 — Система оценки реакции тканей ротовой полости и пениса

Реакция	Оценка в баллах
Эритема и образование струпа	
Отсутствие эритемы	0
Очень слабая эритема (едва заметная)	1
Хорошо различимая эритема	2
Умеренная эритема	3
Резко выраженная эритема (темно-красная) с образованием струпа	4
Примечание — Другие возникшие реакции в тканях должны быть отмечены в отчете об исследовании.	

В.4.8 Оценка результатов

В.4.8.1 Макроскопическое исследование

Сравнивают состояние слизистой подопытных защечных мешков с защечными мешками на противоположной стороне и, если это предусмотрено, с защечными мешками животных контрольной группы.

Баллы (таблица В.3) каждого наблюдения складывают и делят на общее число наблюдений, чтобы получить среднее значение на одно животное.

Примечания

1 Эти наблюдения могут быть полезны для гистологической оценки.

2 Результаты предварительной оценки, проведенной до первой аппликации исследуемой пробы, не включают в подсчет баллов.

В.4.8.2 Гистологические исследования

Раздражающее действие исследуемого материала на ткани ротовой полости оценивают патоморфологи.

Определяют состояние тканей в соответствии с системой классификации, представленной в таблице В.4.

Баллы, полученные при микроскопическом исследовании всех животных в опытной группе, суммируют и делят на число наблюдений для определения среднего значения в группе. Те же вычисления повторяют для контрольной группы. Максимальное значение может достигать 16.

Общее число баллов больше девяти, полученное при микроскопическом исследовании контрольных защечных мешков в опытной группе, может указывать на скрытые патологические процессы, а у контрольных животных — на травмирование при дозировании. Такая ситуация может потребовать повторного исследования, если в других исследованиях или контрольных группах обнаружены высокие значения.

Разность средних баллов, полученных для опытной и контрольной групп, дает индекс раздражения (см. таблицу В.5).

При оценке результатов многократного воздействия таблицу В.4 модифицируют, чтобы учесть показатели реакции тканей, связанные с хроническим раздражением.

В.4.9 Протокол исследований

Протокол исследований должен содержать:

a) описание испытуемых образцов;
b) предполагаемый способ применения материала или изделия;
c) подробное описание подготовки образцов к исследованиям;
d) описание экспериментальных животных;
e) способ аппликации исследуемых образцов;
f) описание процедуры снятие показаний;
g) ведение наблюдений и их регистрации;
h) гистологическую оценку;
i) оценку результатов.

Таблица В.4 — Система оценки в микроскопическом исследовании реакции тканей ротовой полости, пениса, вагины

Реакция	Оценка в баллах
1 Эпителий	
Нормальный, интактный	0
Клеточная дистрофия или уплощение	1
Метаплазия	2
Локальная эрозия	3
Генерализованная эрозия	4
2 Лейкоцитарная инфильтрация (на поле наблюдения)	
Отсутствие	0
Минимальная — менее 25	1
Слабая — от 25 до 50	2
Средняя — от 50 до 100	3
Значительная — более 100	4
3 Закупорка сосудов	
Отсутствие	0
Минимальная	1
Слабая	2
Средняя	3
Значительная с некрозом сосудов	4
4 Отек	
Отсутствие	0
Минимальный	1
Слабый	2
Средний	3
Значительный	4

Таблица В.5 — Индекс раздражения

Индекс раздражения	
Средний балл	Прилагаемое описание
0	Отсутствие
1 до 4	Минимальный
5 до 8	Слабый
9 до 11	Средний
12 до 16	Резко выраженный

Окончание таблицы В.5

Примечание 1 — Другие выявленные изменения в тканях должны быть зарегистрированы и учтены при оценке результатов.

Примечание 2 — Система оценки при микроскопическом исследовании в таблице В.4 может быть применена ко всем перечисленным методам. «Индекс раздражения» был разработан для исследования вагинального раздражающего действия, но может применяться и в остальных случаях.

В.5 Исследование раздражающего действия на пенис

В.5.1 Общие положения

Исследование раздражающего действия на ткани пениса проводят для материалов с контактом указанного вида, если данные по безопасности не могут быть получены другими средствами.

В.5.2 Принцип метода

Исследование проводят для определения потенциальной возможности материала оказывать раздражающий эффект на пенис.

В.5.3 Исключение из исследования

Любой материал, вызывающий раздражение кожи или глаз, или материал, значение pH которого менее или равно 2 или более или равно 11,5, исследованиям не подвергают и признают потенциальным раздражителем пениса.

В.5.4 Исследуемый материал

Если исследуемый материал является твердым или жидким, то подготовку пробы проводят в соответствии с приложением А.

В.5.5 Экспериментальные животные и их содержание

Используют молодых здоровых половозрелых самцов кроликов-альбиносов или морских свинок массой не менее 2 кг для кроликов и 300 — 500 г для морских свинок.

Акклиматизацию и содержание животных осуществляют в соответствии с ISO 10993-2.

Длина пениса должна быть не менее 1 см.

Так как существуют индивидуальные различия в пигментации, животных осматривают перед первой аппликацией исследуемого материала. Для оценки степени реакции используют систему оценки, приведенную в таблице В.3. Животных со значительными отклонениями от нормы или с эритемой степенью 2 балла или выше, исключают из эксперимента.

Для предварительной оценки исследуемого материала в опытную и контрольную группы берут по три особи.

При неудовлетворительных или сомнительных результатах, полученных при предварительной оценке, проводят дополнительные исследования.

В.5.6 Процедура исследований

Животных помещают на спину, фиксируют конечности.

Осторожно надавливая указательным и средним пальцами на генитальную область, извлекают пенис. Наносят достаточный объем (приблизительно 0,2 мл) испытуемой пробы так, чтобы пенис был покрыт полностью.

Позволяют органу втянуться обратно. Необходимо помешать животному облизывать испытуемый участок во избежание искажения проявления первичного раздражения вторичными факторами (например, следует применить елизаветинский воротник).

Другой возможный способ — помещение животного в специальное устройство, где оно остается в течение 1 ч после аппликации, а затем возвращение его в клетку.

В остром эксперименте эту процедуру повторяют каждый час в течение 4 ч.

В длительном эксперименте число аппликаций, их продолжительность и интервалы между аппликациями зависят от особенностей применения изделия в медицинской практике.

В.5.7 Обследование животных

При остром воздействии отмечают состояние кожи пениса через 1 ч после первой аппликации (т. е. непосредственно перед следующей) и далее после каждой следующей аппликации. Отмечают и регистрируют состояние кожи пениса через 1, 24 и 48 ч после последней аппликации.

При длительном многократном воздействии состояние пениса оценивают через 1 ч после первой аппликации и непосредственно перед каждым последующим воздействием.

Оценивают степень реакции поверхности кожи на наличие эритемы в соответствии с системой оценки, приведенной в таблице В.3, для каждого животного и каждого интервала времени наблюдения и регистрируют результаты в отчете об исследовании.

