Министерство здравоохранения Республики Беларусь

Инструкция 1.1.10-12-41-2006

ГИГИЕНИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ, МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ И МАТЕРИАЛОВ, ПРИМЕНЯЕМЫХ ДЛЯ ИХ ИЗГОТОВЛЕНИЯ

Минск – 2006

gost.e-ecolog.ru

УТВЕРЖДЕНО
Постановление
Главного государственного
санитарного врача
Республики Беларусь
22 ноября 2006 № 155

Инструкция 1.1.10-12-41-2006

«ГИГИЕНИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ, МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ И МАТЕРИАЛОВ, ПРИМЕНЯЕМЫХ ДЛЯ ИХ ИЗГОТОВЛЕНИЯ»

ГЛАВА 1
ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ И ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

1. Настоящая Инструкция предназначена для гигиенической оценки безопасности изделий медицинского назначения и медицинской техники, а также материалов, применяемых для их изготовления (далее – изделия и материалы медицинского назначения), и является основополагающим документом для аккредитованных лабораторий научно-исследовательских организаций системы здравоохранения, органов и учреждений государственного санитарного надзора.

2. Настоящая Инструкция устанавливает объем биологических, санитарно-химических и других видов исследований изделий и материалов медицинского назначения, а также принципы гигиенической оценки и методы исследований.

3. Требования настоящей Инструкции распространяются на все виды изделий и материалов медицинского назначения, за исключением изделий и материалов, которые не имеют контакта с телом пациента ни непосредственно, ни опосредованно. Инструкция не устанавливает требования, направленные на предотвращение опасности для пациента,

которая может возникнуть в результате каких – либо неисправностей изделий медицинского назначения (механических, электрических и др.)

4. Настоящая Инструкция направлена на определение воздействия изделий и материалов медицинского назначения на различные ткани организма человека при применении их по назначению в целях обеспечения безопасности использования.

5. Обязательным условием проведения токсикологических исследований является обеспечение хороших условий содержания подопытных животных, сведение до минимума количества используемых подопытных животных и вредного воздействия на них.

6. Изучение биологического действия изделия или материала опирается на методы с использованием животных, однако, необходимо учитывать, что один и тот же материал медицинского назначения может оказывать неодинаковое воздействие на ткани человека и животного. Кроме того, наличие у людей индивидуальных реакций позволяет предполагать возможное возникновение нежелательного эффекта при применении уже изученных материалов медицинского назначения, имеющих стабильные характеристики. Поэтому по мере развития науки и понимания основных механизмов воздействия изделий и материалов предпочтение будут отдавать методам in vitro в тех случаях, когда они обеспечат равноценную информацию.

7. На этапе планирования эксперимента эксперту необходимо руководствоваться принципами целесообразности, объективности и приемлемости в выборе методик исследований, учитывать информацию об исследуемом изделии и материале медицинского назначения или аналогичном ему, полученную из литературы, лабораторного и клинического опыта, так как применение чрезмерно жестких методов и критериев гигиенической оценки может приводить либо к излишним ограничениям в отношении применения изделий или материалов, либо к ложному представлению об опасности их использования.

8. Исследования изделий и материалов медицинского назначения проводят аккредитованные лаборатории по утвержденным в установленном порядке инструкциям и методикам.

ГЛАВА 2
ТЕРМИНЫ И ИХ ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Изделие медицинского назначения - изделие, предназначенное для диагностики, лечения, профилактики заболеваний организма человека, медицинской реабилитации больных и (или) обеспечения перечисленных процессов и не относящееся к изделиям медицинской техники, лекарственным, иммунологическим или метаболическим средствам, но

может быть дополнено во время своей работы указанными средствами. К изделиям медицинского назначения относятся также изделия стоматологического назначения.

Изделие медицинской техники - медицинский прибор, аппарат, оборудование, применяемый отдельно, в комплексах или системах для диагностики, лечения, профилактики заболеваний организма человека, медицинской реабилитации больных, научных исследований медицинского характера и (или) обеспечения этих процессов.

Материал - любой полимерный, керамический, текстильный материал, а также металл и сплав металлов, стекло, материал из биологической ткани, резина, латекс, бумага, клей и др., который применяют для изготовления изделий медицинского назначения и медицинской техники.

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

Исследования на стерильность - проверка отсутствия жизнеспособных микроорганизмов, а также их спор, в стерилизованных медицинских изделиях.

Токсикологические исследования - исследования, проводимые с целью выявления вредного, токсического действия материалов и изделий на организм, обусловленного химическим фактором.

Исследования на гемосовместимость - выявление отрицательных биологических эффектов при контакте изделия с кровью.

Исследования на пирогенность - проверка отсутствия в изделиях продуктов метаболизма микроорганизмов и других веществ, вызывающих у человека повышение температуры тела.

Общетоксическое действие - токсическое действие на организм в целом.

Острая токсичность - неблагоприятный эффект, возникающий после введения однократной или многократных доз исследуемой пробы в течение менее 24 ч.

Подострая токсичность - неблагоприятный эффект, возникающий после ежедневного введения однократной или многократных доз исследуемой пробы в течение 2 - 28 дней.

Субхроническая токсичность - неблагоприятный эффект, возникающий после однократного или многократного контакта с изделием, материалами и (или) вытяжками из них или воздействия в течение не менее 24 ч, но не более 10% жизненного цикла подопытного животного (например до 90 суток у крыс).

Хроническая токсичность - неблагоприятный эффект, возникающий после однократного или многократного действия изделий, материалов и (или) вытяжек из них в течение периода времени, составляющего не менее 10% продолжительности жизни лабораторного животного (например более 90 суток у крыс).

Тест на генотоксичность - тест, в котором используют клетки млекопитающих и других животных, а также бактерии, дрожжи или грибки для определения генных мутаций, изменений хромосомной структуры или других повреждений ДНК, вызванных изучаемыми материалами, изделиями или экстрактами из материалов.

Изучение канцерогенности (тест на канцерогенность) – тест, служащий для определения потенциальной онкогенной опасности изделий, материалов и экстрактов из них при одно- или многократном воздействии на экспериментальных животных. Подобные тесты могут быть рассчитаны на изучение как хронической токсичности, так и онкогенной опасности в рамках одного эксперимента.

Раздражение – локализованная воспалительная реакция на однократное, повторное или продолжительное воздействие исследуемого вещества без вовлечения иммунного механизма.

Отек – увеличение объема ткани вследствие патологической инфильтрации жидкости.

Эритема – покраснение кожи и слизистых оболочек.

Сенсибилизация, аллергенное действие и гиперчувствительность замедленного типа – аллергическая реакция с вовлечением иммунной системы, которая активизируется в результате предварительной кожной сенсибилизации.

Модельная среда - жидкость, которую используют для экстракции мигрирующих веществ из изделия или материала.

Вытяжка – модельная среда после экстракции в ней изделия или материала медицинского назначения.

Образец – материал, изделие или его часть, подвергаемая исследованию.

Конечный продукт – медицинское изделие в том состоянии, в котором его применяют в медицинской практике.

Исследуемая проба - изделие или вытяжка из него, подвергшаяся изучению по параметрам гигиенической безопасности.

Холостой контроль - модельная среда, не содержащая образец, используемая в исследовании для сравнения с вытяжкой.

Отрицательный контроль - материал или вещество, которое, будучи подвергнуто исследованию по описанной методике, показывает пригодность этой методики для получения воспроизводимого, соответствующего отрицательного, нереактивного или фонового ответа в

тест-системе.

Цель отрицательного контроля – продемонстрировать фоновый ответ. Например, полиэтилен высокой плотности используют в качестве отрицательного контроля для синтетических полимеров, а стержни из окиси алюминия и керамики – для стоматологических материалов.

Положительный контроль - материал или вещество, которое, будучи подвергнуто исследованию по описанной методике, показывает пригодность этой методики для получения воспроизводимого, соответствующего положительного или реактивного ответа в тест-системе.

Цель положительного контроля – продемонстрировать соответствующую реакцию тест-системы. Например, стабилизированный оловосодержащий поливинилхлорид используют в качестве положительного контроля для образцов изделий и материалов, разведения фенола – в качестве положительного контроля для вытяжек.

Стандартный образец – материал или вещество, которое имеет одну или более достаточно гомогенных нормированных характеристик и предназначено для калибровки аппаратуры, оценки метода измерения или определения количественных характеристик материала.

Растворитель – вещество (химикат, наполнитель, среда), используемое для смачивания, разбавления, суспензирования, экстрагирования или растворения испытуемого материала.

Сплав – материал, состоящий из металлического элемента с одной или более добавками других металлических и (или) неметаллических элементов.

Продукт деструкции – продукт, который получается при электрохимическом распаде или разложении материала.

Продукт вымывания – экстрагируемое вещество, такое как добавка, мономер или олигомер, входящие в состав полимерного материала.

Биодеградация – разрушение материала в результате воздействия биологической среды.

Коррозия – действие химических и электрохимических реакций на металлы и сплавы.

ГЛАВА 3
ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ВЫТЯЖЕК

9. Требования к подготовке пробы:

исследование проводят на готовых к употреблению изделиях и материалах медицинского назначения или репрезентативных образцах компонентов готового к употреблению изделия медицинского назначения;

форма для приготовления вытяжек не должна взаимодействовать или отрицательно влиять на материал образца;

компонент или изделие медицинского назначения, используемое в качестве образца, подвергают воздействию тех же условий и веществ, которым они подвергаются в процессе производства (отмывка, упаковка, стерилизация и т.п.);

изделия медицинского назначения, применяемые стерильными, исследуют после стерилизации с указанием способа стерилизации;

материалы, предназначенные для прямого контакта с поверхностью тела человека (например, жидкость, паста или гель), исследуют в нативном виде в экспериментах с кожной аппликацией или пероральным введением;

порошки (например, продукты, относящиеся к классу абсорбентов) исследуют прямым нанесением или предварительно готовят из них пасты с использованием подходящего растворителя или жидкого дисперсанта;

жидкости исследуют в нативной форме либо после их разведения;

жидкие материалы, такие как спрей или чернила, предназначенные к применению в высушенной форме, наносят тонким слоем на стекло, высушивают, затем подвергают экстракции.

10. Методы получения вытяжек из изделий и материалов медицинского назначения, приведенные в настоящем пункте, являются общими для всех изделий и материалов медицинского назначения. В случае необходимости для конкретного изделия допускается выбрать иные условия экстракции. Эти условия должны быть более жесткими, чем те, в которых изделие медицинского назначения применяется в медицинской практике, для определения потенциального риска токсического действия, и не вызывать значительных изменений материала, которые обычно не происходят в реальной практике, например затвердение или плавление. Если воздействие в условиях клинического применения и условия производства изделия четко определены, выбирают условия проведения экстракции, имитирующие время и температуру воздействия при применении изделия.

Экстракцию проводят в чистых, химически инертных, герметичных, безопасных емкостях, имеющих минимальное свободное пространство. Экстракцию следует проводить в условиях, исключающих контаминацию.

Образец готовят, разделив его на части; допускается исследование целого образца.

Если материалы невозможно разделить, не нарушая их природы, идентичности или целостности, и вычисленный объем модельной среды не покрывает образец (например, сложные изделия, металлические предметы, внутренние поверхности мешков и т.д.), используют минимальное количество модельной среды, которое покроет исследуемые поверхности. Для образцов небольшого размера проводят экстракцию нескольких штук одновременно, чтобы объема вытяжки было достаточно для исследования. В

зависимости от вида образца выбирают соотношение массы (с точностью до 0,1 г), либо площади поверхности образца (с точностью до 1 $см^2$) к объему модельной среды.

Соотношение площади поверхности и (или) массы образца к объему модельной среды при экстрагировании приведено в приложении 1.

Допускается использовать и другие соотношения (масса/объем и площадь поверхности/объем) по сравнению с приведенными в приложении 1, например, при оценке порошков, вспененных материалов, пористых поверхностей и т. п., которые имитируют условия клинического использования и приводят к адекватной оценке потенциального риска.

Эластомеры, материалы с покрытием или обработанной поверхностью, композиты, ламинаты и т. п. необходимо исследовать в неповрежденном виде. Другие материалы следует разрезать на небольшие части, чтобы обеспечить полное погружение в экстрагирующую жидкость.

Образцы должны быть таких размеров, чтобы было удобно поместить их в сосуды для экстракции; вся поверхность образца должна быть полностью покрыта модельной средой.

11. Модельные среды для экстракции изделий и материалов медицинского назначения подразделяются на полярные и неполярные.

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

В качестве основной модельной среды используют дистиллированную воду. В случае необходимости допустимо использовать репрезентативные модельные среды, способные экстрагировать широкий спектр веществ, приведенные в настоящем пункте.

К полярной модельной среде относят физиологический раствор.

К неполярной модельной среде относят нейтральные масла (например, фракционированное кокосовое масло) или растительное масло (например, кунжутное или хлопковое масло). При этом растительные масла должны быть свежерафинированными.

К дополнительным модельным средам относят спирт-воду, спирт-физиологический раствор, полиэтиленгликоль 400, глицерин, диметилсульфоксид, минимальные среды с содержанием сыворотки теленка 5-10 %, разведенный поверхностно-активный агент, очищенную воду, воду для инъекций и диспергирующие агенты.

Особое внимание следует обратить на биосовместимость модельной среды.

12. Условия экстракции, приведенные в настоящем пункте, допускается использовать для всех видов изделий и материалов медицинского назначения, за исключением изделий и материалов, описанных в пунктах 13 - 19.

Используют калиброванные соответствующим образом автоклав, термостат, водяную баню или инкубатор. Для большинства изделий подходит экстракция при (37±2) °С не более 72 ч. Допускается использовать более короткий период времени при более высокой температуре.

Условия экстракции:

(37 ± 2) °С в течение (72 ± 2) ч;

(50 ± 2) °С в течение (72 ± 2) ч;

(70 ± 2) °С в течение (24 ± 2) ч;

После изъятия сосудов из термостатирующих установок их охлаждают до комнатной температуры. Во время охлаждения сосуд энергично встряхивают в течение 30 секунд и выливают вытяжку в сухой стерильный контейнер.

Для отдельных изделий, имеющих длительный контакт с внутренней средой организма, допускается проводить экстракцию 10 суток (например, шовный материал, имплантаты). В отдельных случаях, если материал подвержен деструкции, сроки экстракции должны соответствовать пику максимальной миграции продуктов деструкции (обычно 20, 30 суток).

13. Приготовление вытяжек из шприцев проводят следующим образом:

шприцы извлекают из упаковки, через иглу заполняют дистиллированной водой до номинального объема, игла закрывается колпачком. Заполненные образцы помещают в горизонтальном положении в стеклянную емкость и термостатируют при температуре 37±2° С в течение 1 часа. В качестве контрольного раствора используется дистиллированная вода, помещенная в колбу со шлифом, которую термостатируют при тех же условиях. По истечении указанного срока шприцы и контрольный раствор извлекают из термостата и охлаждают до комнатной температуры;

в шприцах, заполненных жидким содержимым, допускается исследовать заполняющую жидкость (например, инсулиновые шприцы), исключая при этом изучение интегральных показателей (определение изменения pH вытяжки, восстановительных примесей, перманганатной окисляемости). Для исследования на пирогенность вытяжку готовят на 0,9% растворе хлорида натрия, для исследования гемолитических свойств вытяжку готовят на дистиллированной воде.

14. Приготовление вытяжек из игл:

иглы помещают в дистиллированную воду, соблюдая соотношение 5 $см^3$ на одну иглу и термостатируют при температуре 37±2°С. Время экспозиции для инъекционных игл однократного применения составляет 1 час. Время экспозиции для игл, имеющих контакт с внутренней средой организма по длительности более, чем одномоментный (например, хирургические, спинальные иглы), составляет 24 часа.

15. Приготовление вытяжек из средств накожного применения проводится согласно Методическим рекомендациям «Экспериментальная оценка средств и изделий накожного применения» № 117-9711, утвержденным Главным государственным санитарным врачом Республики Беларусь 10 февраля 1998 г (далее – МР № 117-9711).

16. Приготовление вытяжек из материала стоматологического пломбировочного проводят согласно требованиям настоящего пункта.

Приготовление пломб.

Для приготовления пломб используется набор приспособлений и инструментов: мерная посуда, фарфоровые ступки, шпатель для замешивания пломбировочного теста.

Замешивание пломбировочной массы производится согласно прилагаемой к материалу инструкции производителя.

Готовая пломбировочная масса загружается в емкость. Избыток теста удаляется шпателем, после чего емкость помещается в термостат (температура 40±1,0°С) на 10 мин. По истечении указанного срока приспособление выгружается из термостата, с помощью стального стержня пломба выдавливается в стакан и используется для приготовления вытяжек.

Приготовление светоотверждаемых пломб проводится согласно прилагаемой инструкции специалистами в стоматологическом кабинете в присутствии эксперта.

Приготовление вытяжек.

В качестве модельной среды используется предварительно подогретая до 40°С дистиллированная вода. Соотношение между весом пломбировочного материала (мг) и объемом дистиллированной воды ($см^3$) принимается 100:1.

Одновременно с вытяжкой из пломбировочных материалов ставится холостой контроль - дистиллированная вода из той же порции, что и для вытяжки, в такой же посуде, и при тех же условиях.

Вынутые из приспособления пломбы помещаются в тщательно пришлифованный стеклянный сосуд, заполненный предварительно подогретой до 40°С дистиллированной водой. Вода должна доходить до пробки, чтобы не осталось свободного воздушного пространства.

Приготовленные вытяжки разливаются на два сосуда. Один из них используется для санитарно-химических исследований. Для этого

вытяжку термостатируют при температуре 40° С в течение 1, 3, 7, 10 суток в динамическом режиме. На каждом сроке вытяжка сливается, те же образцы пломб заливаются новой порцией модельной среды. Для санитарно-химических исследований используется последняя 10-суточная вытяжка.

Другой сосуд с вытяжкой используется для токсикологических исследований. Для этого вытяжку термостатируют при температуре 40°С в течение 7 суток.

17. Приготовление вытяжек из изделий медицинского назначения, контактирующих с прямым кровотоком:

вытяжки готовятся в дистиллированной воде при температуре 37°С. Соотношение между весом испытуемого материала и объемом модельной среды рассчитывается по формуле:

$P = \frac{M}{V} \times K$, где

Р - соотношение между весом испытуемого материала и объемом модельной среды, в г/л,

М – максимальный расход материала на одного пациента, в граммах,

V – объем крови в организме человека (5 л),

К – коэффициент аггравации, равный 10.

Экспозиция вытяжек 3, 10 суток.

Данная формула может применяться для расчета соотношения между весом испытуемого материала и объемом модельной среды при приготовлении вытяжек из материалов для внутриматочной спирали (далее - ВМС) и готовой ВМС, из сосудистых катетеров, материалов для эмболизации крупных сосудов и т.п. изделий.

18. Условия приготовления вытяжек из шовного материала:

модельной средой является дистиллированная вода;

соотношение длины нити к объему модельной среды 0,4см:1см^3;

температурный режим экстракции: + 37°С;

экспозиция вытяжек 3, 10 суток.

19. Расчет количества имплантируемого материала при постановке имплантационного теста проводится по формуле:

$m = \frac{0,3}{70} M$, где

m – масса имплантируемого материала при постановке теста, г,

М – максимальный расход материала на одного пациента, г,

0,3 – масса лабораторного животного, кг,

70 – средняя масса тела человека, кг.

При необходимости введения коэффициента аггравации учитывают природу токсического эффекта, качество доступной токсикологической

информации. Как правило, величина коэффициента равна 10, однако может варьировать в широких пределах.

ГЛАВА 4
ОБЪЕМ И СХЕМА ИССЛЕДОВАНИЙ

20. Исследованиям для оценки безопасности применения по гигиеническим критериям подлежат следующие изделия медицинского назначения, медицинской техники и материалы, применяемые для их изготовления:

материалы отечественного и зарубежного производства, предполагаемые к применению в изделиях медицинского назначения (на этапе, предшествующем разработке изделия);

вновь разработанные изделия медицинского назначения отечественного и зарубежного производства, не проходившие ранее лабораторных исследований, в том числе изготовленные из материалов, применяемых ранее в аналогичных или других изделиях;

серийно выпускаемые изделия медицинского назначения, в случае изменения их композиционного состава или технологии изготовления;

серийно выпускаемые изделия медицинского назначения, в случае изменения любой характеристики материалов, идущих на производство изделия;

серийно выпускаемые изделия медицинского назначения, в случае изменения способа и режима стерилизации;

изделия медицинского назначения, вошедшие в номенклатуру продукции, подлежащей обязательной государственной гигиенической регистрации или сертификации;

в случае изменения свойств конечного продукта при хранении;

при наличии признаков неблагоприятного воздействия на человека в процессе применения.

Требования к документации и образцам, представляемым на исследования приведены в приложении 2 настоящей Инструкции. В случае необходимости проведения отбора образцов для исследований отбор проводится согласно требованиям, изложенным в приложении 3 настоящей Инструкции.

Первичная оценка биологического действия изделия медицинского назначения может включать в себя как изучение данных предшествующего опыта, так и экспериментальные исследования. Подобная оценка может позволить сделать следующий вывод: нет необходимости проводить экспериментальные исследования тогда, когда выбранный материал уже используют в качестве, аналогичном тому, в котором предполагают его использовать в создаваемом изделии. Схема

системного подхода к оценке биологического действия изделий медицинского назначения приведена в приложении 4 настоящей Инструкции.

Оценка должна учитывать предполагаемое и возможное неожиданное взаимодействие между материалом и тканями организма человека.

Материалы, предназначенные для изготовления изделия медицинского назначения, должны соответствовать назначению изделия по их химическим, физическим, электрическим, механическим, токсикологическим, морфологическим и другим свойствам.

При оценке соответствия материала назначению изделия рассматривают следующее:

источник поступления - изготовитель материала;

свойства и характеристики конечного продукта;

добавки, примеси и остаточные вещества в результате обработки;

продукты вымывания и деструкции;

прочие компоненты и их взаимодействие в конечном продукте.

21. Исследования изделий и материалов медицинского назначения проводиться в следующей последовательности:

органолептические исследования;

исследования на стерильность для стерильных изделий;

исследование показателей микробиологической чистоты;

санитарно-химические исследования, включающие изучение интегральных показателей, идентификацию и количественное определение экстрагируемых химических компонентов;

исследования параметров физических факторов для изделий, их генерирующих;

изучение биологического (токсикологического) действия.

При получении отрицательных результатов на любом из этапов исследования могут быть прекращены.

При проведении исследований и интерпретации результатов оценки биологического действия учитывают состав материалов, условия воздействия, вид, частоту и продолжительность контакта изделия или его частей с организмом человека. С учетом данных факторов изделия подразделяют на группы в соответствии с гигиенической классификацией, изложенной в Санитарных правилах и нормах по гигиеническим требованиям к изделиям медицинского назначения, медицинской техники и материалам, применяемым для их изготовления.

При контакте изделия медицинского назначения с организмом человека диапазон возможного биологического риска может включать в себя:

кратковременный эффект (например, острая токсичность, раздражение кожи, глаз и слизистых оболочек, сенсибилизация организма, гемолиз, тромбообразование);

хроническую интоксикацию, а также отдаленные, специфические эффекты (например, сенсибилизация организма, генотоксичность, канцерогенность и воздействие на репродуктивную функцию, включая тератогенность).

Исследования in vitro или in vivo проводят с учетом условий применения конечного продукта, уровня владения лабораторной практикой, последующей интерпретации результатов исследований специалистами соответствующего направления.

При возможности исследования in vitro проводят до начала исследований in vivo. Данные исследований, которые позволяют сделать независимое заключение о соответствии материала или конечного продукта назначению, сохраняют.

Повторную гигиеническую оценку изделий медицинского назначения проводят при любых изменениях:

источника поступления или любой характеристики материалов, идущих на производство изделия;

состава, первичной упаковки или метода стерилизации готового изделия;

свойств изделия при хранении;

предполагаемого изменения применения изделия.

При проведении исследований и оценке биологического действия изделий медицинского назначения руководствуются следующим принципами:

исследованиям подвергают готовое изделие или репрезентативные образцы материалов готового изделия;

при выборе методов исследований учитывают:

вид, степень, продолжительность, частоту и условия воздействия изделия на организм человека или контакта с ним при использовании по назначению,

химическую и физическую природу изделия,

потенциальную токсичность химических веществ, использованных при изготовлении изделия,

возможность исключения некоторых тестов, когда характер вымываемых веществ известен и уровень их токсичности допустим (например, тесты, предназначенные для оценки общетоксического действия),

отношение поверхности изделия или его частей, контактирующих с организмом человека, к размерам тела пациента,

информацию из литературных источников, а также опыт и результаты доклинических исследований;

модельную среду и условия экстракции для получения вытяжки из изделий выбирают в соответствии с природой и назначением изделия.

Методы гигиенических исследований изделий медицинского назначения, в зависимости от группы изделия указаны в приложении 5 настоящей Инструкции.

22. Дополнительные методы оценки применяются на этапе разработки новых изделий и материалов медицинского назначения или в случае необходимости, если отсутствует информация о свойствах канцерогенности, репродуктивной токсичности, биодеградации испытуемого изделия.

К дополнительным исследованиям относятся изучение отдаленных последствий, таких как канцерогенность, воздействие на репродуктивную функцию, тератогенность, эмбриотоксичность, а также исследование склонности изделия к биодеградации и кальцификации.

Дополнительные методы применяются для оценки изделий, контактирующих с внутренней средой организма и имплантируемых изделий.

23. Оценка устойчивости изделий медицинского назначения к циклам предстерилизационной очистки и стерилизации:

предстерилизационная очистка и стерилизация проводится перед проведением остальных исследований для изделий вновь разработанных, не проходивших ранее лабораторных испытаний, в случае изменения их композиционного состава, технологии изготовления, способа и режима стерилизации;

если готовое изделие поступает на исследования в нестерильном виде и должно подвергаться циклам предстерилизационной очистки и стерилизации перед применением согласно инструкции по применению или техническим условиям (далее - ТУ), то необходимо подвергнуть данное изделие циклам предстерилизационной очистки и стерилизации по условиям, указанным в инструкции по применению или ТУ, либо в соответствии с нормативными правовыми актами Министерства здравоохранения Республики Беларусь;

после проведения циклов предстерилизационной очистки и стерилизации изделие оценивается визуально. При визуальной оценке не должно быть изменений внешнего вида поверхности и формы изделий в виде трещин, отслоений, разрывов, наплывов, деформаций.

24. Тест на коррозионную стойкость необходимо выполнять для металлических изделий или их элементов, в случаях если:

изделие контактирует с внутренней средой организма, например лезвие скальпеля, спицы фиксирующих аппаратов, иглы катетеров, систем для переливания и другие;

имплантируемое изделие (стерильное или нестерильное), например ортопедические имплантируемые изделия;

изделие контактирует с поврежденными поверхностями тела, например хирургический инструментарий, кожные скобки;

изделия и инструментарий, подвергается дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации в процессе использования, например гинекологические, урологические инструменты, эндоскопы, датчики, клипсы.

Для игл и других изделий однократного применения и одномоментного контакта с внутренней средой организма необходимость проведения теста на коррозионную стойкость определяется экспертом.

Методика теста на устойчивость к коррозии приведена в приложении 6 настоящей Инструкции.

25. Разработка программы исследований проводится на основании приложения 5 настоящей Инструкции.

Объем и методы исследований, приведенные в приложении 5 не во всех случаях являются безусловно обязательными. В ситуациях, когда выполнять исследование нет необходимости либо методика невыполнима в связи с особенностями изделия, эксперт может разработать индивидуальную программу испытаний изделия, руководствуясь основными принципами и подходами настоящей Инструкции.

Программу исследований планируют так, чтобы каждое изделие оценивали в соответствии с присущими ему качествами. При необходимости используют дополнительные методы исследований, не указанные в приложении 5.

В отчете или заключении о результатах исследований обосновывают выбор дополнительных методов или отсутствие необходимости проведения тех или иных исследований.

Программу исследований изделия, не входящего ни в одну группу гигиенической классификации, разрабатывают индивидуально. В том случае, когда изделие может быть отнесено более чем к одной группе, устанавливают необходимость проведения исследований в соответствии с требованиями к каждой группе.

26. Изделия медицинского назначения, серийно выпускаемые в любой стране, имеющие сертификаты или удостоверения о государственной гигиенической регистрации и протоколы испытаний по гигиеническим параметрам безопасности аккредитованных лабораторий,

оформленные и утвержденные в установленном порядке, подлежат следующей процедуре исследований:

образцы изделий отбираются с целью проведения идентификации их представленным сопроводительным документам и протоколам испытаний;

проводится экспертиза представленных протоколов испытаний, в результате которой принимается решение о целесообразности проведения лабораторных исследований. В случае соответствия объема и результатов описанных исследований требованиям действующих в Республике Беларусь технических нормативных правовых актов – проведение лабораторных исследований нецелесообразно. В случае несоответствия – проводятся лабораторные исследования недостающие или в полном объеме.

27. Исследованиям на пирогенность, внутрибрюшинную токсичность подвергаются только стерильные вытяжки. Все манипуляции во время экспериментов должны проводиться с соблюдением правил асептики.

28. Исследования изделий медицинского назначения опосредованного контакта проводится с учетом условий и вида взаимодействия с организмом непосредственно контактирующего материала, вещества или изделия. Перечень изделий опосредованного контакта приведен в гигиенической классификации Санитарных правил и норм по гигиеническим требованиям к изделиям медицинского назначения, медицинской техники и материалам, применяемым для их изготовления.

Эмиссия химических элементов в воздух из систем приточной вентиляции операционных отделений с бактерицидными фильтрами не должна превышать предельно допустимые концентрации (далее - ПДК) загрязняющих веществ в атмосферном воздухе населенных мест среднесуточные (далее – ПДК с.с.). Эти системы также исследуются на соответствие положениям технической документации по показателю эффективности антимикробной очистки воздуха.

Исследуемые показатели оценки биологического действия изделий опосредованного контакта приведены в приложении 7.

Для исследований вновь разработанных, не проходивших ранее лабораторных испытаний изделий и материалов необходимо включать в схему испытаний изучение общетоксического действия в подострых или хронических экспериментах, а также дополнительные методы исследований.

29. При исследовании средств накожного применения приготовление вытяжек и исследование показателей органолептических, санитарно-химических, микробиологической чистоты, а также раздражающее на

кожу, ирритативное на слизистую глаз, сенсибилизирующее действие, острая и хроническая токсичность проводится согласно МР № 117-9711.

30. Исследования гелей электродных, паст, пленок, гелей для слизистой рта проводятся согласно следующим требованиям:

допустимый уровень содержания свинца, мышьяка, ртути в этих изделиях и показатели микробиологической чистоты должны соответствовать требованиям Санитарных правил и норм по гигиеническим нормативам безопасности изделий медицинского назначения, медицинской техники и материалов, применяемых для их изготовления;

для проведения токсикологических экспериментов используется образец в нативном виде;

исследование сенсибилизирующей способности проводится согласно МР № 117-9711;

изучение местного раздражающего действия на кожные покровы паст, гелей электродных проводится путем определения индекса местного раздражающего действия ($I_{cut.}$) по п. 55 настоящей Инструкции;

изучение ирритативного действия на слизистую глаз паст, пленок, гелей для слизистой рта проводится по п. 60 настоящей Инструкции;

при исследовании паст, пленок, гелей для слизистой рта необходимо установление индекса острой пероральной токсичности согласно МР № 117-9711. Рекомендуется проведение гемолитического теста если предполагается возможность контакта изделий с кровью.

31. Исследование игл проводится согласно следующим требованиям:

31.1. для инъекционных стерильных игл однократного применения определен следующий объем исследований:

органолептические исследования;

контроль стерильности;

санитарно-химические исследования.

Органолептические исследования игл включают определение запаха и внешнего вида самого изделия и органолептических показателей вытяжки из него (запах, цвет, прозрачность). Оценку органолептических показателей игл проводят по критериям, описанным в главе 5 настоящей Инструкции.

Санитарно-химические исследования игл включают определение ионов тяжелых металлов: железо, свинец, цинк, никель, марганец, кадмий, хром. Содержание ионов тяжелых металлов в вытяжке не должно превышать гигиенические нормативы Санитарных правил и норм по гигиеническим нормативам безопасности изделий медицинского назначения, медицинской техники и материалов, применяемых для их изготовления.

31.2. иглы, имеющие контакт с внутренней средой организма по длительности более чем одномоментный (например, хирургические, спинальные иглы), подлежат также исследованиям на пирогенность, острую внутрибрюшинную токсичность, стойкость к коррозии, изучению в гемолитическом тесте.

32. Схема исследований шприцев инъекционных однократного применения, подлежащих государственной гигиенической регистрации:

органолептические исследования;

стерильность;

санитарно-химические исследования;

исследования биологического действия.

Санитарно-химические исследования шприцев включают определение в вытяжке восстановительных примесей, изменение величины pH, определение мигрирующих химических ингредиентов.

Исследования биологического действия включают определение пирогенности, острой внутрибрюшинной токсичности, гемолитический тест.

33. Исследование и оценка стоматологических клинических материалов. К группе клинических стоматологических материалов относятся пломбировочные материалы, лечебные материалы, протравки, адгезивы согласно гигиенической классификации, изложенной в Санитарных правилах и нормах по гигиеническим требованиям к изделиям медицинского назначения, медицинской техники и материалам, применяемым для их изготовления.

Стоматологические клинические материалы не должны оказывать общетоксического, раздражающего, сенсибилизирующего, гемолитического действия на организм, не должны провоцировать риск возникновения отдаленных последствий. Вещества, которые входят в композицию пломбировочного материала (мономеры, добавки, примеси и прочие компоненты, а также продукты их деструкции и взаимодействия) не должны мигрировать в организм человека в количествах, способных оказывать вредное действие.

Подготовка вытяжек для исследований стоматологических материалов проводится по п. 16 настоящей Инструкции.