Если у какого-либо животного обнаружено покраснение до первой аппликации, то баллы, которыми оценено это состояние кожного покрова, вычитают из баллов эритемы возникшей в результате воздействия, чтобы определить баллы эритемы, появившейся только под воздействием материала.

В.5.8 Оценка результатов

В.5.8.1 Макроскопическое исследование

Сравнивают состояние пениса и его оболочки у экспериментальных и контрольных животных.

Баллы (таблица В.3) каждого наблюдения суммируют и делят на общее число наблюдений, чтобы получить среднее значение на одно животное.

Примечания

1 Эти наблюдения могут быть полезны для гистологической оценки.

2 Результаты предварительной оценки, проведенной до первой аппликации исследуемой пробы, не включают в подсчет баллов.

Через 48 ч после последней аппликации животных подвергают эвтаназии, используя гуманные методы. Дистальный участок пениса и оболочки иссекают и помещают в соответствующий фиксатор перед обработкой для гистологических исследований.

В.5.8.2 Гистологические исследования

Раздражающее действие на кожу пениса оценивают патоморфологи. Определяют состояние тканей в баллах в соответствии с системой оценки, представленной в таблице В.4.

Баллы, полученные при микроскопическом исследовании всех животных опытной группы, суммируют и делят на число наблюдений, чтобы определить средний балл в группе. Максимальное значение может достигать 16.

Те же вычисления повторяют для контрольной группы.

Общее число баллов большее девяти, полученное при микроскопическом исследовании у контрольных животных, свидетельствует о наличии травмы. Повторное исследование проводят, если другие исследования или контрольные животные дают такие же высокие баллы.

Разность средних баллов, полученных для опытных и контрольных групп, дает индекс раздражения (см. таблицу В.5).

При оценке результатов многократного воздействия таблицу В.4 модифицируют, чтобы учесть показатели реакции тканей, связанные с хроническим раздражением.

В.5.9 Протокол исследований

Протокол исследований должен содержать:

a) описание испытуемых образцов;

b) предполагаемый способ применения материала или изделия;

c) подробное описание подготовки образцов к исследованиям;

d) описание экспериментальных животных;

e) способ аппликации исследуемых образцов;

f) описание процедуры снятия показаний;

g) ведение наблюдений и их регистрации;

h) гистологическую оценку;

i) оценку результатов.

В.6 Исследование ректального раздражающего действия

В.6.1 Общие положения

Исследование ректального раздражающего действия проводят для материалов с контактом указанного вида, если данные по безопасности не могут быть получены другими средствами.

В.6.2 Принцип метода

Исследование проводят для определения потенциальной возможности материала оказывать ректальный раздражающий эффект.

В.6.3 Исключение из исследования

Любой материал, вызывающий раздражение кожи или глаз, или материал, значение pH которого менее или равно 2 или более или равно 11,5, исследованиям не подвергают и признают потенциальным ректальным раздражителем.

В.6.4 Исследуемый материал

Если исследуемый материал является твердым или жидким, то подготовку пробы проводят в соответствии с приложением А.

В.6.5 Экспериментальные животные и их содержание

Используют молодых здоровых половозрелых кроликов-альбиносов любого пола, одной линии, массой не менее 2 кг. Если используют другие виды, их выбор должен быть обоснован.

Акклиматизацию и содержание животных осуществляют в соответствии с ISO 10993-2.

Для предварительной оценки исследуемого материала в опытную и контрольную группы берут по три особи.

При неудовлетворительных или сомнительных результатах, полученных при предварительной оценке, проводят дополнительные исследования.

Животных перед экспериментом и перед каждым воздействием обследуют для выявления возможных повреждений прямой кишки: опухолей, раздражения, связанного с инфекционными заболеваниями, и т. д.

В.6.6 Процедура исследований

Короткий (6 см) мягкий катетер или канюлю с тупым концом присоединяют к шприцу объемом 1 мл и более и заполняют шприц с катетером таким образом, чтобы объем исследуемого материала не превышал 1 мл. Для каждого животного используют индивидуальный шприц с катетером.

Фиксируют животное с помощью удерживающего приспособления, которое обеспечивает свободный доступ к промежности, или при помощи лаборанта, осторожно удерживающего животное и фиксирующего его за задние конечности таким образом, чтобы открыть промежность.

Катетер перед введением смачивают контрольным раствором или подходящей смазкой для облегчения ввода в кишку.

Захватывают и поднимают хвост животного, открывая промежность. Мягко вводят катетер глубоко в прямую кишку и впрыскивают 1 мл жидкости из шприца, затем катетер вынимают.

Поскольку объем прямой кишки у животных неодинаков, исследуемый материал может частично выйти из нее во время или сразу после введения. Аккуратно удаляют остатки материала мягкой тканью.

Повторяют вышеописанную процедуру через 24 ч ежедневно в течение 5 сут.

В длительном эксперименте число введений, их продолжительность и интервалы между ними зависят от особенностей применения изделия в медицинской практике.

В.6.7 Обследование животных

Через 24 ч после первой аппликации и непосредственно перед следующей отмечают и регистрируют изменения внешнего вида промежности, появление выделений, эритемы, раздражения. Животных, у которых обнаружены выраженные изменения, выделения или опухоли, не позволяющие повторить процедуру, подвергают эвтаназии, применяя гуманные методы, и исследуют ткани в соответствии с В.6.8.1.

Через 24 ч после последнего введения исследуемого материала животных подвергают эвтаназии с применением гуманных методов. Отсекают участок прямой кишки и дистальную часть толстой кишки, разрезают вдоль и обследуют, отмечая наличие раздражения, повреждений эпителиального слоя или некроза тканей. Прямую кишку и дистальную часть толстой кишки помещают в соответствующий фиксатор для дальнейших гистологических исследований.

В.6.8 Оценка результатов

В.6.8.1 Макроскопическое исследование

Через 24 ч после последнего введения исследуемого материала животных подвергают эвтаназии с применением гуманных методов.

Отсекают участок прямой кишки и дистальную часть толстой кишки, разрезают вдоль и обследуют, отмечая наличие раздражения, повреждений эпителиального слоя или некроза тканей.

Прямую кишку и дистальную часть толстой кишки помещают в соответствующий фиксатор для дальнейших гистологических исследований.

Сравнивают ректальные ткани в опытных и контрольных группах.

Регистрируют и описывают макроскопические изменения ректальных тканей каждого животного, отмечая различия между животными опытной и контрольной групп.

Примечание — Эти наблюдения могут быть полезны при гистологических исследованиях.

В.6.8.2 Гистологические исследования

Раздражающее действие на ректальные ткани проводят патоморфологи. Определяют состояние тканей в соответствии с системой оценки, представленной в таблице В.4.

Баллы, полученные при микроскопическом исследовании всех животных опытной группы, суммируют и делят на число наблюдений, чтобы определить средний балл в группе. Максимальное значение может достигать 16.

Те же вычисления повторяют для контрольной группы.

Общее число баллов большее девяти, полученное при микроскопическом исследовании у контрольных животных, свидетельствует о наличии травмы. Повторное исследование проводят, если другие исследования или контрольные животные дают такие же высокие баллы.