Стоматологические клинические материалы подлежат гигиеническим исследованиям по нижеприведенной схеме:

санитарно-химические исследования:

определение изменения величины pH вытяжки согласно приложению 8 настоящей Инструкции;

определение в вытяжке ингредиентов пломбировочной композиции: мономеров, добавок, примесей, продуктов деструкции и прочих компонентов.

Перечень определяемых ингредиентов устанавливается компетентным экспертом на основании информации о составе стоматологического материала. Перечень контролируемых химических веществ в стоматологических клинических материалах приведен в приложении 9 настоящей Инструкции;

токсикологические исследования:

изделия вновь разработанные, не проходившие лабораторных исследований; серийно выпускаемые, в случае изменения их композиционного состава или технологии изготовления, при наличии сведений о неблагоприятном воздействии на человека при применении, подлежат следующим токсикологическим исследованиям:

изучение общетоксического и раздражающего действия при внутрижелудочном введении по п. 35 настоящей Инструкции;

изучение сенсибилизирующего действия по п. 52 настоящей Инструкции;

изучение в тестах на мутагенность, пирогенность, гемосовместимость.

стоматологические клинические материалы, серийно выпускаемые, подлежат следующим токсикологическим исследованиям:

изучение раздражающего действия при внутрижелудочном введении по п. 34 настоящей Инструкции;

изучение гемолитических свойств материалов, предназначенных для пломбирования зубных каналов, герметизации фиссур - согласно приложению 10 настоящей Инструкции.

34. Изучение раздражающего действия стоматологических материалов при внутрижелудочном введении.

Испытания проводятся на белых крысах при внутрижелудочном ведении.

Используются 2 группы животных (опытная и контрольная) не менее чем по 5 особей в каждой. Животным опытной группы до кормления ежедневно в течение 10 дней внутрижелудочно вводят по 3 мл 7-суточной вытяжки. Контрольным животным в том же режиме вводят дистиллированную воду. Через 10 дней от начала введения животных умерщвляют методом декапитации и после вскрытия регистрируют реакцию раздражения слизистой желудочно-кишечного тракта. При этом макроскопически отмечают явления раздражения на слизистой желудочно-кишечного тракта (гиперемия, отек, образование язв и т.д.).

При выявлении раздражающего действии вытяжек у 2-х и более животных в группе делается вывод о несоответствии исследуемого стоматологического материала гигиеническим требованиям и дальнейшие исследования не проводятся. В случае выявления раздражающего

действия у одного животного в группе исследования следует повторить с целью исключения артефакта.

35. Изучение общетоксического действия стоматологических материалов при внутрижелудочном введении.

Опытным животным (белые крысы самцы весом 180-200 г в количестве не менее 10 особей) ежедневно в течение 28 дней внутрижелудочно (с помощью зонда) вводят по 3 мл (20 мл/кг) 7-суточной вытяжки. Контрольным животным вводят в таких же объемах дистиллированную воду. Обследования животных проводят через 4 недели, или в 2 этапа - через 1 неделю и 4 недели от начала затравки.

Изучаются показатели состояния организма, характеризующие функции основных систем и органов: поведенческие реакции, общая реактивность, показатели иммунной системы, гематологические показатели, белковый, жировой, углеводный обмены. При наличии данных о миграции в модельную среду определенных химических ингредиентов с известными токсикологическими свойствами, исследуются показатели, характеризующие функции тех органов и систем, которые преимущественно поражаются данными веществами. Рекомендуется проводить макро- и микроскопические исследования внутренних органов и тканей: печени, почек, желудка, селезенки, кишечника, надпочечников, тимуса. Оценивается общая архитектоника внутренних органов (окраска гематоксилин-эозином), наличие жировой дистрофии (окраска Суданом III), состояние волокнистых структур (окраска по Ван-Гизону) или другие патологические признаки на усмотрение эксперта. При макроскопическом исследовании слизистой желудка отмечают признаки воспаления, язвообразования. В случае макроскопического обнаружения опухолевых образований в организме животных опытных групп необходимо проведение гистологических исследований этих образований.

Данные токсикологических экспериментов статистически обрабатываются методами вариационной статистики.

Исследуемый материал считается нетоксичным, если на протяжении всего срока исследования не выявлено патологических признаков и статистически достоверных изменений состояния организма животных по сравнению с контролем.

36. Схема исследования имплантируемых изделий должна включать:

устойчивость к циклам предстерилизационной очистки и стерилизации – для нестерильных изделий,

органолептические исследования,

устойчивость к коррозии – для металлических изделий,

санитарно-химические исследования,

исследования биологического действия.

В случае если изделие не исследовалось ранее и отсутствует информация о его биологическом действии, исследования проводятся согласно методам, приведенным в приложении 5 настоящей Инструкции. Проведение имплантационного теста, в ходе которого изучаются все биологические эффекты взаимодействия, является необходимым в большинстве случаев.

При исследованиях изделий серийного производства для целей государственной гигиенической регистрации биологическое действие оценивается в тесте на пирогенность, гемолитическом тесте, определении острой токсичности.

37. Исследование медицинских реагентов диагностических и лабораторных проводится с целью оценки соответствия упаковки и маркировки реагента требованиям ГОСТ 3885-73 «Реактивы и особо чистые вещества. Правила приемки, отбор образцов, фасовка, упаковка и маркировка» и оценки полноты информации в инструкции для пользователей о мерах предосторожности при работе.

Инструкция по применению должна содержать правила техники безопасности при использовании реагента. Маркировка должна соответствовать требованиям ГОСТ 3885-73 «Реактивы и особо чистые вещества. Правила приемки, отбор образцов, фасовка, упаковка и маркировка» и содержать обозначения опасности.

38. Исследования изделий медицинской техники проводятся согласно следующим требованиям:

панели и поверхности изделий медицинской техники, не контактирующие при эксплуатации с пациентом и медицинским персоналом ни непосредственно, ни опосредованно, исследуются по показателям эмиссии вредных веществ в воздух;

информацию о наличии и характере контакта изделия с человеком получают из сопроводительных документов (инструкции по применению, руководства, технические условия, паспорта и т.п.);

данная группа изделий исследуется по органолептическим, санитарно-химическим показателям и параметрам физических факторов;

эмиссия химических элементов в воздух из изделий не должна превышать ПДК с.с. загрязняющих веществ в атмосферном воздухе населенных мест;

органолептические показатели изделий оцениваются согласно главе 5 настоящей Инструкции;

детали, элементы и поверхности изделий медицинской техники, контактирующие при эксплуатации с пациентом или медицинским персоналом, подлежат экстракции и дальнейшим исследованиям в зависимости от вида и продолжительности контакта.

ГЛАВА 5
ОРГАНОЛЕПТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

39. Органолептические исследования необходимо проводить для всех изделий и материалов медицинского назначения, выполненных из полимерных материалов, резин, металлов, за исключением стоматологических пломбировочных материалов, интраокулярных линз.

Изделия, которые не подлежат экстракции, оцениваются только по интенсивности запаха или наличию постороннего запаха и по внешнему виду. Например, твердые крошащиеся материалы, пленки, сорбирующие материалы, костные цементы, клеящие композиции, гели, пасты, порошки и прочие изделия.

Органолептические показатели средств накожного применения исследуются и оцениваются согласно МР № 117-9711.

Органолептические показатели гелей, паст, спреев, кремов, порошков, микрогранул и тому подобных изделий исследуются и оцениваются согласно Санитарным правилам и нормам «Санитарные правила и гигиенические нормативы безопасности парфюмерно-косметической продукции (ПКП)» № 10-33-95, утвержденным постановлением Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь от 26 декабря 1995 г № 27.

40. При органолептическом исследовании образцов изделий медицинского назначения отмечают: характер поверхности (сухая, липкая, однородная, гладкая, наличие трещин, деформаций, расслоений и т.д.); характер запаха (например: запах резины, ароматический и т.д.).

Целью органолептических исследований образцов изделий является визуальная оценка изделия и определение наличия, интенсивности и характера запаха, создаваемого химическими веществами, выделяющимися из исследуемого образца.

Для проведения органолептических исследований привлекаются лица, которые могут четко различать запах образцов. Дегустаторов должно быть не менее 3 человек. Каждый дегустатор заносит результаты в индивидуальную карту и подписывает ее.

Оценка интенсивности запаха образца изделия проводится по пятибалльной шкале, приведенной в приложении 11.

41. Требования к органолептическим показателям образцов изделий медицинского назначения:

при визуальной оценке поверхность изделий не должна иметь повреждений, сколов, трещин, наплывов, раковин, разрывов; должна быть однородной, не липкой, чистой;

металлические поверхности должны быть однородными, блестящими или матовыми, без зазубрин, инородных включений, темных пятен и признаков коррозии;

медицинские перчатки и т.п. должны иметь гладкую или слегка шероховатую, не липкую поверхность без трещин, отверстий, пузырей, посторонних включений, потеков, наплывов;

запах образцов изделий не должен превышать 1 балла, а для резиновых и тканых изделий – 2 баллов.

42. При органолептическом исследовании вытяжки из образца изделия и материала отмечают ее цвет, прозрачность (мутность, осадок, хлопья) и запах.

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

Для исследования запаха вытяжек в четыре колбы с притертыми пробками вместимостью до 100 мл вносят: в три по 50 мл контрольной пробы, в одну – 50 мл исследуемой вытяжки. Предварительно каждому дегустатору предлагают открыто ознакомится с запахом контрольного раствора. Для этого одну из трех колбочек встряхивают, открывают пробку и предлагают слегка втянуть в нос воздух из колбы. После этого проводят закрытую дегустацию растворов в оставшихся трех колбочках, чтобы выявить наличие запаха испытуемой вытяжки.

Из всех полученных результатов определения интенсивности запаха выводят среднее арифметическое. В соответствии с приложением 12 оценивают интенсивность запаха вытяжек из изделий и материалов.

43. Требования к органолептическим показателям вытяжек:

вытяжка должна быть прозрачной, бесцветной;

запах вытяжки должен составлять не более 1 балла.

ГЛАВА 6
ИССЛЕДОВАНИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЧИСТОТЫ И СТЕРИЛЬНОСТИ

44. Все стерильные изделия медицинского назначения подлежат исследованиям на стерильность.

Принцип оценки стерильности основан на обнаружении (не обнаружении) роста микроорганизмов на питательных средах.

Изделия должны соответствовать требованиям стерильности в течение гарантированного срока годности.

45. Исследованиям по показателям микробиологической чистоты необходимо подвергать следующие изделия медицинского назначения при условии, если они не стерильны и не содержат в своем составе антисептиков и дезинфицирующих веществ:

45.1. контактирующие со слизистыми оболочками человека:

внутривагинальные изделия,

гели, пасты, пленки;

45.2. гели, пасты, пленки, клеи, контактирующие с кожей человека;

45.3. средства накожного применения согласно МР № 117-9711;

45.4. другие изделия в случае необходимости по решению эксперта.

Оценка изделий медицинского назначения по показателям микробиологической чистоты проводится согласно Санитарным правилам и нормам по гигиеническим требованиям к изделиям медицинского назначения, медицинской техники и материалам, применяемым для их изготовления.

ГЛАВА 7
САНИТАРНО-ХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

46. Используемые методы санитарно-химических исследований должны быть чувствительными, результаты исследований должны быть воспроизводимыми при межлабораторном и внутрилабораторном контроле.

Набор санитарно-химических показателей зависит от состава материалов изделий медицинского назначения и включает в себя две основные группы исследуемых показателей:

интегральные методы (определение изменения pH вытяжки, восстановительных примесей, перманганатной окисляемости);

идентификация и количественное определение мигрирующих в модельные среды или воздух продуктов вымывания и деструкции.

Набор контролируемых санитарно-химических показателей определяется экспертом на основании изучения состава изделия.

Определение интегральных показателей выполняется в случае невозможности идентификации мигрирующих химических веществ, по решению эксперта.

Перечень контролируемых химических веществ, мигрирующих из изделий в модельные среды и воздух, приведен в приложении 13 настоящей Инструкции.

Оценка санитарно-химических показателей средств накожного применения проводится согласно МР № 117-9711.

Санитарно-химические показатели, определяемые в пастах, гелях электродных, пастах, пленках, гелях для слизистой рта - свинец, мышьяк, ртуть.

47. Санитарно-химические показатели, определяемые в стоматологических клинических материалах, описаны в приложении 9 настоящей Инструкции.

48. В случае обнаружения миграции химического вещества в модельную среду в количестве выше допустимого количества миграции (далее – ДКМ) (мг/дм^3) или ПДК (мг/л), либо эмиссии химических веществ в воздух выше ПДК с.с. (мкг/м^3) согласно Санитарным правилам и нормам по гигиеническим требованиям к изделиям медицинского назначения, медицинской техники и материалам, применяемым для их изготовления, - делается вывод о несоответствии изделия гигиеническим требованиям и дальнейшие исследования не проводятся.

ГЛАВА 8
ИССЛЕДОВАНИЯ ПАРАМЕТРОВ ФИЗИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ

49. Параметры физических факторов (шум, вибрация, инфразвук, ультразвук, электромагнитное поле, электростатическое поле, электрическое и магнитное поле тока промышленной частоты, постоянное магнитное поле, инфракрасное, видимое, ультрафиолетовое, лазерное и рентгеновское излучения) изделий медицинского назначения должны соответствовать требованиям санитарных норм, правил и гигиенических нормативов.

Информация о наличии физических факторов в конкретных изделиях с учетом особенностей и специфики эксплуатации, может быть получена из технических условий, технических описаний, инструкций по эксплуатации, рекламных проспектов производителей, информации для пользователей и особенностей эксплуатации в реальных условиях.

Исследования параметров физических факторов изделий проводятся согласно утвержденным инструкциям, методикам.

ГЛАВА 9
ИССЛЕДОВАНИЯ И ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ

50. Тесты на пирогенность используют для определения пирогенных реакций экстрактов из изделий или материалов. Исследуют на пирогенность вытяжку из стерильного изделия медицинского назначения, приготовленную с соблюдением правил асептики. При этом имеют в виду, что с помощью одного теста невозможно определить, вызвана ли пирогенность самой вытяжкой или внешним загрязнением эндотоксином.

В случае обнаружения пирогенности исследование необходимо повторить еще один раз с заново приготовленной вытяжкой для исключения внешнего загрязнения.

Методика определения и оценка пирогенности приведена в приложении 14 настоящей Инструкции.

51. Изучение цитотоксического действия проводится для изделий и материалов медицинского назначения:

вновь разработанных, не проходивших ранее лабораторных исследований;

серийно выпускаемых, в случае изменения их композиционного состава, технологии изготовления и обработки, способа и режима стерилизации;

для целей производственного контроля или по запросу заказчика;

если материал имеет сложную рецептуру, но отсутствуют достаточно чувствительные методы химического определения отдельных гигиенически значимых ингредиентов или отсутствуют соответствующие величины ПДК – по решению эксперта.

Цитотоксичность – биологический тест, позволяющий провести испытания как изделия, так и экстракта в условиях in vitro. Исследования проводят на различных клетках, таких как клеточные культуры фибробластов, кератоциты, гепатоциты, тимоциты и т.д. Методы с использованием клеточных культур позволяют определить лизис клеток, замедление роста клеток, потерю способности размножаться и другие результаты воздействия, обусловленные контактом с тестируемым изделием. Тесты по определению цитотоксичности позволяют выявить прямое воздействие химических веществ.

Общие принципы, приготовление образца и вытяжки, методы исследований и оценка результатов цитотоксического действия описаны в ГОСТ ИСО 10993-5-2002 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Исследование на цитотоксичность: методы in vitro».

Методика изучения цитотоксических свойств in vitro на эмбриональных мышиных фибробластах описана в приложении 15 настоящей Инструкции.

52. Изучение сенсибилизирующего действия изделий и материалов медицинского назначения.

Изделия вновь разработанные, не проходившие ранее лабораторных исследований, серийно выпускаемые, в случае изменения их композиционного состава, технологии изготовления или любой характеристики материалов, используемых для производства изделия, подлежат исследованиям сенсибилизирующего действия согласно Инструкции 1.1.11-12-35-2004 «Требования к постановке

экспериментальных исследований для первичной токсикологической оценки и гигиенической регламентации веществ», утвержденной постановлением Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь от 14 декабря 2004 г № 131. Исследования проводят на мышах, крысах или морских свинках. Срок эксперимента зависит от схемы иммунизации, выбранной испытателями. В конце эксперимента определяют индукцию гиперчувствительности замедленного типа по тесту опухания лапы или уха животных, весовой индекс тимус/селезенка, проводят специфические реакции лейколизиса и дегрануляции тучных клеток.

Для средств накожного применения, гелей электродных, паст, пленок, гелей для слизистой рта (прочих изделий) подлежащих государственной гигиенической регистрации, оценка сенсибилизирующей способности проводится согласно МР № 117-9711.

Изучение сенсибилизирующего действия прочих изделий, не указанных в пункте 52, проводится в случае необходимости по решению эксперта.

53. Раздражающее действие изделий, материалов медицинского назначения и (или) вытяжек из них оценивают, используя определенные участки тела подопытного животного (кожа, глаза). При выборе конкретного метода определения раздражающего действия учитывают вид контакта (кожа, слизистые оболочки, мягкие ткани) и продолжительность контакта. Для сравнения берут интактных животных, а при необходимости используют положительный и отрицательный контроли.