Разность средних баллов, полученных для опытных и контрольных групп, дает индекс раздражения (см. таблицу В.5).

При оценке результатов многократного воздействия таблицу В.4 модифицируют, чтобы учесть показатели реакции тканей, связанные с хроническим раздражением.

В.6.9 Протокол исследований

Протокол исследований должен содержать:

a) описание испытуемых образцов;
b) предполагаемый способ применения материала или изделия;
c) подробное описание подготовки образцов к исследованиям;
d) описание экспериментальных животных;
e) способ аппликации исследуемых образцов;
f) описание процедуры снятия показаний;
g) ведение наблюдений и их регистрации;
h) гистологическую оценку;
i) оценку результатов.

В.7 Исследование вагинального раздражающего действия

В.7.1 Общие положения

Исследование вагинального раздражающего действия проводят для материалов с контактом указанного вида, если данные по безопасности не могут быть получены другими средствами.

В.7.2 Принцип метода

Исследование проводят для определения потенциальной возможности материала оказывать вагинальный раздражающий эффект.

В.7.3 Исключение из исследования

Любой материал, вызывающий раздражение кожи или глаз, или материал, значение pH которого менее или равно 2 или более или равно 11,5, исследованиям не подвергают и признают потенциальным вагинальным раздражителем.

В.7.4 Исследуемый материал

Если исследуемый материалов является твердым или жидким, то подготовку пробы проводят в соответствии с приложением А.

В.7.5 Экспериментальные животные и их содержание

Используют здоровых молодых половозрелых самок кроликов-альбиносов одной линии массой не менее 2 кг. Если используют другие виды, их выбор должен быть обоснован.

Акклиматизацию и содержание животных осуществляют в соответствии с ISO 10993-2.

Для предварительной оценки исследуемого материала в опытную и контрольную группы берут по три особи.

При неудовлетворительных или сомнительных результатах, полученных при предварительной оценке, проводят дополнительные исследования.

Животных перед экспериментом и перед каждым воздействием обследуют для выявления выделений, возможных повреждений влагалища: наличие опухолей, вагинальных инфекций, раздражения и т. д. Обследование проводят также для определения фазы овуляционного цикла, чтобы отличить реакцию тканей на возможное действие исследуемого материала от физиологических изменений.

В.7.6 Процедура исследований

Короткий (6 см) мягкий катетер или канюлю с тупым концом присоединяют к шприцу объемом 1 мл и более и заполняют шприц с катетером таким образом, чтобы объем испытуемого раствора не превышал 1 мл. Для каждого животного используют индивидуальный шприц с катетером.

Фиксируют животное с помощью удерживающего приспособления, которое обеспечивает свободный доступ к влагалищу, или при помощи лаборанта, осторожно удерживающего животное и фиксирующего его за задние конечности таким образом, чтобы открыть промежность.

Катетер перед введением смачивают контрольным раствором или подходящей смазкой для облегчения ввода во влагалище.

Захватывают и поднимают хвост животного, открывая вход во влагалище. Мягко вводят катетер глубоко во влагалище и впрыскивают 1 мл исследуемой пробы из шприца, вынимают катетер.

Поскольку объем влагалища у животных неодинаков, исследуемый материал может частично выйти из влагалища во время или сразу после введения. Аккуратно удаляют остатки материала мягкой тканью.

Повторяют вышеописанную процедуру через 24 ч ежедневно в течение 5 сут.

В продолжительном эксперименте число введений, их продолжительность и интервалы между ними зависят от особенностей применения изделия в медицинской практике.

В.7.7 Обследование животных

Через 24 ч после первого введения и непосредственно перед следующей процедурой отмечают и регистрируют появление выделений, изменений внешнего вида входа во влагалище и промежности, эритемы, раздражения.

Животных, у которых обнаружены выраженные изменения или опухоли, не позволяющие повторить введение, подвергают эвтаназии, применяя гуманные методы, и исследуют ткани в соответствии с В.6.8.1.

В.7.8 Оценка результатов

В.7.8.1 Макроскопическое исследование

Через 24 ч после последнего введения исследуемого материала животных подвергают эвтаназии с применением гуманных методов. Отделяют влагалище, разрезают вдоль и осматривают, отмечая наличие раздражения, повреждений эпителиального слоя и некроза тканей.

Ткани влагалища помещают в соответствующий фиксатор для дальнейших гистологических исследований. Выделяют три кусочка из цервикальной, центральной и каудальной частей влагалища.

Сравнивают вагинальные ткани в опытных и контрольных группах.

Регистрируют и описывают макроскопические изменения ректальных тканей каждого животного, отмечая различия между животными опытной и контрольной групп.

Примечание — Эти наблюдения могут быть полезны в гистологических исследованиях.

В.7.8.2 Гистологические исследования

Раздражающее действие на вагинальные ткани проводят патоморфологи. Определяют состояние тканей в соответствии с системой оценки, представленной в таблице В.4.

Баллы, полученные при микроскопическом исследовании всех животных опытной группы, суммируют и делят на число наблюдений, чтобы определить средний балл в группе. Максимальное значение может достигать 16.

Те же вычисления повторяют для контрольной группы.

Общее число баллов большее девяти, полученное при микроскопическом исследовании у контрольных животных, свидетельствует о наличии травмы. Повторное исследование проводят, если другие исследования или контрольные животные дают такие же высокие баллы.

Разность средних баллов, полученных для опытных и контрольных групп, дает индекс раздражения (см. таблицу В.5).

При оценке результатов многократного воздействия таблицу В.4 модифицируют, чтобы учесть показатели реакции тканей, связанные с хроническим раздражением.

В.7.9 Протокол исследований

Протокол исследований должен содержать:

a) описание испытуемых образцов;

b) предполагаемый способ применения материала или изделия;

c) подробное описание подготовки образцов к исследованиям;

d) описание экспериментальных животных;

e) способ аппликации исследуемых образцов;

f) описание процедуры снятия показаний;

g) ведение наблюдений и их регистрации;

h) гистологическую оценку;

i) оценку результатов.

Приложение С
(справочное)

Дополнительная информация

С.1 Дополнительная информация по раздражающему действию

Исследование кожного раздражения мелких животных проводится для идентификации материалов, которые могут являться потенциальными раздражителями кожи и/или слизистой оболочки человека. Первичным раздражителем является материал, вызывающий воспалительные изменения кожи в результате прямого поражающего воздействия, охарактеризованного наличием воспаления, или, при сильном раздражителе, везикуляцией и/или некрозом.

Кролик является наиболее предпочтительным испытуемым животным, что подтверждается наличием обширной информации по кожному раздражению в этих животных в Регистре токсического действия химических веществ (RTECS). Из более чем 2000 записей в RTECS 85 % сообщают о результатах исследований на кроликах, 7,5 % — на человеке, 4 % — на мышах и 3 % — на морских свинках. В результате, кроликов используют для получения значительного большинства существующих данных в открытом доступе. Очистка от шерсти участка исследования не является необходимой, так как данные указывают на похожие ответы на выскобленных и невыскобленных участках.

Исследования кожного раздражения могут давать различные результаты вследствие вариации ряда различных факторов, связанных с исследованием, таких как реципиент, тестовая доза, размеры аппликации, степень окклюзии, длительность воздействия, наполнитель, время считывания и качество считывания данных. Таким образом, в исследования кожного раздражения на человеке важно включить хорошо известные материалы положительного и отрицательного контролей для сравнения результатов исследования с контрольными материалами, что позволяет соотнести результаты. В качестве раздражителя положительного контроля преимущественно выбирают додецилсульфат натрия (SDS) чистотой, более или равной 99 %, так как это наиболее широко используемый контрольный раздражитель в клинических испытаниях [2], [4], [31]. Он также легко и широко доступен и не имеет других негативных эффектов. Нонановая кислота, способ действия которой отличается от SDS, также может использоваться как положительный контроль [18], [19].

Воздействие SDS определяет группу человеческих добровольцев и служит отправной точкой. SDS классифицируется как кожный раздражитель согласно критериям ЕС (88/379/EEC Директива совета от 7 июня 1988 г.). Тем не менее, не ясно, находится ли SDS на пороговом уровне ответа, при котором химикаты должны рассматриваться как кожные раздражители, или близко к таковому. Таким образом, вместо использования материала в чистом виде, более пригодно взять в качестве отправной точки минимальный уровень SDS, признанный, по меньшей мере, одной региональной группой (ЕС) значительным острым кожным раздражителем, каковым является 20 %-ный (массовая концентрация) водный раствор [31].

Использование лабораторных животных для исследования кожного раздражения снижается по причине разработки моделей *in vitro* и более частого использования пациентов добровольцев [10], [14]. Для исчисления ответа на раздражитель используют биоинженерные или неинвазивные, объективные методы измерения, что снижает зависимость от более субъективной визуальной шкалы замера [12], [16], [17]. Тем не менее, десятилетия опыта были приобретены благодаря исследованию кожного раздражения Драйза (Draize) на кроликах-альбиносах. Данный метод приведен в [8]. Исследуемый материал применяют на неповрежденных участках выстриженной спины под кусочками марли. Аппликации наносят на трех кроликов. Кусочки марли прикрепляют пластырем, а все туловище животного оборачивают полуокклюзивной или окклюзивной повязкой на 4 ч. После 4 ч кусочки марли снимают, исследуемые участки очищают и спустя 1 ч, любую результативную реакцию оценивают на предмет наличия эритемы или отека. Реакцию также оценивают через 24, 48 и 72 ч.

Исследование раздражения глаза на кроликах было разработано для прогнозирования раздражения глаза у человека [27]. Для оценки степени глазного раздражения Draize [26] опубликовал иллюстрированное пособие по системе оценки степени раздражения.

Альтернативные методы *in vitro* для исследования эффекта глазного раздражения находятся в стадии разработки, но еще не обоснованы и не утверждены на международном уровне [21].

Обширные данные по кожному раздражению у человека представлены Исследовательским институтом душистых веществ (Research Institute for Fragrance Materials). Монографии по эфирным маслам и другим ароматическим соединениям опубликованы в Food and Cosmetic Toxicology («Пищевая и косметическая токсикология»). Проект Руководства OECD по исследованию острого кожного раздражения на пациентах-добровольцах предоставляет дополнительную справочную информацию. Группа химиков, участвующих в программе разработки Руководств OECD, пока не достигла согласия о необходимости создания Руководства OECD по местным кожным эффектам у пациентов-добровольцев.

С.2 Дополнительная информация по исследованиям сенсибилизации на выявление гиперчувствительности замедленного типа

Сенсибилизация у человека наступает после однократного или многократного накожного воздействия, инициируется и запускается компонентами иммунной системы. Особенно важно, чтобы гаптен (химикат) являлся су-

щественным по отношению к коже и обладал проникающей способностью. Затем он вступает в реакцию с белками кожи для формирования иммуногенных комплексов. Клетки Лангерганса на эпидермальной/дермальной границе вырабатывают антиген на специфические лимфоциты, которые затем активируются для инициации иммунных ответов. Небольшой процент этих лимфоцитов является клетками долгосрочной памяти, которые служат основными активаторами в провокационной фазе. Таким образом, последующие повторные воздействия могут привести к негативным реакциям, которые сопровождаются выбросом лимфокинов активированными лимфоцитами и другими воспалительными клетками, привлеченными в зону раны.

В 1895 Jadassohn, используя метод аппликаций, обнаружил у пациента клинически контактную аллергию на ртуть. Этот новаторский подход предоставил научную базу для последующих исследований, направленных на диагноз и прогноз контактной аллергии у человека и животных. Развитие перспективных/прогнозирующих исследований для оценки сенсибилизирующего потенциала химикатов последовало за новаторской работой Landsteiner и Chase [49], которые твердо обосновали использование морских свинок для изучения гиперчувствительности замедленного типа.

Magnusson и Kligman [50] опробовали множество вариантов исследований на морских свинках и предложили процедуру максимизации на морских свинках (GPMT), основанную на внутрикожных инъекциях (с полным адъювантом Фрейнда [FCA] или без него) и последующих местных аппликациях исследуемого материала на тот же участок. Предложенная методика требует предварительной обработки испытуемого участка, если исследуемый материал не является раздражителем. Как правило она достоверно обнаруживает слабые сенсибилизаторы, так как понятие «слабый» включает нулевую вероятность положительных реакций. Этот чувствительный метод широко используется. Применение полного адъюванта Фрейнда повышает чувствительность метода исследования и, в некоторых случаях, может переоценить сенсибилизирующий потенциал испытуемого соединения.

В 1965 Buehler [41] предложил использование закрытых аппликаций для обеспечения окклюзии как метод для оптимизации воздействия и приближения к условиям процедур, используемых на человеке (Human Repeat Insult Patch Test HRIPT). Высказывалось предположение, что методика окклюзивной аппликации является чувствительной и точно прогнозирует средние и сильные сенсибилизаторы, таким образом, предотвращая вероятность негативных реакций у человеческих моделей при повторной накожной пробе (Human Repeat Insult Patch Test: HRIPT). Представленные данные показали преимущества окклюзии по сравнению с внутрикожными инъекциями и местным применением открытого типа. Стимуляция иммунной системы адъювантами не использовалась. Данный метод признан достаточно чувствительной процедурой для определения самых слабых сенсибилизаторов и доказан как достаточно гибкий для использования в процедуре оценки риска. Тем не менее, исследование закрытой аппликацией (исследование Бюлера) менее чувствительно по сравнению с GPMT [46].