54. Изучение местного раздражающего действия на кожные покровы лабораторных животных необходимо проводить для изделий медицинского назначения, контактирующих с кожей, а также, при необходимости, для изделий, контактирующих с раневой поверхностью, мягкими тканями. В зависимости от длительности контакта изделия с организмом в экспериментах на лабораторных животных исследуется острое, подострое и хроническое действие нативных образцов и водных вытяжек из них на кожные покровы.

Для серийно выпускаемых изделий, подлежащих государственной гигиенической регистрации, исследование раздражающего действия на кожные покровы выполняется путем определения индекса местного раздражающего действия по п. 55 для вытяжек, по п. 56 - для нативных образцов.

55. Определение местного раздражающего действия водных вытяжек из изделий медицинского назначения на кожные покровы проводится путем определения индекса местного раздражающего действия ($I_{cut.}$).

Приготовление вытяжек из образцов проводится согласно главе 3 настоящей Инструкции. При исследовании порошков и микрогранул из

них предварительно готовят пасты, суспензии или вытяжки с использованием подходящего растворителя.

По изменению функционального состояния кожи лабораторного животного (проявлений воспалительной реакции – эритемы и/или отека) при нанесении на нее определенной дозы испытуемого образца судят о наличии выраженности облигатного раздражающего кожу действия изучаемых изделий.

В качестве подопытных животных используют их следующие виды:

морские свинки, массой 300-450 г,

кролики, массой более 2000 г,

белые крысы, массой 180-220 г.

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

Для каждого испытуемого образца и для контрольной пробы за сутки до эксперимента на боковых поверхностях туловища животных выстригают (ножницами или электромашинкой) шерсть в виде кожного «окошка» площадью: у кроликов 3х5 см, у морских свинок 2х3 см, у крыс 2х2 см. Между «окошками» шерстяной покров должен составлять не менее 1 см. Применение депиляторов не допустимо, пригодны для испытания только кожные «окошки» без видимых повреждений.

Испытания проводят в течение трех дней открытым аппликационным способом путем ежедневного равномерного нанесения на кожные «окошки» водной вытяжки в дозе 0,02 $см^3$ на 1 $см^2$ кожного «окошка» с помощью пипеточного дозатора, аккуратно втирая пробу в поверхность «окошка» стеклянной палочкой. На контрольные «окошки» аналогично наносится дистиллированная вода, либо растворитель в том же количестве.

Ежедневная экспозиция составляет 4 часа. На это время животные фиксируются в индивидуальных домиках (для исключения слизывания или механического снятия вещества с кожи) в условиях температуры окружающей среды, равной 17-25 ^{0}С.

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

Через 24 часа после заключительной аппликации водных вытяжек на опытных и контрольных участках оценивают функциональное состояние кожи: эритематозную реакцию – визуально по четкости и выраженности тона гиперемии, а также толщину кожной складки (далее - ТКС), измеряемую микрометром до опыта (далее - $ТКС_{фон.}$) и через 24 часа после последнего воздействия (далее - $ТКС_{аппл.}$). Процедура измерения ТКС:

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

Оценку состояния кожи на опытных и контрольных участках по интенсивности эритематозной реакции и по величине отека (нарастанию толщины кожной складки) проводят в баллах согласно таблицам 1 и 2 приложения 16 настоящей Инструкции.

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

$$I_{cut} = \frac{[(R+T)_0 - (R+T)_k]_1 + [(R+T)_0 - (R+T)_k]_2 + \ldots + [(R+T)_0 - (R+T)_k]_n}{n}, \text{ где}$$

R – выраженность эритематозной реакции в балах на опытном (о) и контрольном (к) участках;

Т – выраженность отека кожи в балах на опытном (о) и контрольном (к) участках;

1,2,…,n – порядковый номер животного;

n – количество животных в группе.

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

$$I_{cut} = \frac{(T_0 - T_k)_1 + (T_0 - T_k)_2 + \ldots + (T_0 - T_k)_n}{n}, \text{ где}$$

Т – выраженность отека кожи в балах на опытном (о) и контрольном (к) участках;

1,2,…,n – порядковый номер животного;

n – количество животных в группе.

За результат испытания каждого образца принимают средне арифметическое результатов определения разницы между суммами оценивающих величин эритемы и (или) отека в баллах на соответствующем опытном и контрольном участках кожи каждого животного с доверительной границей (далее - L) согласно приложению А Санитарных правил и норм «Методические указания по определению токсикологических и аллергологических нормативных показателей

гигиенической безопасности реализуемой и применяемой парфюмерно-косметической продукции» № 10-33.2-95, утвержденных постановлением Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь от 26 декабря 1995 г. № 27, при уровне вероятности р 0,95.

Местное раздражающее кожу действие водной вытяжки испытуемого изделия отсутствует (условное обозначение I_{cut}=0 баллов), если значение индекса равно нулю или его сумма с величиной доверительной границы менее 1,0 балла ($I_{cut.}$+L < 1,0). При величине $I_{cut.}$+L ≥ 1,0 баллу испытуемый образец обладает раздражающим действием на кожу ($I_{cut.}$=1 балл).

56. Определение местного раздражающего действия нативных образцов изделий на кожные покровы в острых и подострых экспериментах:

56.1. опыты на кроликах. Нативные образцы медицинских изделий размером 5х5 см помещаются на выстриженную накануне кожу боковых участков спины кроликов и фиксируются (путем наложения – для средств накожного применения, обладающих самоклеющимся эффектом, либо с помощью лейкопластыря). Для предотвращения снятия животными образцов кроликов размещают в индивидуальных домиках-боксах. Экспозиция составляет в острых экспериментах – 4 часа, в подострых – 2, 3, 4 и 5 суток (в зависимости от сроков использования изделия в реальных условиях). Каждая подопытная группа включает по 3 особи. Кроликам контрольной группы (3 особи) на кожные покровы аналогично фиксируют «отрицательный контроль» такого же размера. Для отрицательного контроля используют материалы, указанные в Приложении А ГОСТа ИСО 10993-12-2002 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Приготовление проб и стандартные образцы». Отрицательный контроль должен иметь сходные с исследуемым материалом физические параметры и не оказывать раздражающего действия. В качестве заменителя можно использовать марлю, сложенную вчетверо.

Учет местной реакции проводят сразу после окончания указанных сроков продолжительности опыта.

Установление наличия и изучения характера местного раздражающего действия нативных образцов изделий на кожные покровы с определением индекса местного раздражающего действия ($I_{cut.}$) определяют и оценивают аналогично п. 55 настоящей Инструкции;

56.2. опыты на крысах. Нативные образцы медицинских изделий размером 2,5х2,5 см. после непосредственного наложения на выстриженную накануне кожу белых крыс фиксируют на боковых участках спины животных (при отсутствии самоклеющегося эффекта образцы фиксируют с помощью полос лейкопластыря). Опытная группа

включает 3 особи, контрольная – 3 животных. Экспозиция составляет 24 часа (острые опыты), 2-6 суток (подострый эксперимент).

Определение индекса местного раздражающего кожу действия ($I_{cut.}$) в баллах и его оценку проводят аналогично п. 55 настоящей Инструкции.

Местное раздражающее кожу действие у испытуемого нативного образца медицинских изделий отсутствует (I_{cut}=0 баллов), если значение индекса равно нулю или его сумма с величиной доверительной границы менее 1,0 баллов ($I_{cut.}$+L<1,0). При величине $I_{cut.}$+L≥1,0 баллов испытуемый образец обладает раздражающим действием на кожу ($I_{cut.}$=1 балл).

Однократная, трехкратная и пятикратная фиксация фрагментов изделий на выстриженные участки кожи спины белых крыс и кроликов не должна вызывать признаков раздражения кожных покровов и внешних симптомов интоксикации. Кожа на местах аппликации должна оставаться эластичной, гладкой, без отека (0 баллов) и гиперемии (0 баллов). $I_{cut.}$ = 0 баллов.

57. Изучение длительного эпикутанного действия изделий:

при исследовании вновь разработанных изделий и материалов и их доклинической оценке в экспериментах на лабораторных животных исследуется хроническое действие водных вытяжек и нативных образцов. Характер эксперимента - накожные аппликации нативных образцов или водных вытяжек.

58. Изучение длительного эпикутанного действия нативных образцов изделий:

58.1. опыты на белых крысах. Условия эксперимента: 15-суточная непрерывная эпикутанная аппликация нативных образцов изделий размером 2,5х2,5 см на предварительно выстриженные латеральные участки спины животных. Образец дополнительно фиксируется с помощью полос лейкопластыря. Животные размещаются в индивидуальных станках-кассетах, где находятся круглосуточно, за исключением времени для кормления, ухода, прогулки, дополнительной фиксации либо смены образцов. Замену образцов на свежие производят каждые 3-5 суток (в соответствии с рекомендациями по применению данного вида медицинских изделий): образцы удаляют, участки кожных покровов обмывают теплой водой с туалетным мылом, подсушивают вначале марлевыми салфетками, а затем на воздухе; состригают отросший шерстный покров. После 4-часовой паузы фиксируют свежие образцы. Для профилактики гиподинамии крыс 4 раза в сутки на 1 час помещают в прогулочный манеж. В целях профилактики изоляционного стресса животных каждой группы во время ухода, кормления и прогулки содержат совместно. Контрольные животные, на кожные покровы которых аналогично фиксируются образцы «отрицательного контроля» по

п. 56 настоящей Инструкции такой же площади, содержатся в таком же режиме эксперимента.

Каждая группа включает по 7-10 животных. В ходе эксперимента ведется наблюдение за поведением, внешним видом и общим состоянием животных, отмечается наличие местно-раздражающих эффектов, состояние шерстного покрова и видимых слизистых оболочек.

Установление наличия и изучения характера местного раздражающего действия нативных образцов на кожные покровы с определением индекса местного раздражающего действия ($I_{cut.}$) определяют при каждой смене образцов и оценивают согласно п. 55 настоящей Инструкции.

До начала опыта и после окончания эксперимента, животные обследуются по показателям, характеризующим функциональное состояние наиболее показательных органов и систем (печени, желудка, центральной нервной и сердечно-сосудистой системы, иммунологической реактивности, системы крови и др.). По окончании эксперимента производится взятие участков кожи животных для патоморфологических исследований;

58.2. опыты на кроликах. Нативные образцы размером 5х5 см после наложения на выстриженную накануне кожу боковых участков спины кроликов фиксируются (путем наложения – для средств накожного применения, обладающих самоклеющимся эффектом, либо с помощью нейтрального лейкопластыря). Для предотвращения снятия животными образцов кроликов размещают в индивидуальных домиках-боксах, где они находятся круглосуточно, за исключением времени для кормления, ухода, прогулки, дополнительной фиксации либо смены образцов. Замену образцов на свежие производят каждые 3-5 суток (в соответствии с рекомендациями по применению данного вида изделия): образцы удаляют, участки кожных покровов обмывают теплой водой с туалетным мылом, подсушивают вначале марлевыми салфетками, а затем на воздухе; состригают отросший шерстяной покров. После 4-часовой паузы фиксируют свежие образцы. Для профилактики гиподинамии кроликов 2 раза в сутки на 2 часа помещают в прогулочный манеж.

Контрольные животные, на кожные покровы которых аналогично фиксируются образцы «отрицательного контроля» по п. 56 настоящей Инструкции такой же площади, содержатся в таком же режиме эксперимента.

Экспозиция составляет в хронических экспериментах от 15 до 30 суток (в зависимости от сроков использования изделия в реальных условиях). Каждая подопытная группа включает 5-7 особей. Учет местной реакции проводят во время смены образцов. Установление наличия и изучения характера местного раздражающего действия нативных образцов

изделий на кожные покровы с определением индекса местного раздражающего действия (I_{cut}) определяют при каждой смене образцов и оценивают согласно п. 55 настоящей Инструкции.

До начала опыта и после окончания эксперимента, животные обследуются по показателям, характеризующим их общее состояние. По окончании эксперимента производится взятие участков кожи животных для патоморфологических исследований.

59. Изучение длительного эпикутанного действия водных вытяжек из изделий. Используется метод хвостовых аппликаций водных вытяжек на белых крысах. Животные содержатся по 4 часа в специальных домиках-кассетах.

Длительность эксперимента – 1-2 месяца.

Вытяжка готовится в соответствии с главой 3 настоящей Инструкции. Контрольным животным в тех же условиях вводится дистиллированная вода, на которой готовится вытяжка.

До начала опыта, через 2 недели и затем ежемесячно после начала эксперимента, животные обследуются по показателям, характеризующим их общее состояние.

По окончании эксперимента проводится эвтаназия путем мгновенной декапитации и взятие участков кожи животных для патоморфологических исследований.

При исследовании вновь разработанных перевязочных и противоожоговых материалов, контактирующих с раневой поверхностью, проводится подострый токсикологический эксперимент с подкожным введением животным 3-суточной вытяжки ежедневно в течение 1 месяца. Разовый объем вводимой вытяжки 2 мл.

При исследовании вновь разработанных трансдермальных средств ежедневно подкожно в течение 15 суток, 1-2 месяцев в верхний боковой шейно-спинной участок туловища вводят активное вещество композиции в количествах, рассчитываемых (мг/сутки на животное) по формуле:

$A = K \times S \div 5$, где

А – количество вещества;

К – его содержание в мг на $см^2$ образца;

S – площадь испытуемого образца.

До начала опыта, через 2 недели и затем ежемесячно животные обследуются по показателям, характеризующим их общее состояние.

60. Изучение ирритативного действия водных вытяжек из изделий на слизистую оболочку глаза лабораторных животных.

Изучение ирритативного действия необходимо проводить для изделий, контактирующих со слизистыми оболочками.

Для этого используют водные вытяжки из образцов изделий, приготовленные согласно главе 3 настоящей Инструкции.

Установление ирритативного действия водных вытяжек из изделий проводится путем определения индекса ирритативного действия ($I_{ir.}$).

По изменению функционального состояния слизистых оболочек глаз лабораторных животных (проявление симптомов раздражения – гиперемии, отека, слезотечения) при внесении определенной дозы испытуемого образца судят о наличии и выраженности ирритативного (раздражающего) слизистые оболочки действия водных вытяжек из изделий, что адекватно характеризует опасность его действия на слизистые оболочки и других органов (рта, верхних дыхательных путей, пищеварительного тракта).

В качестве лабораторных животных в основном используют кроликов массой 2000-4000 г, возможно использование морских свинок массой 250-500 г. Формируют группы подопытных животных из не менее трех особей (для вновь разработанных изделий - не менее 7) любого пола, желательно не альбиносов.

В нижний конъюнктивальный свод правого глаза каждого животного однократно вносят (инстиллируют) пипеточным дозатором водные вытяжки испытуемого образца в количестве по 0,05 $см^3$ (кролики) или 0,025 $см^3$ (морские свинки), слегка оттягивая нижнее веко.

В левый глаз (контрольный) аналогично в той же дозе вносят дистиллированную воду.

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

Характеристику выраженности симптомов раздражения слизистой оболочки опытного и контрольного глаза и их оценку в баллах проводят согласно приложению 17 настоящей Инструкции.

Индекс ирритативного действия испытуемой вытяжки на слизистую глаза (I_{ir}) в баллах вычисляют по следующей формуле:

$$I_{ir} = \frac{[(R+T+B)_0 - (R+T+B)_k]_1 + \ldots + [(R+T+B)_0 - (R+T+B)_k]_n}{n},$$ где

R - выраженность гиперемии в баллах;

T - выраженность отека в баллах;

B - выраженность выделений в баллах;

o - результаты суммарной оценки состояния слизистой опытного глаза;

k - результаты суммарной оценки состояния слизистой контрольного глаза;

1,…,n – порядковый номер животного;

n – количество животных в группе.

За результат исследования принимают среднее арифметическое результатов определения разницы между суммами оценивающих величин гиперемии, отека и выделений из глаз в баллах на соответствующем опытном и контрольном глазах у каждого животного с доверительной границей (L) согласно приложению А Санитарных правил и норм «Методические указания по определению токсикологических и аллергологических нормативных показателей гигиенической безопасности реализуемой и применяемой парфюмерно-косметической продукции» № 10-33.2-95, утвержденных постановлением Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь от 26 декабря 1995 г № 27, при уровне вероятности р 0,95.

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

61. Раздражающее действие при внутрикожном введении. Для вновь разработанных, не проходивших ранее лабораторных исследований изделий, местную реакцию ткани на вытяжки из изделий оценивают с помощью метода внутрикожной пробы. Этот метод применяют в случаях, когда определение раздражающего действия на коже и слизистой оболочке непригодно (например, при исследовании изделий, контактирующих с раневой поверхностью, мягкими тканями, непрямым кровотоком), предпочтительно в случаях, когда экстрагируемые вещества гидрофобны.

Цель исследований - оценить способность материала оказывать раздражающее действие при внутрикожном введении.

Исключение из исследования:

материалы, обладающие раздражающим действием на кожу, слизистую глаза или ткани мышц, или pH которых меньше или равно 2 или больше или равно 11,5, исследованиям не подвергают.