Эти два исследования, метод закрытой аппликации и максимизации наиболее часто использовались для оценки безопасности в Соединенных Штатах Америки и в Европе. Они также являются предпочтительными методами исследованиями в действующих Руководствах по исследованиям OECD и EC. Результаты сенсибилизирующих проб на морских свинках зависят от многих факторов, связанных с животными и с техническими аспектами, что объясняет различия в результатах исследований разных лабораторий, например, линия животных, их пол, возраст, окружающие условия исследования, исследуемый участок на животном, метод удаления шерсти (стрижка/бритье) или химическая депиляция, тип конфигурации аппликации, число исследуемого материала, качество окклюзии, время воздействия и считывание тканевого ответа. Были использованы и изучены многочисленные другие исследования, и у каждого из них есть свои сторонники. В настоящий момент существует несколько методик, признанных приемлемыми в нормативных целях, при условии, что методика отражена документально надлежащим образом и обоснована исследователем. Во всех случаях процедуры следует проводить в соответствии с первоисточником. Список других исследований приведен в таблице С.1.

Недавняя монография ECETOC приводит новейшую информацию по исследованию накожной сенсибилизации [44].

Таблица С.1— Альтернативные методы исследования сенсибилизации замедленного типа

1 Метод с использованием полного адъюванта Фрейнда
2 Метод с использованием разделенного адъюванта
3 Метод открытых эпикутанных аппликаций
4 Оптимальный метод Мауера
5 Тест на подушечках стопы морских свинок
6 Кумулятивный метод с увеличением степени контакта
7 Скарификационный метод (с адъювантом и аппликациями)
8 Метод исследования на ушах мыши
9 Местная проба на лимфоузле мыши

Последняя проба в таблице С.1, местная проба на лимфоузле мыши (LLNA), заслуживает особого внимания. Местная проба на лимфоузле мыши (LLNA) была принята Организацией Экономического Сотрудничества и Развития (OECD) как самостоятельная альтернатива проводящимся исследованиям на морских свинках и как метод улучшения обращения с животными [83].

Научной базой для исследования является измерение введенного 3Н-метил-тимидина в лимфоциты в дренируемых лимфоузлах мыши под местным воздействием испытуемого образца как показатель сенсибилизации. Это исследование не включает провокационную фазу. Конечной интересующей точкой является индекс стимуляции, означающий соотношение введенного тимидина в лимфоузлы животных, получивших дозу воздействия, с введенным в лимфоузлы контрольной группы. Исследование является положительным, когда индекс стимуляции превышает 3 (SI > 3). Внутри и межлабораторная оценки LLNA показали воспроизводимое соотношение доза — ответ внутри и между лабораториями [60], [76], [78], [72], [59], [65], [82]. Тем не менее, сообщалось о трудностях в различии между раздражающими и аллергенными веществами при использовании LLNA [72], [62], [79]. Таким образом, LLNA может производить ложно положительные результаты с раздражителями и может переоценить аллергенность веществ, имеющих и раздражающие, и аллергенные свойства [59]. Тем не менее, у LLNA есть преимущества по сравнению с пробами на морских свинках по причине более короткой продолжительности исследования, более объективной конечной точки, меньшего объема требуемого испытуемого вещества, а также это исследование не включает инъекции полного адъюванта Фрейнда. Возможны усовершенствования методики исследования путем использования анализа маркеров активации клеток и цитометрии потока [68], [69]. Не установлено, могут ли они быть внедрены на практике в стандартные протоколы LLNA для обычной токсикологии. С другой стороны, LLNA ограничивает выбор тестовых растворителей; в большинстве исследований использовалась смесь ацетона и оливкового масла. Недавнее исследование демонстрирует вариабельность результатов с использованием разных растворителей [77]. Кроме того, при использовании LLNA невозможно изучать провокационную фазу или конфигурации перекрестной реактивности, так как животные умерщвляются после индукции до забора лимфоузлов.

Проба подколенного лимфоузла (PLNA), использующая подкожное введение в подушечку стопы [63], [66], [81], является альтернативой пробе на лимфоузле. В данной пробе, кроме прямого измерения активации лимфоузла, возможно использование антигенов-репортеров для дальнейшего прояснения иммуномодуляции, вызванной исследуемым химикатом [58].

Процесс оценки риска не должен полагаться на единственную модель или подход; его проведение должно быть продуманно для предоставления максимальной гарантии безопасности потребителю. Как правило, это требует исследований на животных моделях и человеческих экспериментальных моделях. Требуется определенная гибкость при выборе моделей и методов при наличии соответствующей документации и/или обоснования выбора.

Отрицательный ответ, полученный на морских свинках, при надлежащем проведении, может быть определяющим, если исследуемая концентрация имеет достаточный фактор безопасности при условиях использования. Тем не менее, необходимо избегать классификации исследуемых материалов исключительно на основании вероятности и/или тяжести, без должного учета использования этого продукта в будущем.

Риск, т.е. вероятность и тяжесть аллергической реакции на продукт, определяется, в основном, следующими четырьмя факторами: сенсибилизирующий потенциал химического аллергена, его число в продукте, биодоступность и условия воздействия. Относительный сенсибилизирующий потенциал химических веществ может быть определен минимальной индукционной концентрацией, необходимой для стимуляции данного уровня сенсибилизации: чем меньше эта концентрация, тем выше потенциал аллергена [80], [40]. Было продемонстрировано, что значительное число случаев аллергического контактного дерматита обнаруживалась у потребителей, когда остаточный уровень аллергена в продукте превышал его минимальную индукционную концентрацию, полученную путем GPMT [51].

С другой стороны, прогнозирующее исследование смесей и продуктов гораздо менее обоснованно и может проводиться после исследования ингредиентов продукта. Соответственно, план исследования и интерпретация результатов могут быть неопределенными, несколько примеров подтверждают и отражают эту возможность. В исследованиях на животных с экстрактами ацетона из свитера, вызвавшего контактный дерматит у людей, были выявлены аллергены (хлорофенилгидразоны фосгена) [48]. В другом случае, исследования на животных с экстрактами ацетона/хлороформа из резиновых сапог, вызвавших контактный дерматит у человека, в результате были выявлены каузативные аллергены меркаптобензотиазол и дибензотиазилдисульфид [47]. Была ясно продемонстрирована необходимость использования надлежащего органического растворителя. Экстракты, подготовленные с органическим растворителем, вызвали гиперчувствительность на морских свинках, в то время как экстракты с солевым раствором не вызвали такой реакции.

Японское руководство основных биологических исследований медицинских материалов и изделий (1995) принимает процедуру приготовления пробы с органическим растворителем, с последующим выпариванием до получения осадка, а также процедуру оценки риска путем сравнения процента выхода осадка из материала с минимальным процентным раствором осадка (смесью) для индукции гиперчувствительности замедленного типа на животных.

In vitro методы для исследования кожной сенсибилизации на данный момент не доступны для стандартного использования [13].

Приложение ДА
(справочное)

Сведения о соответствии межгосударственных стандартов ссылочным международным стандартам

Таблица ДА.1

Обозначение и наименование международного стандарта	Обозначение и наименование международного стандарта другого года издания	Степень соответствия	Обозначение и наименование межгосударственного стандарта
ISO 10993-1:1997 Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 1. Оценка и исследования	ISO 10993-1:2003 Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 1. Оценка и исследования	IDT	ГОСТ ISO 10993-1—2011 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 1. Оценка и исследования (ISO 10993-1:2003, IDT)
ISO 10993-2:2006 Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 2. Требования к обращению с животными	—	—	*
ISO 10993-9:1999 Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 9. Основные принципы идентификации и количественного определения потенциальных продуктов деструкции	—	IDT	ГОСТ ISO 10993-9—2011 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 9. Основные принципы идентификации и количественного определения потенциальных продуктов деградации
ISO 10993-12:2002 Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 12. Приготовление проб и стандартные образцы	ISO 10993-12:2007 Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 12. Приготовление проб и стандартные образцы	IDT	ГОСТ ISO 10993-12—2011 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 12. Приготовление проб и стандартные образцы (ISO 10993-12:2007, IDT)
ISO 10993-13:1998 Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 13. Идентификация и количественное определение продуктов деструкции полимерных медицинских изделий	—	IDT	ГОСТ ISO 10993-13—2011 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 13. Идентификация и количественное определение продуктов деградации полимерных медицинских изделий

Окончание таблицы ДА.1

Обозначение и наименование международного стандарта	Обозначение и наименование международного стандарта другого года издания	Степень соответствия	Обозначение и наименование межгосударственного стандарта
ISO 10993-14:2001 Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 14. Идентификация и количественное определение продуктов деструкции изделий из керамики	—	IDT	ГОСТ ISO 10993-14—2011 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 14. Идентификация и количественное определение продуктов деградации изделий из керамики
ISO 10993-15:2000 Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 15. Идентификация и количественное определение продуктов деструкции изделий из металла и сплавов	—	IDT	ГОСТ ISO 10993-15—2011 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 15. Идентификация и количественное определение продуктов деградации изделий из металлов и сплавов
ISO 10993-18:2005 Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 18. Исследование химических свойств материалов	—	IDT	ГОСТ ISO 10993-18—2011 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 18. Идентификация и количественное определение продуктов деградации изделий из металлов и сплавов
ISO 14555-1:2003 Клинические исследования медицинских изделий. Часть 1. Общие требования	—	—	*
ISO 14555-2:2003 Клинические исследования медицинских изделий. Часть 2. Протокол клинических исследований	—	—	*

*Соответствующий межгосударственный стандарт отсутствует. До его утверждения рекомендуется использовать перевод на русский язык данного международного стандарта. Перевод данного международного стандарта находится в Федеральном информационном фонде технических регламентов и стандартов.

Примечание — В настоящей таблице использовано следующее условное обозначение степени соответствия стандартов:

-IDT — идентичные стандарты.

Библиография

Общие ссылки по исследованию раздражающего действия на кожу и глаза, а также сенсибилизирующего действия на кожу

[1] ISO 10993-6, Biological evaluation of medical devices — Part 6: Tests for local effects after implantation (Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 6. Исследование местного действия после имплантации)

[2] AGNER T. Noninvasive measuring methods for the investigation of irritant patch test reactions. A study of patients with hand eczema, atopic dermatitis and controls. Acta Derm. Venereol. Suppl. Stockh., 173, pp. 1-26, 1992

[3] World Medical Association. Declaration of Helsinki. Recommendation guiding physicians in biomedical research involving human subjects. Adopted by the 18th World Medical Assembly, Helsinki June 1964, amended by the 29th World Medical Assembly, Tokyo, October 1975, the 35th World Medical Assembly, Venice, October 1983 and 41st World Medical Assembly, Hong Kong, September 1989. Proc. XXVIth Conf., Geneva, 1993

[4] LEE C.H. and MAIBACH H.I. The sodium lauryl sulfate model: an overview. Contact Dermatitis, 33, pp. 1-7, 1995

[5] MARZULLI F.N. and MAIBACH H.I. (eds.) Dermatotoxicology, 5th edn., Hemisphere Publ. Corp., 1996

[6] Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) Guideline for the testing of chemicals. Acute dermal irritation study in human volunteers. Draft document, Nov. 1997

[7] Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) Guidelines for the testing of chemicals No. 406, Skin sensitization, OECD Publications, 1992

[8] Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) Guidelines for testing of chemicals No. 404, Acute skin irritation/corrosion, OECD Publications, 1992

[9] Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), Guidelines for testing of chemicals No. 405, Acute eye irritation/corrosion, OECD Publications, 1992

[10] PONEC M. In vitro models to predict skin irritation. In: The Irritant Contact Dermatitis Syndrome. Van der Valk P.G.M. and Maibach H.I. (eds). Boca Raton, CRC Press, pp. 335-341, 1996

[11] RUSSEL W.M.S. and BURCH R.L. The principles of humane experimental technique, 238 pp., London, Methuen, 1959

[12] SERUP J. and JEMEC G.B.E. Handbook of non-invasive methods and the skin. CRC Press, 1995

[13] SILVA O. de., BASKETTER D.A., BARRATT M.D. et al. Alternative methods for skin sensitization testing. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 19. ATLA, 24, pp. 683-705, 1996

[14] SIMION F.A. In vivo models to predict skin irritation. In: The Irritant Contact Dermatitis Syndrome. Van der Valk P.G.M. and Maibach H.I. (eds). Boca Raton, CRC Press, pp. 329-334, 1996

[15] SVENDSEN O., GARTHOFF B., SPIELMANN H. et al. Alternatives to the animal testing of medical devices. ALTA, 24, pp. 659-670, 1996

[16] WAHLBERG J.E. Assessment of skin irritancy: measurement of skin fold thickness. Contact Dermatitis, 9, pp. 21-26, 1983

[17] WAHLBERG J.E. and WAHLBERG E.N. Quantification of skin blood flow at patch test sites. Contact Dermatitis, 17, pp. 229-233, 1987

[18] WAHLBERG J.E. and MAILBACH H.I. Nonanoic acid irritation — A positive control at routine patch testing? Contact dermatitis, 6, pp. 128-130, 1980

[19] WAHLBERG J.E., WRANGSJO K. and HIETASOLA A. Skin irritancy from nonanoic acid. Contact dermatitis, 13, pp. 266-269, 1985

[20] WEIL S.C. and SCALA R.A. Study of intra- and interlaboratory variability in the results of rabbit eye and skin irritation tests. Toxicol. Appl. Pharmacol., 12, pp. 276-360, 1971

Библиография по исследованию раздражающего действия на кожу и глаза

[21] BALLS M., BERG N. and BRUNER L.H. et al. Eye irritation testing: the way forward. ATLA, 27, pp. 53-78, 1999

[22] BASKETTER D.A., WHITTLE E., GRIFFITHS H.A. et al. The identification and classification of skin irritation hazard by a human patch test. Food Chem. Toxicol., 32, pp. 769-775, 1994

[23] BOTHAM P.A., EARL L.K., FENTEM J.H. et al. Alternative methods for skin irritation testing: the current status. ALTA, 26, pp. 195-212, 1998

[24] BRUNER L.H., KAIN D.J., ROBERTS D.A. et al. Evaluation of seven in vitro alternatives for ocular testing. Fundam. Appl. Toxicol., 17, pp. 136-149, 1991