Исследованиям подвергают вытяжку из образца, которую готовят в соответствии с главой 3 настоящей Инструкции;

Используют здоровых молодых половозрелых кроликов-альбиносов обоего пола массой не менее 2 кг.

Для первичной оценки исследуемого материала используют не менее трех кроликов.

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

Методика проведения исследований.

За сутки до проведения исследования тщательно выстригают шерстный покров на спине животных (10 «окошек» вдоль позвоночника с одной стороны и 10 с другой), оставляя достаточные промежутки между участками кожи, где предполагают произвести инъекции вытяжек.

Внутрикожное введение 0,2 мл вытяжки, приготовленной с использованием полярной модельной среды (дистиллированная вода или другие), производят в пяти участках кожи на одной стороне спины каждого кролика. Для инъекций используют иглы самых маленьких размеров с учетом вязкости вводимых вытяжек.

Одновременно вводят 0,2 мл полярной контрольной модельной среды в пяти участках кожи с той же стороны спины каждого кролика.

В том случае, если испытуемый материал гидрофобный, описанную выше процедуру повторяют с вытяжкой, приготовленной с использованием неполярной модельной среды, и с неполярной контрольной модельной средой с другой стороны спины каждого кролика. При этом учитывают, что внутрикожное введение масляных растворов заведомо вызывает раздражение.

Если применяют другие растворители, описанные процедуры повторяют как для вытяжек, приготовленных с их использованием, так и для самих растворителей.

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 п. 5.4.6 ГОСТ ИСО 10993-10-2002 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Исследование раздражающего и сенсибилизирующего действия».

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

Для оценки по возможности применяют методы, наименее травмирующие животных.

Оценку результатов проводят рассчитывая Индекс первичного раздражения в соответствии с п. 5.4.7 ГОСТ ИСО 10993-10-2002 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Исследование раздражающего и сенсибилизирующего действия».

62. Общетоксическое действие изучается согласно следующим требованиям:

вредный эффект, обусловленный изделиями, материалами и (или) вытяжками из них, при однократном или многократном воздействии на подопытных животных оценивают с помощью методов исследования общетоксического действия. Эти методы применяют в случаях, когда при контакте возможна абсорбция токсичных мигрирующих веществ и продуктов деструкции;

изучение общетоксического действия проводят в остром, подостром, субхроническом или хроническом экспериментах при различных путях введения нативных образцов или вытяжек из них;

методы исследования общетоксического действия выбирают в соответствии с видом и продолжительностью контакта. При исследованиях группы изделий контактирующих с поверхностью тела используется накожное нанесение образцов в нативном виде или вытяжек из них, а также, при необходимости, внутрижелудочное и внутрибрюшинное введение вытяжек. Для изделий, контактирующих с внутренней средой организма, преимущественно используется внутрибрюшинное и внутривенное введение. Для стоматологических материалов – внутрижелудочное введение. Для имплантируемых изделий – имплантационный тест.

63. При проведении государственной гигиенической регистрации и сертификации, изделия серийного производства подлежат изучению острой токсичности при внутрибрюшинном введении на теплокровных животных по методике, приведенной в приложении 18 настоящей Инструкции, либо определению общетоксических свойств на клеточных тест-объектах согласно Инструкции 1.1.10-22-58-2005 «Порядок проведения санитарно-химических, токсикологических и микробиологических испытаний стерилизованных шприцев инъекционных однократного применения», утвержденной постановлением Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь от 15 ноября 2005 г № 177. При повторном получении положительных результатов в опытах с клеточным тест-объектом необходимо проведение эксперимента на теплокровных животных.

При проведении государственной гигиенической регистрации и сертификации изделия медицинского назначения, контактирующие со слизистыми оболочками согласно приложению 5 настоящей Инструкции, серийного производства, не подлежат изучению общетоксического действия.

64. Острая токсичность изучается согласно требованиям настоящего пункта.

Острую токсичность изделий медицинского назначения при пероральном введении изучают согласно МР № 117-9711. Определение степени опасности острого отравления при чрезкожном поступлении

изучают и оценивают согласно пп. 36 и 38 Инструкции 1.1.11-12-35-2004 «Требования к постановке экспериментальных исследований для первичной токсикологической оценки и гигиенической регламентации веществ», утвержденной постановлением Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь от 14 декабря 2004 г № 131.

Наиболее доступный и распространенный способ изучения острой токсичности – определение степени токсичности вытяжки при однократном внутрибрюшинном введении мышам. Оцениваемые показатели: отсутствие смертности, внешнее состояние мышей и состояние внутренних органов. Острую токсичность при внутрибрюшинном введении изучают согласно приложению 18 настоящей Инструкции, либо определением общетоксических свойств на клеточных тест-объектах согласно Инструкции 1.1.10-22-58-2005 «Порядок проведения санитарно-химических, токсикологических и микробиологических испытаний стерилизованных шприцев инъекционных однократного применения», утвержденной постановлением Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь от 15 ноября 2005 г № 177. При повторном получении положительных результатов в опытах с клеточным тест-объектом необходимо проведение эксперимента на теплокровных животных.

65. Подострую токсичность при внутрибрюшинном введении изучают согласно приложению 19 настоящей Инструкции.

Подострую токсичность при внутрижелудочном введении изучают согласно п. 35 настоящей Инструкции.

Подострую токсичность при внутривенном введении изучают согласно приложению 20 настоящей Инструкции.

66. Субхроническая токсичность изучается согласно требованиям настоящего пункта.

Определение кожно-резорбтивного действия в субхроническом эксперименте проводят согласно пп. 36 и 37 Инструкции 1.1.11-12-35-2004 «Требования к постановке экспериментальных исследований для первичной токсикологической оценки и гигиенической регламентации веществ», утвержденной постановлением Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь от 14 декабря 2004 г № 131.

Субхроническую токсичность при внутрибрюшинном введении изучают согласно приложению 19 настоящей Инструкции

Субхроническую токсичность при внутрижелудочном введении изучают согласно п. 35 настоящей Инструкции.

В процессе эксперимента обязательно наблюдение за животными с периодическим взвешиванием (1 раз в неделю или 1 раз в две недели), изучение функционального состояния наиболее показательных органов и систем (печени, желудка, центральной нервной и сердечно-сосудистой

системы, иммунологической реактивности, системы крови и др.). При завершении испытаний проводят патоморфологические и гистохимические исследования органов и тканей.

Для уменьшения количества используемых животных, а также для создания идентичности условий испытаний изделий на биосовместимость проводят совмещение исследований на субхроническую (хроническую) токсичность с имплантационным тестом, испытаниями на генотоксичность, иммунотоксичность или канцерогенность.

Исследования субхронической токсичности можно не проводить для материалов, о которых имеются данные о хронической токсичности.

67. Хроническая токсичность изучается согласно следующим требованиям:

при разработке новых изделий медицинского назначения и их доклинической оценке исследуют хроническое или субхроническое действие их на лабораторных животных согласно п. 6.5 МР № 117-9711;

общетоксическое действие в хроническом эксперименте удобно изучать в рамках проведения имплантационного теста;

при изучении общетоксического действия изделий необходимо оценивать отсутствие смертности, внешнее состояние животных, состояние внутренних органов (не должны отличаться от нормы), показатели гематологические, иммунологические, биохимические и другие;

после завершения эксперимента проводится систематизация и статистическая обработка цифрового материала, обобщение и анализ полученных данных с учетом пределов физиологических колебаний показателей лабораторных животных, степени и характера выявленных сдвигов.

68. Исследованиям в имплантационном тесте подвергают вновь разработанные изделия медицинского назначения.

С помощью имплантационного теста оценивают местное патогенное действие на живую ткань (на макроскопическом и микроскопическом уровнях) при изучении образца материала или конечного продукта. Образец материала или конечного продукта имплантируют хирургическим путем в определенную ткань подопытного животного в соответствии с предполагаемым применением. Наиболее распространенные экспериментальные исследования заключаются в следующем. Биоматериал в виде пленок, нитей, губок, пластин, гранул, геля или изделий (сосуды, катетеры и т.д.) имплантируют в соответствующие органы и ткани (подкожно, внутримышечно, внутрибрюшинно, в сосуды, офтальмологические материалы в область глаза) на различные сроки в зависимости от поставленных задач и склонности материала к деструкции.

Гистологические, гистохимические и электронномикроскопические, а также биохимические, иммунологические и другие исследования проводят

не только относительно местной реакции тканей на имплантируемый материал в динамике опыта, но и органов, в которых возможно накопление продуктов деструкции и функциональных изменений.

Имплантационный тест проводят по ГОСТ ИСО 10993-6-2002 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Исследование местного действия после имплантации».

Методы имплантации под кожу, внутрибрюшинно, внутримышечно приведены в приложении 21 настоящей Инструкции.

69. При исследованиях гемосовместимости оценивают воздействие на кровь или ее компоненты при контакте изделий, материалов медицинского назначения с соответствующей моделью или системой.

Тесты на гемосовместимость для вновь разработанных изделий проводят руководствуясь СТБ ИСО 10993-4-2004 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Исследования изделий, взаимодействующих с кровью». Тесты на гемосовместимость разрабатывают так, чтобы были смоделированы геометрия, условия контакта и динамика кровотока внутри изделия или материала во время клинического применения.

Изделия медицинского назначения серийного производства, подлежащие государственной гигиенической регистрации, исследуют в гемолитическом тесте согласно приложению 10 настоящей Инструкции. Исследование гемолиза позволяет определить степень лизиса эритроцитов и высвобождение гемоглобина под воздействием изделий, материалов и (или) вытяжек из них in vitro.

70. Изучение генотоксичности проводится для изделий и материалов медицинского назначения:

вновь разработанных, не проходивших ранее лабораторных испытаний;

серийно выпускаемых, в случае изменения их композиционного состава, технологии изготовления и обработки, способа и режима стерилизации;

для целей производственного контроля или по запросу заказчика;

если материал имеет сложную рецептуру, но отсутствуют достаточно чувствительные методы химического определения отдельных гигиенически значимых ингредиентов или отсутствуют соответствующие величины ПДК.

При исследовании генотоксичности используют клеточные культуры млекопитающих и других животных. Допустимы и другие методы исследования генных мутаций, изменений структуры и числа хромосом, а также других токсических воздействий на дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) или гены, обусловленных контактом с изделием, материалами и (или) вытяжками из них.

Исследования изделий по показателям генотоксичности проводят согласно ГОСТ ИСО 10993-3-2002 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Исследование генотоксичности, канцерогенности и токсического действия на репродуктивную функцию».

Методики изучения генотоксичности изложены в приложении 22 настоящей Инструкции.

71. При исследованиях канцерогенности изучают указанную активность изделий, материалов и (или) вытяжек из них в результате однократного, многократного контакта или воздействия в течение периода времени, составляющего большую часть жизненного цикла животного. Эти исследования позволяют одновременно изучить хроническую токсичность и канцерогенность в рамках одного эксперимента.

Исследования канцерогенности проводят в тех случаях, когда имеют данные из других источников, предполагающие подобную активность.

Исследования медицинских изделий по на канцерогенность проводят согласно ГОСТ ИСО 10993-3-2002 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Исследование генотоксичности, канцерогенности и токсического действия на репродуктивную функцию».

72. Токсическое воздействие на репродуктивную функцию и развитие.

При этих исследованиях оценивают способность материалов, изделий и (или) вытяжек из них оказывать вредное воздействие на репродуктивную функцию, развитие эмбриона (тератогенность), на пренатальное (внутриутробное) и постнатальное развитие.

Исследования проводят в тех случаях, когда имеют данные из других источников о том, что изделие может обладать способностью воздействовать на репродуктивную функцию и развитие субъекта. При этом учитывают вид и продолжительность контакта.

Исследования медицинских изделий на токсическое воздействие на репродуктивную функцию и развитие проводят согласно ГОСТ ИСО 10993-3-2002 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Исследование генотоксичности, канцерогенности и токсического действия на репродуктивную функцию».

Приложение 1
к Инструкции 1.1.10-12-41-2006
«Гигиеническая оценка изделий медицинского назначения, медицинской техники и материалов, применяемых для их изготовления»

СООТНОШЕНИЕ ПЛОЩАДИ ПОВЕРХНОСТИ И (ИЛИ) МАССЫ ОБРАЗЦА К ОБЪЕМУ МОДЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ПРИ ЭКСТРАГИРОВАНИИ

Толщина, мм	Соотношение при экстракции	Наименование материала
менее 0,5	6 $см^2$/мл	Металл, синтетический полимер, керамика, композитная пленка, листы и стенки трубок
более 0,5	3 $см^2$/мл	Металл, синтетический полимер, керамика, композитные стенки трубок, плиты, литые изделия
менее 1,0	3 $см^2$/мл	Природный эластомер
более 1,0	1,25 $см^2$/мл	Природный эластомер
Неравномерная	От 0,1 г/мл до 0,2 г/мл; 6 $см^2$/мл	Шарики

Примечание. При исследовании абсорбентов и гидроколлоидов определяют «абсорбционную емкость» материала, например количество модельной среды, абсорбированной материалом. Исследуемая проба должна содержать 2 г материала, объем вытяжки должен быть на 20 мл больше «абсорбционной емкости» пробы массой 2 г.

Приложение 2
к Инструкции 1.1. 10-12-41-2006
«Гигиеническая оценка изделий медицинского назначения, медицинской техники и материалов, применяемых для их изготовления»

ТРЕБОВАНИЯ К ДОКУМЕНТАЦИИ И ОБРАЗЦАМ, ПРЕДСТАВЛЯЕМЫМ НА ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Для проведения исследований изделия медицинского назначения должны быть представлены:

технические нормативные правовые акты и (или) паспорт на изделие и др. или сопроводительное письмо с информацией об изделии медицинского назначения;

образцы изделия.

Для проведения исследований изделия медицинского назначения иностранного производства информацию об изделии и документацию представляют на русском языке.

2. Для проведения исследований изделия медицинского назначения, вновь разработанного в Республике Беларусь или впервые поставляемого в Республику Беларусь, представляют следующую информацию и документацию.

Для проведения исследований изделия медицинского назначения, вновь разработанного в Республике Беларусь, представляют:

наименование изделия;

наименование предприятия - разработчика и предприятия - изготовителя изделия;

назначение и область применения изделия медицинского назначения с указанием характера и максимальной продолжительности контакта с организмом человека (если изделие сложное, характер контакта должен быть указан для каждой детали, узла);

перечень деталей, узлов, входящих в состав изделия, материалов, из которых они изготовлены, с указанием ГОСТов на материалы;

метод стерилизации или дезинфекции с указанием режимов;

сведения об упаковке материала, изделия: наименование упаковочных материалов;

технические нормативные правовые акты и (или) инструкцию по применению медицинского изделия;

инструкцию по приготовлению материалов типа паста-паста, паста-жидкость;

сертификат изготовителя на металлы, сплавы, керамику в случае их применения.

Для проведения исследований изделия медицинского назначения иностранного производства, впервые ввозимого в Республику Беларусь, представляют:

наименование фирмы и страны-изготовителя;

наименование организации, представляющей изделие на испытания;

информацию и документацию на изделие.

3. Для проведения исследований изделий медицинского назначения, подлежащих обязательной государственной гигиенической регистрации и сертификации, представляют следующую информацию и документацию:

наименование изделия (материала);

наименование организации, представляющей изделие на испытания;

наименование страны, фирмы, организации - изготовителя изделия;

ГОСТ, ОСТ и др. на изделие при представлении изделий отечественного производства.

4. При необходимости организация, представляющая изделие медицинского назначения на испытания, должна по запросу организации, проводящей токсикологические испытания, представить и другую информацию, необходимую для их проведения.

Приложение 3
к Инструкции 1.1. 10-12-41-2006
«Гигиеническая оценка изделий медицинского назначения, медицинской техники и материалов, применяемых для их изготовления»

ТРЕБОВАНИЯ К ОТБОРУ ОБРАЗЦОВ

1. Требования к образцам.

Образцы изделий и материалов медицинского назначения представляют на исследования в количестве, согласованном с организацией, проводящей испытания. Количество образцов зависит от объема предполагаемых исследований, назначения изделия, размера образцов, объема партии.

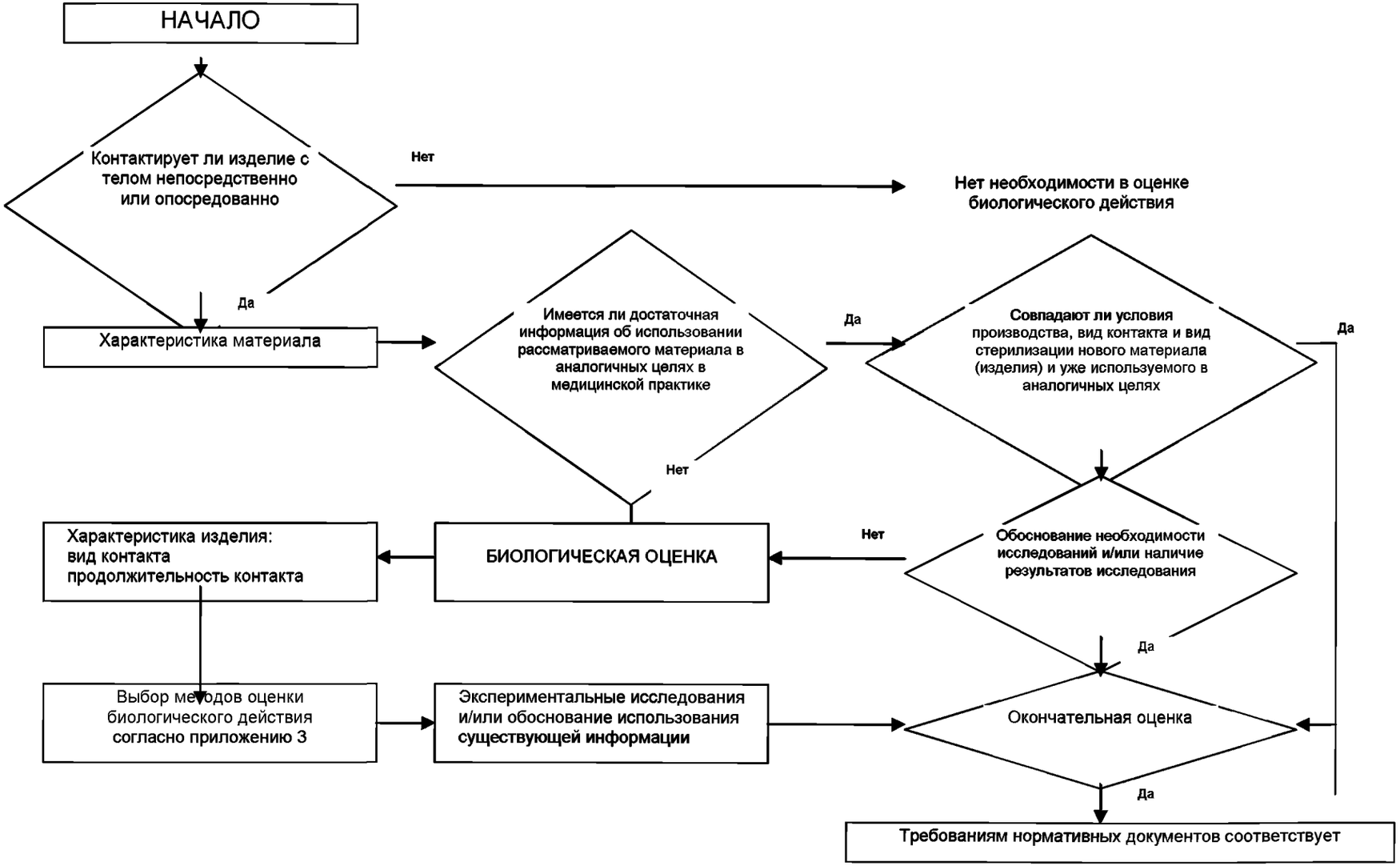
Образцы представляют в виде готового к применению изделия, упакованные с этикеткой, на которой должны быть указаны наименование изделия, наименование организации-изготовителя, дата изготовления.

Образцы изделий однократного применения, выпускаемые в стерильном виде, представляют на испытания в упакованном виде, готовом к применению. На этикетке, кроме вышеперечисленного, должны быть указаны метод и дата стерилизации изделия, срок годности изделия.

2. Отбор образцов проводится экспертом организации, проводящей исследования, в присутствии представителя заказчика. Отобранные образцы опечатываются и доставляются в испытательную лабораторию экспертом.

Приложение 4
к Инструкции 1.1.10-12-41-2006
«Гигиеническая оценка изделий медицинского назначения, медицинскої техники и материалов, применяемых для их изготовления»

СХЕМА СИСТЕМНОГО ПОДХОДА К ОЦЕНКЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ИЗДЕЛИЙ И МАТЕРИАЛОВ



Приложение 5
к Инструкции 1.1.10-12-41-2006
«Гигиеническая оценка изделий медицинского назначения, медицинской техники и материалов, применяемых для их изготовления»

МЕТОДЫ ГИГИЕНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ

Группа изделий	Вид контакта	Продолжительность контакта: I – кратковременный II – длительный III - постоянный	методы исследований											
			органолептические	санитарно-химические	цитотоксическое действие	раздражающее действие	сенсибилизирующее действие	пирогенность	гемосовместимость	имплантационный тест	генотоксичность	Общетоксическое действие: острая токсичность	подострая токсичность	субхроническая токсичность	хроническая токсичность
Изделия контактирующие с поверхностью тела (кожа, слизистые)	Кожа	I	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
		II	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
		III	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	Слизистые оболочки	I	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
		II	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-
		III	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-
	Поврежденные или подверженные опасности повреждения поверхности	I	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-
		II	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
		III	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+
Изделия контактирующие с внутренней средой организма	Мягкие ткани, непрямой кровоток	I	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-
		II	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
		III	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+
	система кровообращения	I	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-
		II	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-
		III	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+
Имплантируемые изделия	кровь, кость, мягкая ткань	II	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
		III	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+

Приложение 6
к Инструкции 1.1.10-12-41-2006
«Гигиеническая оценка изделий медицинского назначения, медицинской техники и материалов, применяемых для их изготовления»

ТЕСТ НА СТОЙКОСТЬ К КОРРОЗИИ

Проверку коррозионной стойкости изделий и материалов медицинского назначения поводят следующим образом: испытуемый образец погружают в 10%-ный раствор лимонной кислоты при температуре (20±5)°С и выдерживают в растворе в течение 5 часов, затем промывают проточной водой и кипятят в дистиллированной воде в течение 30 минут, после чего выдерживают в дистиллированной воде в течение 24 часов. Затем образец вынимают из воды, высушивают испарением и осматривают с целью выявления следов коррозии.

После исследования образец протирают сухой хлопчатобумажной тканью и осматривают на наличие следов коррозии. Любое пятно, неисчезающее после тщательного протирания, рассматривают как явную коррозию.

Приложение 7
к Инструкции 1.1.10-12-41-2006
«Гигиеническая оценка изделий медицинского назначения, медицинской техники и материалов, применяемых для их изготовления»

ПОКАЗАТЕЛИ ОЦЕНКИ БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ИЗДЕЛИЙ ОПОСРЕДОВАННОГО КОНТАКТА

Вид контакта	Показатели
с внутренней средой организма	гемолитический тест, пирогенность, острая внутрибрюшинная токсичность
с легкими	пирогенность, острая внутрибрюшинная токсичность, ирритативное действие
со слизистыми оболочками	ирритативное действие
с кожей	местно-раздражающее действие на кожные покровы
с желудочно-кишечным трактом	острая токсичность при внутрижелудочном введении

Приложение 8
к Инструкции 1.1. 10-12-41-2006
«Гигиеническая оценка изделий медицинского назначения, медицинской техники и материалов, применяемых для их изготовления»

МЕТОДИКА ИЗМЕРЕНИЯ ИЗМЕНЕНИЯ ВЕЛИЧИНЫ pH ВЫТЯЖЕК

Величина pH характеризует кислотность или основность вытяжки.

Методика измерения:

испытуемую вытяжку и контрольный раствор помещают в стеклянный стакан и измеряют величину pH вытяжки и контрольного раствора.

Обработка результатов -

изменение величины pH рассчитывают по формуле:

$\Delta pH=(pH)b-(pH)k$, где

(pH)b - pH вытяжки,

(pH)k - pH контрольного раствора.

Значение результатов определения pH округляют до десятых долей.

Приложение 9
к Инструкции 1.1.10-12-41-2006
«Гигиеническая оценка изделий медицинского назначения, медицинской техники и материалов, применяемых для их изготовления»

ПЕРЕЧЕНЬ КОНТРОЛИРУЕМЫХ ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ, МИГРИРУЮЩИХ ИЗ СТОМАТОЛОГИЧЕСКИХ КЛИНИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Наименование материала	Контролируемые показатели
Полимерные материалы и композиты, предназначенные для пломбирования кариозных полостей и зубных каналов, цементы для фиксации протезов	метилметакрилат эпихлоргидрин цинк

Приложение 10
к Инструкции 1.1.10-12-41-2006
«Гигиеническая оценка изделий медицинского назначения, медицинской техники и материалов, применяемых для их изготовления»

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕМОЛИТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ

Принцип метода определения гемолитического действия основан на разрушении эритроцитов под влиянием химических агентов и высвобождении гемоглобина.

Приготовление 10% взвеси эритроцитов:

для приготовления взвеси эритроцитов может быть использована эритроцитная масса или цитратная кровь, заготовленная на 3,9% растворе цитрата: натрия в соотношении 1:9 от двух белых крыс, ранее не используемых в токсикологических экспериментах (кровь от разных крыс необходимо заготавливать в разные пробирки). Срок хранения цитратной крови (эритроцитарной массы) - 72 ч при +4°С. Кровь (эритроцитарную массу) 5 $см^3$ центрифугировать 10 мин при 900 оборотах. Надосадочную жидкость отделить. К осадку добавить 8 $см^3$ стерильного 0,9% раствора хлористого натрия. Содержимое взболтать и центрифугировать 10 мин при 900 g. Надосадочную жидкость отделить.

Эта операция (отмывание клеток) повторяется два раза. После отмывания надосадочная жидкость должна быть прозрачна, бесцветна, не иметь следов гемолиза. Если надосадочная жидкость не отвечает указанным требованиям, эритроциты не могут быть использованы для приготовления взвеси эритроцитов.

Для получения 10% взвеси эритроцитов 1 мл осадка клеток смешивают с 9 $см^3$ 0,9% раствора хлористого натрия. Полученную взвесь эритроцитов допускается хранить не более 24 часов в холодильнике при температуре от -4 до -6°С.

Приготовление проб: контрольной и со 100% гемолизом. Контрольная проба готовится путем смешения 0,5 $см^3$ 10% взвеси эритроцитов и 5 $см^3$ 0,9% раствора хлористого натрия.

При добавлении к 0,5 $см^3$ 10% взвеси эритроцитов 5 $см^3$ дистиллированной воды происходит полное разрушение эритроцитов, что соответствует 100% гемолизу.

Контрольная проба и проба со 100% гемолизом готовится для каждого образца эритроцитной взвеси.

Ход определения.

До определения гемолитического действия к вытяжке, приготовленной на дистиллированной воде, необходимо добавить хлористый натрий из расчета 9 мг на 1 $см^3$ вытяжки для превращения дистиллированной воды в изотонический раствор для крови.

В 3 пробирки разлить по 0,5 $см^3$ 10% взвеси эритроцитов. К 0,5 $см^3$ 10% взвеси эритроцитов в каждую пробирку добавить по 5 $см^3$ вытяжки, в которую предварительно добавлен хлористый натрий до 0,9% раствора. Смесь поставить в термостат на 1 час при температуре 37°С, затем отцентрифугировать в течение 20 мин при 2000 оборотов.

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

Оптические измерения. Испытуемое изделие не обладает гемолитическими свойствами, если процент гемолиза составляет менее 2% во всех трех пробах. Если % гемолиза хотя бы одной пробы более 2%, опыт следует повторить с кровью другой крысы. При получении такого же результата опыт повторяют с повторно приготовленной вытяжкой. В случае получения аналогичного результата, исследуемая вытяжка считается гемолитически активной, и дальнейшие испытания не проводятся.

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

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

Если шкала фотоэлектроколориметра от 0 до 1,0, а оптическая плотность более 1, то необходимо раствор развести в 2 раза, затем определить, оптическую плотность и увеличить еще в 2 раза.

При проведении научных исследований для обеспечения статистической достоверности результатов необходимо опыты ставить не менее чем на 5 образцах крови.

Приложение 11
к Инструкции 1.1.10-12-41-2006
«Гигиеническая оценка изделий медицинского назначения, медицинской техники и материалов, применяемых для их изготовления»

ОЦЕНКА ИНТЕНСИВНОСТИ ЗАПАХА ОБРАЗЦОВ ИЗДЕЛИЙ

Количественная оценка в баллах	Характеристика запаха
0	Не отмечается ни одним из дегустаторов
1	Едва заметный
2	Слабый, не привлекающий внимания, но обнаруживаемый, если указать на него
3	Отчетливый, легко обнаруживаемый
4	Обращающий на себя внимание и вызывающий отрицательный отзыв
5	Настолько сильный, что вызывает неприятные ощущения

Приложение 12
к Инструкции 1.1.10-12-41-2006
«Гигиеническая оценка изделий медицинского назначения, медицинской техники и материалов, применяемых для их изготовления»

ОЦЕНКА ИНТЕНСИВНОСТИ ЗАПАХА ВЫТЯЖЕК ИЗ ИЗДЕЛИЙ

Интенсивность в баллах	Степень изменений	Определение изменений
0	Запах отсутствует	Различия не обнаружены ни одним дегустатором
1	Слабый запах	Различия заметны и установлены 50% дегустаторов
2	Заметный запах	Различия легко определяемы всеми дегустаторами
3	Сильный запах	Изменения явно заметные и вызывают отрицательный отзыв

Приложение 13
к Инструкции 1.1.10-12-41-2006
«Гигиеническая оценка изделий медицинского назначения, медицинской техники и материалов, применяемых для их изготовления»

ПЕРЕЧЕНЬ КОНТРОЛИРУЕМЫХ ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ, МИГРИРУЮЩИХ ИЗ ИЗДЕЛИЙ В МОДЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ И ВОЗДУХ

Наименование материала	Контролируемые показатели в модельных средах или воздухе.
1	2
Полимерные материалы и пластические массы на их основе (в т.ч. синтетические ткани):	
полиэтилен, полипропилен	формальдегид, ацетальдегид, метиловый, изопропиловый спирт
полистирол, в т.ч. вспененный	стирол, формальдегид
сополимер стирола с акрилонитрилом	стирол, акрилонитрил, формальдегид
сополимер стирола с метилметакрилатом	стирол, метилметакрилат, формальдегид, метиловый спирт
сополимер стирола с метилметакрилатом и акрилонитрилом	стирол, метилметакрилат, формальдегид, метиловый спирт, акрилонитрил
сополимер стирола с бутадиеном	стирол, бутадиен, ацетальдегид
поливинилхлорид	винил хлористый, бензол
пластифицированный поливинилхлорид	винил хлористый, бензол, дибутилфталат, диоктилфталат
винилацетаты	винилацетат, формальдегид, ацетальдегид
полиакрилаты	метилакрилат, метилметакрилат, формальдегид

1	2
полиорганосиликосаны (силиконы)	формальдегид, ацетальдегид, метиловый спирт
полиамиды	гексаметилендиамин, метиловый спирт, капролактам, дибутилфталат, диоктилфталат
полиуретаны	формальдегид, фенол
полиэфиры (полиэтиленоксид)	формальдегид, ацетальдегид
полипропиленоксиды	метилацетат, формальдегид, ацетон
полифениленоксид	фенол, формальдегид, метиловый спирт
полиэтилентерефталат	формальдегид, ацетальдегид, метиловый спирт, диметилтерефталат
поликарбонат	фенол
полисульфон	фенол, формальдегид
полифениленсульфид	фенол, ацетальдегид, формальдегид
при использовании фенолформальдегидных смол	фенол, формальдегид
при использовании кремнийорганических смол	формальдегид, фенол, ацетальдегид
при использовании эпоксидных смол	эпихлоргидрин, формальдегид
фторопласты	формальдегид, фтор-ион (суммарно)
фторэст	формальдегид, диоктилфталат, дибутилфталат
на основе фенолоальдегидных смол	формальдегид, ацетальдегид, фенол
на основе гликолиевой кислоты	формальдегид, метанол, этиленгликоль
полиформальдегид	формальдегид, ацетальдегид
аминопласты	формальдегид
иономерные смолы	формальдегид, цинк, метиловый спирт
эфирцеллюлозные пластмассы и бумага	формальдегид, метиловый спирт
коллаген (биополимер)	формальдегид, метиловый спирт
Ткани:	
Натуральные	формальдегид

1	2
Искусственные:	
вискозные	формальдегид, дибутилфталат, диоктилфталат
ацетатные	ацетальдегид, формальдегид, дибутилфталат, диоктилфталат
Парафины и воски	формальдегид, ацетальдегид, гексан, гептан
Стекло (в зависимости от окраски)	свинец, кадмий, бор, алюминий, (мышьяк, кобальт, хром, медь)
Металлы и сплавы:	
сталь нержавеющая	марганец, хром, кадмий, никель, свинец, железо, цинк
медь	медь
титановый сплав	титан, железо, алюминий, хром, марганец
цинк и его сплавы	цинк, железо, свинец, кадмий, медь
сплавы алюминия	алюминий, марганец, железо, медь, цинк
латунь и сплавы меди	медь, цинк, железо, свинец
Резина	формальдегид, диоктилфталат, тиурам, дибутилфталат, каптакс
Латекс натуральный	формальдегид
Латекс вулканизированный	формальдегид, тиурам, дибутилфталат, каптакс
Каучуки синтетические:	
стирольные	стирол, формальдегид
изопреновые	формальдегид, изопропиловый спирт
хлоропреновые	формальдегид
нитриловые	акрилонитрил, формальдегид

Приложение 14
к Инструкции 1.1. 10-12-41-2006
«Гигиеническая оценка изделий медицинского назначения, медицинской техники и материалов, применяемых для их изготовления»

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПИРОГЕННОСТИ

1. Принцип метода заключается в повышении температуры тела у лабораторных кроликов, вызванном внутривенной инъекцией испытуемой вытяжки.