[25] DRAIZE J.H. Dermal Toxicity. Association of food and drug officials of the U.S, FDA, Washington, D.C. pp. 46-59, 1955

[26] DRAIZE J.H. Appraisal of the safety of chemicals in foods, drugs, and cosmetics, Austin, Texas. Association of food and drug officials of the United States, Texas State Department of Health, Texas, 1959

[27] European Chemical Industry Ecology and Toxicology Centre. Eye irritation testing, Monograph 11, Brussels, Belgium, 1988

[28] European Chemical Industry Ecology and Toxicology Centre. Skin irritation, Monograph 15, Brussels, Belgium, 1990

[29] GERNER L., GRAETSCHEL G., KAHL J. et al. Development of a decision support system for the introduction of alternative methods into local irritancy/corrosivity testing strategies. Development of a relational database. ALTA, 26, pp. 11-28, 2000
[30] STEINBERG M., AKERS W.A., WEEKS M. et al. A comparison of test techniques based on rabbit and human skin responses to irritants with recommendations, regarding the evaluation of mildly or moderately irritating compounds. Animal Models in Dermatology. Maibach H.I. (ed.), N.Y., Churchill Livingstone, pp. 1-11, 1975
[31] YORK M., GRIFFITHS H.A., WHITTLE E. et al. Evaluation of a human patch test for the identification and classification of skin irritation potential. Contact Dermatitis, 34, pp. 204-212, 1996

Библиография по исследованию раздражающего действия на слизистую оболочку полости рта

[32] NILSSON R., FALLAN J.O., LARSSON K.S. et al. Electrical impedance — A new parameter for oral mucosal irritation tests. J. Mater. Science: Materials in Medicine, 3, p. 278, 1992
[33] ROY M. and WHITE H.I. Establishment of an improved technique for hamster mucous membrane irritation testing. J. Dent. Res., 11, pp. 365-1375, 1986

Библиография по исследованию раздражающего действия на влагалище

[34] CHVAPIL M., CHVAPIL T.A., OWEN J.A. et al. Reaction of vaginal tissue of rabbits to inserted sponges made of various materials. J. Biomed. Mater. Res., 13, pp. 1-13, 1979
[35] ECKSTEIN P., JACKSON M.C., MILLMAN N. et al. Comparisons of vaginal tolerance tests of spermicidal preparations in rabbits and monkeys. J. Reprod. Fertil., 20, pp. 85-93, 1969
[36] KAMINSKY M. and WILLIGAN D.A. pH and the potential irritancy of douche formulations to the vaginal mucosa of the albino rabbit and rat. Food Chem. Toxicol., 20, pp. 193-196, 1982
[37] MULLER P., RAABE G., HOROLD J. et al. Action of chronic peracetic acid (wofasteril) administration on the rabbit oral mucosa, vaginal mucosa and skin. Exp. Pathol., 34, pp. 223-228, 1988

Библиография по исследованию сенсибилизирующего действия на кожу

[38] ANDERSEN K.E. and MAIBACH H.I. Contact allergy predictive tests in guinea pigs., Curr. Probl. Dermatol., 14, 1985
[39] ANDERSEN K.E. and MAIBACH H.I. Guinea pig sensitization assays. An overview. Curr. Probl. Dermatol., 14, pp. 263-290, 1985
[40] ANDERSEN K.E., VØLUND A. and FRANKILD S. The guinea pig maximization test with a multiple dose design. Acta Derm. Venereol., 75, pp. 463-469, 1995
[41] BUEHLER E.V. Delayed contact hypersensitivity in the guinea pig. Arch. Dermatol., 91, pp. 171-175, 1965
[42] BUEHLER E.V. A rationale for the selection of occlusion to induce and elicit delayed contact hypersensitivity in the guinea pig. A prospective test. Curr. Probl. Dermatol., 14, pp. 39-58, 1985
[43] European Chemical Industry Ecology and Toxicology Centre. Skin sensitization testing, Monograph 14, Brussels, Belgium, 1990
[44] European Chemical Industry Ecology and Toxicology Centre. Skin sensitization testing for the purpose of hazard identification and risk assessment. Monograph 29, Brussels, Belgium, 2000
[45] FRANKILD S., BASKETTER D.A. and ANDERSEN K.E. The value and limitations of rechallenge in the guinea pig maximization test. Contact Dermatitis, 35, pp. 135-140, 1996
[46] FRANKILD S., VØLUND A., WAHLBERG J.E. et al. Comparison of the sensitivities of the Buehler test and the guinea pig maximization test for predictive testing of contact allergy. Acta Derm. Venereol., 80, pp. 256-262, 2000
[47] KANIWA M.A., MOMMA J., IKARASHI Y. et al. A method for identifying causative chemicals of allergic contact dermatitis using a combination of chemical analysis and patch testing in patients and animal groups: application to a case of rubber boot dermatitis. Contact Dermatitis, 27, pp. 166-173, 1992
[48] KOJIMA S., MOMMA J. and KANIWA M.A. Phosgene (chlorophenyl) hydrazones, strong sensitizers found in yellow sweaters bleached with sodium hypochlorite, defined as causative allergens for contact dermatitis by an experimental screening method in animals published erratum appears in Contact Dermatitis, 23, p. 383. Contact Dermatitis, 23, pp. 129-141, 1990
[49] LANDSTEINER K. and CHASE M.W. Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. J. Exp. Med., 69, p. 767, 1939
[50] MAGNUSSON B. and KLIGMAN A.M. The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test. J. Invest. Dermatol., 52, pp. 268-276, 1969
[51] NAKAMURA A., MOMMA J., SEKIGNCHI H. et al. A new protocol and criteria for quantitative determination of sensitization potencies of chemicals by guinea pig maximization test. Contact Dermatitis, 31, pp. 72-85, 1994
[52] NEWMANN E.A., BUEHLER E.V. and PARKER R.D. Delayed contact hypersensitivity in the vagina and skin of the guinea pig. Fundam. Appl. Toxicol., 3, pp. 521-527, 1983
[53] POLIKANDRITOU M. Enhancement of the sensitivity of the Buehler method by use of the Hill Top chamber. Soc. Cosmetic Chem., 36, pp. 151-168, 1996

[54] RITZ H.L. and BUEHLER E.V. Planning, conduct and interpretation of guinea pig sensitization patch tests. In DRILL V. and LAZAR P. (eds.) Current concepts in cutaneous toxicity, Academic Press, New York pp. 25-40, 1979
[55] ROBERTS D.W. Structure-activity relationships for skin sensitization potential of diacrylates and dimethacrylates. Contact Dermatitis, 17, pp. 281-289, 1987
[56] ROBINSON M.K., STOTTS J., DANNEMAN P.J. et al. A risk assessment process for allergic contact sensitization. Food. Chem. Toxicol., 27, pp. 479-489, 1989
[57] ROBINSON M.K., NUSAIR T.L., FLETCHER E.R. et al. A review of the Buehler guinea pig skin sensitization test and its use in a risk assessment process for human skin sensitization. Toxicology, 61, pp. 91-107, 1990