Испытания проводят на здоровых кроликах обоего пола, не альбиносах, массой 2-3,5 кг, содержавшихся на полноценном рационе.

Каждый кролик должен находится в отдельной клетке в помещении, изолированном от шума с температурой окружающего воздуха 18-22°С (колебания температуры не должны превышать 3°С) и относительной влажностью 40-80%. При уборке клеток и взвешивании животных оберегают от возбуждения (шума и резких движений). В течение недели, предшествующей опыту, кролики не должны терять в массе, взвешивание их проводят до дачи корма не менее 3 раз через день. В течение трех суток перед испытанием у каждого подопытного кролика измеряют температуру. Измерение проводят ежедневно до дачи корма. Датчик термометра вводят в прямую кишку на глубину 7-9 см (в зависимости от массы кролика) за внутренний сфинктер на время, необходимое для достижения максимальной температуры, но не менее, чем на 5 мин. Исходная температура животных должна быть в пределах 38,5-39,5°С. Кролики с более высокой температурой для опыта не пригодны.

Кролики, впервые предназначенные для испытания, проверяются на реактивность путем внутривенного введения 10 мл/кг веса животного 0,9% стерильного непирогенного раствора хлорида натрия. В случае изменения температуры кроликов более, чем на ± 0,4°С, животное считается непригодным для опытов.

Не позднее, чем за 18 часов до опыта, кроликов переводят в помещение, в котором осуществляют испытание на пирогенность. Оно должно проводится в отдельной комнате с постоянной температурой, не отличающейся от температуры помещения, в котором кролики постоянно содержались до опыта, более чем на ±2°С, и с колебаниями во время испытания, не превышающими ±2°С.

Вечером, накануне опыта, у животных отбирают остаток корма. До и во время эксперимента животные корм не получают, воду дают без ограничения. Вытяжку проверяют на трех кроликах. Группа должна состоять из животных, разнящихся между собой по весу не более чем на 0,5 кг.

Перед введением раствора у кроликов дважды с интервалом 30 минут измеряют температуру. Различия в показаниях температуры не должны превышать ±0,2°С, в противном случае кролики для испытания не используются. Результат последнего измерения принимают за исходную температуру.

Стерильную вытяжку, приготовленную на 0,9% растворе хлорида натрия, предварительно нагретую до 37°С, в количестве 10 мл/кг массы тела кролика, вводят в ушную вену в течение двух минут, не позднее, чем через 15-30 минут после последнего измерения температуры. Для каждого кролика берут отдельные стерильные шприц и иглу. Последующие измерения температуры после внутривенного вливания вытяжки проводят 3 раза с промежутком в 1 час.

Изделие считается не пирогенным, если сумма повышений температуры у трех кроликов меньше или равна 1,4°С. Если эта сумма превышает 2,2°С, изделие считается пирогенным. В случаях, когда сумма повышений температур колеблется в пределах от 1,4 до 2,2°С, испытания повторяют дополнительно на 5 кроликах. Испытуемый раствор считается непирогенным, если сумма повышенной температуры у всех 8 кроликов не превышает 3,7°С. Если же эта сумма 3,71°С и более, изделие считается пирогенным.

Кролики, бывшие в опыте, могут быть использованы повторно, но не ранее, чем через 3 суток, и при условии, что испытуемый раствор был апирогенным. В случае, если испытуемый раствор оказался пирогенным, кролики могут быть использованы для дальнейших опытов через 2 недели. При повышении температуры у кроликов в подобных случаях на 1,2°С и более, они используются через 3 недели.

2. Для определения пирогенных свойств in vitro на клеточных или субклеточных тест-объектах используется метод реакции связывания комплемента согласно приложению Б.3 ГОСТ ИСО 10993-11-2002 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Исследование общетоксического действия».

Приложение 15
к Инструкции 1.1.10-12-41-2006
«Гигиеническая оценка изделий медицинского назначения, медицинской техники и материалов, применяемых для их изготовления»

МЕТОДИКА ИЗУЧЕНИЯ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ СВОЙСТВ IN VITRO

В исследованиях используют культуру эмбриональных фибробластов мыши, полученную из кожно-мышечной ткани эмбрионов путем дезагрегации 0,25% раствором трипсина при 37^{0}С в течение 30 минут. После удаления трипсина с помощью шприца осадок суспендируют в ростовой среде (80% среды Игла, 10 % эмбриональной сыворотки телят, 10% пуповинной сыворотки человека с добавлением антибиотиков). Суспензию пропускают через капроновый фильтр (ячейка 0,3 х 0,3 мм). Концентрацию единичных фибробластов подсчитывают в камере Горяева.

Клетки высевают в сосуды Карреля при посевной плотности 100-300 тысяч на 1 см^2 ростовой поверхности и культивируют в ростовой среде в течение 5-7 дней. После образования монослоя клеток их можно использовать в экспериментах.

Для изучения процессов роста, дифференцировки и гибели фибробластов под влиянием вредных веществ клетки снимают смесью растворов трипсина (0,25%) и версена (0,02%) в отношении 1:1 и суспендируют в ростовой среде. Клетки высевают при редкой плотности (5-7 клеток на 1 мм^2) в сосудах Карреля на специально изготовленных стеклянных вкладышах с квадратными (1х1 мм) ростовыми площадями, разделенными бороздками шириной 0,2 мм и глубиной 0,05 мм (бороздки замедляют перемещение клеток из полного квадрата в другой, что обеспечивает удобство микроскопического анализа в динамике роста субкультур). CO_2 добавляют в сосуды Карреля с помощью шприца (5% объема сосуда), сосуды герметически закупоривали резиновыми пробками и культивировали клетки при 37^{0}С.

Каждая проба выполняется в двух повторностях.

Анализ культуры клеток.

После суточного культивирования клетки анализируют с помощью инвертированного микроскопа. Производят подсчет общего количества клеток и клеток разных морфотипов в соответствии с классификацией

Байройтера [Bayreuther K. et al, 1991]. Согласно классификации, фибробласты, культивируемые in vitro так же как и фибробласты в тканях организма, не являются гомогенной популяцией, а включают семь клеточных типов необратимо дифференцирующихся один в другой и различающихся спектром белковых маркеров и плоидностью (количеством полных наборов хромосом). На последних стадиях терминальной дифференцировки плоидность увеличивается до нескольких раз. По мере продвижения клетки вдоль терминальной последовательности утрачивается способность к делению, а на последнем этапе происходит либо разрушение клетки по механизму апоптоза, либо «осколки» разрушающихся полиплоидных клеток трансформируются, то есть дают начало бессмертным линиям, включая злокачественные.

Митотические (способные к делению) фибробласты (далее - МФ) делят на три клеточных типа. К первому относятся малый веретеновидный митотический фибробласт типа I (МФI) с наибольшей пролиферативной способностью и эпителоидный (парусовидной формы). Второй - митотический фибробласт типа II (МФII) с промежуточной митотической активностью и третий - больший по размерам (по сравнению с МФII) эпителоидный митотический фибробласт типа III (МФIII) с низкой способностью к делениям. Среди постмитотических фибробластов (далее - ПМФ), полностью утративших пролиферативный потенциал, различают большой веретеновидный ПМФ IV, большой эпителоидный ПМФ V, и наибольший по размерам эпителоидный ПМФ VI.

Для учета цитогенетических повреждений и признаков апоптоза клетки высевают с посевной плотностью 20 000 клеток на 1 $см^2$. После суточного культивирования, когда клетки прикрепляются к субстрату и распластываются, в ростовую среду контрольного варианта добавляют стерильный физиологический раствор (0,9% NaCl) – 10% от объема. В опытные варианты добавляют стерильную суспензию или водный раствор исследуемого вещества в том же количестве. Через сутки культивирования при 37^0С клетки снимают смесью растворов трипсина (0,25%) и версена (0,02%) в соотношении 1:1 по объему, суспендируют в ростовой среде (90% среды Игла, 10% эмбриональной сыворотки телят с добавлением антибиотиков) и используют для приготовления мазков. Препараты окрашивают по Романовскому-Гимза и оценивают с помощью световой микроскопии. В случае сохранения жизненного потенциала культуры фиксацию материала можно продолжать в последующие сутки, для чего следует предусмотреть достаточное количество культуральных сосудов.

Оценка проводится по отдельным критериям: клеточная гибель, торможение пролиферации, различные морфологические признаки дифференцировки и гибели (признаки апоптоза). В случаях оценки

подавления клеточного роста статистическая обработка проводится с применением регрессионного анализа по логарифмической фазе роста. Оценка и сравнение пролиферативного потенциала клеток опытных и контрольных проб проводится путем подсчета количества клеток в день внесения исследуемого вещества, на вторые, пятые, восьмые, пятнадцатые сутки после внесения, с последующим вычислением кратности увеличения числа клеток МФI и МФII.

При оценке числа клеток с морфологическими повреждениями и признаками апоптоза предпочтительной является оценка по критерию хи-квадрат χ^2 в четырехклеточных таблицах. Критерием выявления отрицательного воздействия служит получение статистически достоверных различий между опытом и контролем.

При оценке данных морфологических исследований фибробластов, окрашенных по Романовскому-Гимза, учитывается соотношение клеток с признаками дифференцировки и гибели: постмитотические клетки, окрашиваемые в синий цвет, красные клетки с начальными и конечными признаками дегенерации и некроза, апоптотические тела.

Приложение 16
к Инструкции 1.1. 10-12-41-2006
«Гигиеническая оценка изделий медицинского назначения, медицинской техники и материалов, применяемых для их изготовления»

ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ КОЖИ ПРИ ИЗУЧЕНИИ МЕСТНОГО РАЗДРАЖАЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ

Оценка выраженности эритематозной реакции

Таблица 1

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

Оценка выраженности отека

Таблица 2

Оценка интенсивности	Вид животных		Оценка в баллах
	кролики	морские свинки, белые крысы	
	$ТКС_{аппл.}$ - $ТКС_{фон.}$ (в мм)		
Отсутствие	0-0,09	0-0,09	0
Слабая	0,1-0,59	0,1-0,39	1
Умеренная	0,6-1,09	0,4-0,69	2

Приложение 17
к Инструкции 1.1.10-12-41-2006
«Гигиеническая оценка изделий медицинского назначения, медицинской техники и материалов, применяемых для их изготовления»

ОЦЕНКА СИМПТОМОВ ИРРИТАТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ ВОДНЫХ ВЫТЯЖЕК НА СЛИЗИСТУЮ ОБОЛОЧКУ ГЛАЗ КРОЛИКОВ

Симптомы раздражения	Характеристика выраженности симптомов	Оценка в баллах
Гиперемия конъюнктивы и слизистой век	Отсутствие видимого покраснения, четкий сосудистый рисунок	0
	Сосуды инъецированы (расширены)	1
	Отдельные сосуды трудно различимы, легкое покраснение слизистой	2
Отек век	Отсутствие видимых изменений	0
	Слабые отеки (набухшие веки)	1
	Выраженный отек с частичным выворачиванием век	2
Выделения из глаза	Отсутствие выделений	0
	Минимальное количество в углу глаз	1
	Количество выделений увлажняет веки	2

Приложение 18
к Инструкции 1.1.10-12-41-2006
«Гигиеническая оценка изделий медицинского назначения, медицинской техники и материалов, применяемых для их изготовления»

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ НА ТЕПЛОКРОВНЫХ ЖИВОТНЫХ

Для этих целей используются беспородные белые мыши-самцы массой 18-25 г или белые крысы массой 180-200 г, прошедшие 7-дневный карантин. В опыте и контроле используют не менее, чем по 8 животных, масса их при этом не должна разниться более, чем на 10%. Допускается использовать на не более чем 6 опытных групп 1 контрольную группу животных.

Опытным животным однократно внутрибрюшинно вводится стерильная вытяжка (мышам в дозе 50 $см^3$/кг, крысам в дозе 25 $см^3$/кг), контрольным животным - стерильный изотонический 0,9% раствор хлорида натрия. Состояние животных оценивается по следующим тестам:

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

масса тела до введения вытяжки и через 24 часа, натощак;

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

взвешивание внутренних органов: печени, почек, селезенки, сердца, надпочечников с расчетом относительных коэффициентов масс внутренних органов и последующей статистической обработкой цифровых данных с использованием критерия Стьюдента t.

В случае получения достоверной разницы между опытной и контрольной группами по двум из исследуемых показателей ($p<0,05$), вытяжка из изделия считается токсичной. При обнаружении достоверного отличия по одному из исследуемых показателей или гибели опытных животных испытания следует повторить на удвоенном количестве животных (по 16 животных в контрольной и опытной группах). При гибели хотя бы одного опытного животного при повторном испытании изделие считается токсичным.

Приложение 19
к Инструкции 1.1.10-12-41-2006
«Гигиеническая оценка изделий медицинского назначения, медицинской техники и материалов, применяемых для их изготовления»

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТОКСИЧНОСТИ ПРИ МНОГОКРАТНОМ ВНУТРИБРЮШИННОМ ВВЕДЕНИИ

Опыты проводят на 40 белых крысах с массой тела 180-200 г и или 30 белых мышах с массой тела 18-22 г. Испытуемую стерильную вытяжку вводят внутрибрюшинно поочередно в правую и левую паховые области через день, всего 25 введений в дозе 10 мл/кг для мышей и 5 мл/кг для крыс.

Параллельно контрольным животным того же пола и массы тела вводят стерильный раствор, используемый в качестве экстрагента (0,9% физиологический раствор или дистиллированная вода) в той же дозе, что и вытяжки из изделий.

Наблюдение за животными проводят в динамике на протяжении эксперимента (после 5, 15, 25 введений) и спустя месяц по его окончании.

Выбор показателей интоксикации в каждом конкретном случае определяется составом исследуемого изделия и результатами санитарно-химических анализов вытяжки. Обязательными являются определения массы тела, массовых коэффициентов внутренних органов, состояния нервной системы, функции печени и почек, состава периферической крови, активности ряда специфических ферментов, состояния надпочечников.

После завершения эксперимента проводится систематизация и статистическая обработка цифрового материала, обобщение и анализ полученных данных с учетом пределов физиологических колебаний показателей лабораторных животных, степени и характера выявленных сдвигов.

Приложение 20
к Инструкции 1.1.10-12-41-2006
«Гигиеническая оценка изделий медицинского назначения, медицинской техники и материалов, применяемых для их изготовления»

ВВЕДЕНИЕ ВЫТЯЖКИ В ВЕНУ

Опыты проводят на 20 белых мышах с исходной массой тела 18-20 г. Испытуемую вытяжку, приготовленную на физиологическом растворе, вводят внутривенно в хвостовую вену в дозе 10 мл/кг ежедневно, всего 5 введений.

Контрольным животным того же пола и веса вводят физиологический раствор в той же дозе, что и вытяжки из испытуемых изделий.

По окончании эксперимента животных обследуют по показателям, характеризующим общее состояние организма и отдельных органов и систем.

Приложение 21
к Инструкции 1.1.10-12-41-2006
«Гигиеническая оценка изделий медицинского назначения, медицинской техники и материалов, применяемых для их изготовления»

ИМПЛАНТАЦИЯ ОБРАЗЦОВ ПОД КОЖУ, ВНУТРИМЫШЕЧНО, В БРЮШНУЮ ПОЛОСТЬ

Масса имплантируемого образца протеза в экспериментах вычисляется, исходя из массы протеза для человека (в мг/кг), допуская не более 10-ти кратной аггравации. Опыт проводят на беспородных крысах-самцах или самках с исходной массой тела 200-250 г. Количество животных в группе должно быть не менее 50 на один образец. Контролем служат аналогичные по массе и форме образцы заведомо биологически инертного тефлона. Дополнительная информация о материалах, применяемых в качестве положительного и отрицательного контролей приведена в Приложении А ГОСТа ИСО 10993-12-2002 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Приготовление проб и стандартные образцы» и в Приложении А ГОСТа ИСО 10993-6-2002 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Исследование местного действия после имплантации». Перед операцией все образцы стерилизуются согласно технологической документации.

В брюшную полость имплантаты вводят через разрез кожи и мышц живота под общим наркозом смесью этаминала-натрия и кетамина. Операционная полость перед наложением внутренних и внешних швов обрабатывается антибиотиками.

Подкожно образцы имплантируются двумя способами:

первый способ - при введении материалов, предназначенных для протезов твердых тканей, вырезаются узкие полоски шириной не более 1 мм и длиной 15 мм. Количество вводимых полос зависит от массы протеза (от 2 до 4 штук на 1 животное). Каждая пластинка вставляется в просвет широкой иглы, которая надевается на шприц с 3 мл 2% раствора новокаина. Игла вводятся под кожу животного, и полоска силикона выталкивается раствором новокаина резким движением поршня шприца;

второй способ имплантации под кожу используется при испытании объемных образцов, чаще округлой формы, характерной для протезов мягких тканей (например, молочной железы). В этом случае имплантаты материала вводятся через надрез кожи в подкожный или внутримышечный

карман с последующим наложением швов. Процедура проводится под общим эфирным ингаляционным наркозом или смесью этаминал-натрия и кетамина.