Библиография по местной пробе на лимфоузле мыши

[58] ALBERS R., BROEDERS A., VAN DER PIJL A. et al. The use of reporter antigens in the popliteal lymph node assay to assess immonomodulation by chemicals. Toxicol. Appl. Pharmacol., 143, pp. 102-109, 1997
[59] BASKETTER D.A., LEA L.J., COOPER K. et al. Threshold for classification as a skin sensitizer in the local lymph node assay: a statistical evaluation. Food. Chem. Toxicol., 37, pp. 1167-1174, 1999
[60] BASKETTER D.A., ROBERTS D.W., CRONIN M. et al. The value of the local lymph node assay in quantitative structure-activity investigations. Contact Dermatitis, 27, pp. 137-142, 1992
[61] BASKETTER D.A. and SCHOLES E.W. Comparison of the local lymph node assay with the guinea pig maximization test for the detection of a range of contact allergens. Food. Chem. Toxicol., 30, pp. 65-69, 1992
[62] BASKETTER D.A., SCHOLES E.W. and KIMBER I. The performance of the local lymph node assay with chemicals identified as contact allergens in the human maximization test. Food. Chem. Toxicol., 32, pp. 543-547, 1994
[63] DE BAKKER J.M., KAMMÜLLER M.E., MULLER E.S.M. et al. Kinetics and morphology of chemically induced popliteal lymph node reactions compared with antigen-mitogen-, and graft-versus-host-reaction-inducedresponses. Virchows Archiv. B Cell Pathol., 58, pp. 279-287, 1990
[64] DEAN J., TWERDOK L.E., ANDERSEN K.E. et al. The murine local lymph node assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds. NIH publication No. 99-494, Research Triangle Park, 1999, available at http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/llnadocs/llnarep.pdf
[65] DEARMAN R.J., BASKETTER D.A. and KIMBER I. Local lymph node assay: use in hazard and risk assessment. J. Appl. toxicol., 19, pp. 299-306, 1999
[66] DESCOTES J., PATRIARCA C., VIAL T. et al. The popliteal lymph node assay in 1996. Toxicol., 119, pp. 45-49, 1997
[67] EDWARDS D.A., SORANOO T.M., AMORUSO M.A. et al. Screening petrochemicals for contact hypersensitivity potential: a comparison of the murine local lymph node assay with guinea pig and human test data. Fundam. Appl. Toxicol., 23, pp. 179-187, 1994
[68] GERBERICK G.F., GRUSE L.W. and RYAN C.A. Local lymph node assay: differentiating allergic and irritant responses using flow cytometry. Methods, 19, pp. 48-55, 1999(a)
[69] GERBERICK G.F., GRUSE L.W., MILLER C.M. et al. Selective modulation of B-cell activation markers CD86 and I-AK on murine draining lymph node cells following allergen or irritant treatment. Toxicol. Appl. Pharmacol, 159, pp. 142-151, 1999(b)
[70] IKARASHI Y., OHNO K., MOMMA J. et al. Assessment of contact sensitivity of two thiourea rubber accelerators: comparison of two mouse lymph node assays with the guinea pig maximization test. Food Chem. Toxicol., 32, pp. 1067-1072, 1994
[71] IKARASHI Y., TSUCHIYA T. and NAKAMURA A. Detection of contact sensitivity of metal salts using the murine local lymph node assay. Toxicol.Lett., 62, pp. 53-61, 1992
[72] IKARASHI Y., TSUCHIYA T. and NAKAMURA A. A sensitive mouse lymph node assay with two application phases for detection of contact allergens. Arch. Toxicol., 67, pp. 629-636, 1993
[73] IKARASHI Y., TSUCHIYA T. and NAKAMURA A. Application of sensitive mouse lymph node assay for detection of contact sensitization capacity of dyes. J. Appl. Toxicol., 16, pp. 349-354, 1996
[74] IKARASHI Y., TSUKAMOTO Y., TSUCHIYA T. et al. Influence of irritants on lymph node cell proliferation and the detection of contact sensitivity to metal salts in the murine local lymph node assay. Contact Dermatitis, 29, pp. 128-132, 1993
[75] KIMBER I. and BASKETTER D.A. The murine local lymph node assay: a commentary on collaborative studies and new directions. Food Chem. Toxicol., 30, pp. 165-169, 1992
[76] KIMBER I., HILTON J., DEARMAN R.J. et al. An international evaluation of the murine local lymph node assay and comparison of modified procedures. Toxicol., 103, pp. 63-73, 1995
[77] LEA L.J., WARBRICK E.V., DEARMAN R.J. et al. The impact of vehicle on assessment of relative skin sensitization potency or 1,4-dihydroquinone in the local lymph node assay. Am. J. Contact Dermatitis, 10, pp. 213-218. 1999
[78] LOVELESS S.E., LADICS G.S., GERBERICK G.F. et al. Further evaluation of the local lymph node assay in the final phase of an international collaborative trial. Toxicol., 108, pp. 141-52, 1996
[79] MONTELIUS J., WAHLKVIST H., BOMAN A. et al. Experience with the murine local lymph node assay: inability to discriminate between allergens and irritants. Acta Derm. Venereol., 74, pp. 22-27, 1994
[80] ROBERTS D.W. Structure-activity relationships of skin sensitization potential of diacrylates and dimethacrylates. Contact Dermatitis, 17, pp. 281-289, 1987

[81] VIAL T., CARLEER J., LEGRAIN B. et al. The popliteal lymph node assay: results of a preliminary interlaboratory validation study. Toxicol., 122, pp. 213-218, 1997
[82] WARBRICK E.V., DEARMAN R.J., LEA L.J. et al. Local lymph node assay responses to paraphenylenediamine: intra- and inter-laboratory evaluations. J. Appl. Toxicol., 19, pp. 225-260, 1999
[83] Organization for Economic Cooperation and Development, Guideline for the testing of chemicals No. 429, Skin sensitisation: Local lymph node assay, OECD Publications, 2002

УДК 615.46:002:006.354 МКС 11.100.20 Р20 IDT

Ключевые слова: медицинские изделия, лабораторные животные, испытания на животных, раздражение, гиперчувствительность, аллергические реакции

Редактор *И.З. Фатеева*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *М.И. Першина*
Компьютерная верстка *Е.О. Асташина*

Сдано в набор 10.06.2014. Подписано в печать 24.06.2014. Формат 60×84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 5,12. Уч.-изд. л. 4,40. Тираж 59 экз. Зак. 2344.

Издано и отпечатано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» 123995 Москва, Гранатный пер., 4
www.gostinfo.ru gost.e-ecolog.ru

Поправка к ГОСТ ISO 10993-10—2011 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 10. Исследования раздражающего и сенсибилизирующего действия

В каком месте	Напечатано	Должно быть		
Предисловие. Таблица согласования	—	Армения	AM	Минэкономразвития Республики Армения

(ИУС № 6 2019 г.)

gost.e-ecolog.ru