С целью выявления общетоксического эффекта животные с имплантатами обследуются на протяжении хронического эксперимента через 1, 3, 6, 9, 12 и 18 месяцев после операции. Оценка физиологического состояния животных проводится с использованием общепринятых тестов.

По окончании опыта животных забивают. При вскрытии проводят визуальное исследование внутренних органов и их морфологическое исследование с целью выявления патологических органных изменений.

Оценка результатов действия протезов проводится по обобщенному показателю, суммирующему число статистически достоверных отклонений показателей состояния организма подопытных животных по сравнению с контрольными.

Местная реакция тканей, непосредственно прилегающих к имплантатам, изучается в динамике: через 14, 21 день, 6, 12, 18 месяцев после операции. Для морфологических исследований берется кожа с подкожной клетчаткой вместе с образцом, фиксируется в формалине, заливается в парафин. Перед проводкой образец извлекается из тканей. Срезы толщиной 5-7 микрон окрашиваются гематоксилин-эозином и пикрофуксином по Ван-Гизон.

Регистрируется в течение процессов капсулообразования: ширина капсулы, качественный состав клеток (наличие зрелых или молодых фибробластов, присутствие макрофагов, эозинофилов, плазматических клеток, лимфоидных инфильтратов). Ткани, окружающие капсулу, исследуются с целью выявления воспалительных, сосудистых, аллергических, опухолевых процессов.

Оценка местной реакции тканей, окружающих имплантаты, сравнивается с реакцией тканей на имплантацию инертного материала. В случае удовлетворительных результатов зрелая капсула вокруг имплантата не должна значительно отличаться от капсулы, сформированной вокруг «отрицательного контроля», т.е. должна быть тонкой, состоять из плотно прилегающих друг к другу зрелых концентрических пучков коллагеновых волокон, содержать очень небольшое количество клетчатых элементов (фиброцитов, единичных лимфоцитов). В околокапсульном пространстве не должно быть выраженных воспалительных сосудистых, аллергических проявлений признаков предопухолевой пролиферации. При имплантации инертного материала полное формирование капсулы и затухание воспалительных реакций происходит к 6-месячному сроку пребывания имплантата в организме.

Приложение 22
к Инструкции 1.1.10-12-41-2006
«Гигиеническая оценка изделий медицинского назначения, медицинской техники и материалов, применяемых для их изготовления»

МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ГЕНОТОКСИЧНОСТИ

В случае, когда необходимо оценить генотоксическое действие медицинского изделия, следует провести серию тестов in vitro и in vivo. Эта серия должна включать, по крайней мере, три исследования. При этом, по меньшей мере, два из них необходимо выполнить на клетках млекопитающих - клетках мишенях. Желательно, чтобы эти тесты распространялись на три уровня генотоксических эффектов: ДНК-воздействие, генные мутации и хромосомные абберации.

Исследования медицинских изделий на генотоксичность следует осуществлять в соответствии с классификацией, за исключением изделий из негенотоксичных материалов, при условии, что все основные компоненты экстрактов, которые могут быть идентифицированы подходящими аналитическими методами, проявили себя как не обладающие генотоксичностью.

Приготовление проб.

Перед приготовлением экстрактов и началом испытаний все материалы или изделия должны быть в готовом к употреблению виде (т.е. в виде конечной продукции). Тестированию подвергают либо экстракты, либо растворенные в подходящей среде материалы. Если необходимо использовать два вида экстрагирующих сред, то одна из них может быть физиологическим раствором, а вторая, например, - раствором диметилсульфоксида, который вполне совместим с тест-системой.

Исследования in vitro.

Рекомендуется проводить краткосрочные тесты с использованием клеточных суспензий тимоцитов и цельной крови животных.

Клеточные суспензии тимоцитов желательно получать от линейных животных для стандартизации методов учета. В зависимости от требований эксперимента используют вытяжки из различных материалов, полученные в инкубационной среде. Это дает возможность готовить различные разведения в случае положительного результата при

использовании цельной вытяжки. В качестве среды можно использовать фосфатный буфер, но предпочтительней бессолевой раствор Хэнкса, не содержащий солей магния и кальция, модифицирующих процессы апоптоза. Клеточную суспензию лучше готовить путем вымывания тимоцитов из целого неповрежденного тимуса, полученного от здорового животного. Клетки вносятся после предварительного подсчета их количества в 1 мл суспензии. Число мертвых клеток учитывается при окрашивании трипановым синим. Клетки инкубируют при 37^0С. Клетки с признаками повреждения хроматина можно учитывать в сроки через 2-4 часа после начала инкубации. Через 6 часов клетки обычно гибнут и в контрольных сериях. Подбор положительного контроля на основе рекомендаций, приведенных выше.

В случае, когда условия эксперимента желательно приблизить и условиям организма человека или животных, целесообразно использовать свежую цельную кровь. Вытяжки и контрольные растворы желательно вносить в объеме не более 5% от общего объема. Инкубацию проводят в гепаринизированных пробирках в атмосфере с 5% CO_2, при 37^0С.

Сроки инкубации не более 6 часов, далее из крови готовят мазки по стандартной схеме и окрашивают по Гимза. Учитывают лимфоциты и нейтрофилы с микроядрами и признаками фрагментации ядра. Число клеток на препарат: 200 на мазках крови человека и собак, не менее 50 на мазках крови крыс и мышей. Этот метод достаточно чувствителен и хорошо воспроизводим.

Исследования in vivo.

В экспериментах с применением цитогенетических тестов лучше использовать линейных животных одного возраста и пола. В случаях, когда предполагается возможность метаболической активации, рекомендуется использовать половозрелых самцов мышей линии C57BL/6j массой около 20 г.

Выбор цитогенетических тестов определяется условиями введения в организм животных водных вытяжек или непосредственно имплантатов. При этом следует учитывать, что метафазный метод наиболее информативен в течение 12-24 часов после воздействия и в сроки не более 3-х суток, так как клетки с цитогенетическими повреждениями очень быстро элиминируются из костного мозга. Учет микроядер в полихроматофильных эритроцитах костного мозга лучше начинать не ранее 18-24 часов и не позднее 72 часов после воздействия. На мазках костного мозга можно попутно учитывать признаки программированной клеточной гибели (апоптоза) и возможные отклонения в процессах дифференцировки. Однако в отдаленные сроки от начала воздействия, когда оно приобретает хронический характер, этот тест может оказаться неэффективным. Поэтому можно дополнить исследования

микроядерными тестами с использованием клеток железистого кишечного эпителия (12-перстная кишка) и легочных тканей – альвеолоцитов II типа и тканевых макрофагов. Именно в тканевых макрофагах реализуются цитогенетические повреждения, возникшие из потенциальных повреждений ДНК, полученных в костном мозге при дифференцировке моноцитов. Дополнительную информацию дает учет микроядер и признаков апоптоза в тимоцитах. В первые часы после воздействия (4-8 час) цитогенетические повреждения в большей степени отражают повреждения ДНК. В более отдаленные сроки они отражают состояние клеточного иммунитета и сопутствующие изменению иммунологического состояния перестройки клеточных популяций в тимусе.

Метафазный метод. Мышам 0,1% раствор колхицина вводят внутрибрюшинно в объеме 0,1-0,2 мл. Через 1 час животных умерщвляют путем дислокации шейных позвонков, извлекают бедренные кости и, срезав эпифиз, вымывают костный мозг 0,56% гипотоническим раствором KCl, нагретым предварительно в термостате до 37^0C. Затем пробирку с клеточной суспензией помещают в термостат при 37^0C на 13-15 мин, далее центрифугируют (1000 оборотов, 5 мин) и добавляют фиксатор (уксусная кислота и этанол в соотношении 1:3). Фиксатор меняют трижды, через 5, 15 и 40 минут. На следующий день готовят препараты путем нанесения клеточной суспензии на чистые охлажденные предметные стекла. После окраски стекла ополаскивают чистой водой, сушат при комнатной температуре и затем анализируют. На препаратах учитывают хромосомные аберрации хроматидного и хромосомного типов. В случае длительного хранения цитогенетических препаратов в суспензии объем фиксатора должен быть 5-10 мл. Пробирки надо держать в холодильнике при температуре 3-4^0C.

Микроядерные тесты. Для приготовления мазков клетки костного мозга вымывают из бедренных костей мышей 50% эмбриональной телячьей сывороткой на фосфатном буфере (pH=7,0-7,2). Перед приготовлением мазков тимоцитов тимус взвешивают, перетирают и вымывают клетки через нейлоновую сетку в центрифужную пробирку фосфатным буфером с добавлением эмбриональной бычьей сыворотки (10%). После удаления надосадочной жидкости пипеткой переносят осадок на обезжиренное предметное стекло и делают мазок. Сразу после высыхания препаратов костного мозга и тимуса их фиксируют этиловым спиртом. Подсчитывают полихроматофильные эритроциты (далее - ПХЭ) с микроядрами: 1000 клеток одного животного. В тех же полях считают число эритроидных клеток с признаками апоптоза. Апоптоз можно учитывать и на клетках, не относящихся к эритроидному ряду.

Альвеолярные макрофаги извлекают путем бронхоальвеолярного лаважа. После забоя животных препарируют и через канюлю в разрез

трахеи вводят 1 мл 0,9% NaCl комнатной температуры на 1-2 минуты. Затем отсасывают содержимое шприцем из легких и сливают в центрифужную пробирку. Процедуру повторяют 4-5 раз, суспензию клеток центрифугируют 10 мин при 1500 об/мин. Осадок ресуспендируют в 1-2 каплях оставшейся жидкости. Препараты готовят путем размазывания капли по обезжиренному стеклу, сушат и фиксируют в смеси этанола и уксусной кислоты (3:1). На таких препаратах присутствуют практически одни макрофаги.

Препараты альвеолоцитов II готовят из легочной ткани путем ее измельчения в капле 0,9% NaCl, после разведения фильтруют через капроновую ткань в пробирку. Суспензию центрифугируют (1500 об/мин, 10 мин). Осадок ресуспендируют и готовят мазки по вышеприведенной схеме. На таких препаратах фрагменты ткани, состоящие из нескольких клеток, сохраняют свойственную альвеолоцитам II прямоугольную форму, от альвеолоцитов I типа их отличает и больший объем цитоплазмы. Подсчитывают количество клеток с микроядрами на 1000 клеток от каждого животного.

Для приготовления цитогенетических препаратов клеток кишечного эпителия выделяют 12-перстную кишку, измельчают ее ножницами в капле инактивированной эмбриональной сыворотки. Суспензию фильтруют через капроновую ткань и центрифугируют 10 минут при 1500 об/мин. После удаления надосадочной жидкости материал ресуспендируют, наносят на обезжиренное стекло и делают мазки. Препарат фиксируют в смеси этанола и уксусной кислоты (3:1) 15 минут. Для удаления слизи проводят гидролиз в однонормальной соляной кислоте (далее - 1N HCL) в течение 2-х минут при комнатной температуре, 5 минут - при 60^0C, после чего препараты охлаждают в 1N HCL при комнатной температуре и промывают дистиллированной водой. Окраску препаратов производят красителем Гимза, разведенным (1:20) дистиллированной водой. Каждая группа состоит из четырех-пяти животных, у каждого из которых подсчитывают клетки с микроядрами на 1000 цилиндрических клеток. Учет микроядер можно проводить также и на гистологических препаратах в случае проведения подобных исследований.

Все цитогенетические препараты рекомендуется окрашивать через сутки после приготовления красителем Гимза, разведенным 1:20 дистиллированной водой в течение 3-5 мин в зависимости от качества красителя.

В метафазном и микроядерном тестах на клетках костного мозга для сравнительной оценки в качестве положительного контроля рекомендуются вещества с доказанной генотоксичностью, такие как митомицин С.

Статистическую обработку при небольших (3-5) группах линейных животных лучше проводить путем оценки по критерию хи-квадрат (далее - χ^2) в четырехклеточных таблицах. При большем числе животных, особенно при использовании нелинейных животных, предпочтительным является сравнение вариационных рядов. Критерием выявления отрицательного воздействия служит получение статистически достоверных различий между опытом и контролем.

ДНК-повреждающее действие. Исследования проводят на ДНК фага λ. Контролями служат интактная ДНК и ДНК в присутствии системы метаболической активации и бензидина, вещества с доказанной генотоксичностью. Поврежденная продуктами окисления бензидина ДНК утрачивает электрофоретическую подвижность и остается на старте.

Условия проведения реакции: объем реакционной смеси 25 мкл; 0,1М цитратно-ацетатный буфер pH 5,5; пероксидаза хрена = 10^{-8}М; перекись водорода = 10^{-3}М; [ДНК фага λ] = 0,15 мкг; раствор возрастающей концентрации изучаемого вещества в диметилформамиде (далее - ДМФ). В контрольную пробу вносят бензидин в повреждающей ДНК концентрации [5×10^{-6} М]. Конечная концентрация ДМФ во всех пробах, включая контрольные, составляет 20%. В ячейках иммунологического планшета смешивают буфер, ДНК в физиологическом растворе, раствор пероксидазы и расчетное количество исследуемого вещества. Реакцию начинают добавлением перекиси водорода. Смесь инкубируют в течение часа, затем в ячейки приливают по 10 мкл смеси, состоящей из буфера, глицерина и лидирующего красителя бромфенолового синего, пробы вносят в гель (по 10 мкл на дорожку). Горизонтальный электрофорез проводят при силе тока 90 мА, напряжении 80 V в 0,8% агарозном геле с использованием 0,1 М трис-фосфатного буфера и 0,008 М ЭДТА. Интеркалирующий реагент – бромистый этидий. ДНК в геле просматривают на трансиллюминаторе и сканируют в ультрафиолетовом свете на приборе типа IMFGE MASTER VDS – CL или аналогичном.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Инструкция 1.1.10-12-41-2006 «Гигиеническая оценка изделий медицинского назначения, медицинской техники и материалов, применяемых для их изготовления»

	стр.
Глава 1 Область применения и общие положения	2-3
Глава 2 Термины и их определения.....……..	3-6
Глава 3 Подготовка образцов и приготовление вытяжек.	6-11
Глава 4 Объем и схема исследований	12-22
Глава 5 Органолептические исследования	22-24
Глава 6 Исследования показателей микробиологической чистоты и стерильности	24-25
Глава 7 Санитарно-химические исследования	25-26
Глава 8 Исследования параметров физических факторов	26
Глава 9 Исследования и оценка биологического действия	26-42
Приложение 1 Соотношение площади поверхности и (или) массы образца к объему модельной среды при экстрагировании	43
Приложение 2 Требования к документации и образцам, представляемым на исследования	44-45
Приложение 3 Требования к отбору образцов	46
Приложение 4 Схема системного подхода к оценке биологического действия изделий и материалов	47
Приложение 5 Методы гигиенических исследований изделий медицинского назначения	48
Приложение 6 Тест на стойкость к коррозии	49
Приложение 7 Показатели оценки биологического действия изделий опосредованного контакта	50
Приложение 8 Методика измерения изменения величины pH вытяжек	51
Приложение 9 Перечень контролируемых химических веществ, мигрирующих из стоматологических клинических материалов	52
Приложение 10 Определение гемолитических свойств	53-54
Приложение 11 Оценка интенсивности запаха образцов изделий	55
Приложение 12 Оценка интенсивности запаха вытяжек из изделий	56
Приложение 13 Перечень контролируемых химических веществ, мигрирующих из изделий в модельные среды и	

воздух 57-59
Приложение 14 Определение пирогенности 60-61
Приложение 15 Методика изучения цитотоксических свойств in vitro 62-64
Приложение 16 Оценка состояния кожи при изучении местного раздражающего действия 65
Приложение 17 Оценка симптомов ирритативного действия водных вытяжек на слизистую оболочку глаз кроликов 66
Приложение 18 Определение острой токсичности на теплокровных животных 67
Приложение 19 Определение токсичности при многократном внутрибрюшинном введении 68
Приложение 20 Введение вытяжки в вену 69
Приложение 21 Имплантация образцов под кожу, внутримышечно, в брюшную полость 70-71
Приложение 22 Методы изучения генотоксичности 72-76

ИНФОРМАЦИОННЫЕ ДАННЫЕ

1. Настоящая Инструкция разработана ГУ «Республиканский научно-практический центр гигиены» Министерства здравоохранения Республики Беларусь (С.М. Соколов, А.И. Котеленец, О.А. Борис, А.М. Войтович, С.Ю. Петрова);

ГУ «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья» (В.В.Гулин, П.П. Сидорович).

2. Утверждена постановлением Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь от 22 ноября № 155.

3. Введена взамен Сборника руководящих методических материалов по токсиколого-гигиеническим исследованиям полимерных материалов и изделий на их основе медицинского назначения, утвержденного начальником Управления по внедрению новых лекарственных средств и медицинской техники Министерства здравоохранения СССР 27 ноября 1985 г.

gost.e-ecolog.ru