

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель

Министра здравоохранения –

Главный государственный

санитарный врач

Республики Беларусь

_____ И.В. Гаевский

18.07.2012 г.

Регистрационный № 004-0612

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ И ОЦЕНКИ ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ
И КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ
БЕЗОПАСНОСТИ И БЕЗВРЕДНОСТИ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА
ТОВАРОВ НАРОДНОГО ПОТРЕБЛЕНИЯ

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУ «Республиканский научно-практический центр гигиены», УО «Белорусский государственный медицинский университет»

АВТОРЫ: канд. биол. наук Г.И. Эрм, канд. мед. наук Ю.А. Соболев,
д-р мед. наук, доц. Л.В. Половинкин, д-р мед. наук, проф. В.В. Шевляков,
канд. мед. наук, доц. И.П. Семенов, А.В. Буйницкая, Т.С. Студеничник

Минск 2012

НАЗНАЧЕНИЕ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Настоящая Инструкция по применению (далее – Инструкция) предназначена для оценки токсикологических и клинико-лабораторных показателей безопасности и безвредности для человека товаров народного потребления (далее – ТНП).

Настоящая Инструкция распространяется на следующие ТНП: парфюмерно-косметическую продукцию (далее – ПКП), косметические салфетки, тканевые косметические маски, полоски для депиляции, средства бытовой химии (далее – СБХ), средства личной гигиены, игрушки, одежду, обувь, ткани, лакокрасочные материалы (далее – ЛКМ), средства индивидуальной защиты дерматологические.

Инструкция предназначена для специалистов лабораторий учреждений, осуществляющих государственный санитарно-эпидемиологический надзор за безопасностью и безвредностью для человека ТНП, а также иных лабораторий, занимающихся определением и оценкой соответствующих показателей.

ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В Инструкции используются следующие термины и определения:

Аллерген – вещество или материал, который способен вызвать специфичную гиперчувствительность таким образом, что при последующем воздействии вещества или материала с аналогичной характеристикой возникает аллергический эффект.

Доза – объем, вводимый в тест-систему за один прием.

Ирритативное действие – способность ПКП вызывать раздражение слизистой оболочки глаз.

Исследуемый материал – материал, изделие, его часть или компонент, пробу которых подвергают биологическому или химическому испытанию.

Испытуемая проба – экстракт или порция исследуемого материала, которую подвергают биологическому или химическому испытанию.

Контрольная проба – порция раствора, приготовленная так же, как и идентичный раствор, используемый для подготовки исследуемых образцов, предназначенная для определения фонового ответа растворителя.

Отек – увеличение объема ткани вследствие избыточного накопления жидкости в органах, внеклеточных тканевых пространствах организма.

Провокационная проба – процесс, следующий за фазой индукции, в котором оценивается иммунологический эффект последующих воздействий индуцируемого материала либо вещества на организм.

Раздражение – локализованный неспецифический воспалительный ответ на однократное, повторное или продолжительное применение вещества/материала.

Раздражитель – агент, производящий раздражение.

Растворитель – материал или вещество, используемое для смачивания, разбавления, суспензирования, экстрагирования или растворения материала испытуемого вещества (например, химикат, наполнитель, среда и т.д.).

Сенсибилизирующее действие – действие, вызванное явлением повышенной чувствительности организма человека к воздействию химических веществ и ведущее к развитию аллергических заболеваний, оказывающее вредное воздействие на окружающую среду.

Эритема – покраснение кожи или слизистой оболочки.

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Настоящая Инструкция устанавливает требования к следующим методам определения и оценки токсикологических и клинико-лабораторных показателей безопасности и безвредности для человека ТНП: определение индекса местного раздражающего кожу действия, индекса ирритативного действия на слизистые оболочки глаз, раздражающего действия и индекса сенсибилизирующего действия.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ И ОЦЕНКА ИНДЕКСА МЕСТНОГО РАЗДРАЖАЮЩЕГО КОЖУ ДЕЙСТВИЯ

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

Лабораторные животные.

В качестве лабораторных используются следующие виды животных (перечислены в порядке снижения чувствительности их кожи и близости по морфофункциональным признакам к человеческой):

морские свинки (альбиносы или с крупными белыми пятнами на туловище) массой 300-450 г;

кролики (альбиносы или светло-серой масти) массой 2000-3500 г;

белые крысы массой 180-220 г.

Содержание животных должно соответствовать требованиям Санитарных правил и норм 2.1.2.12-18-2006 «Устройство, оборудование и содержание экспериментально-биологических клиник (вивариев)», утвержденных постановлением № 131 Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь от 31.10.2006 г..

Подготовка к испытаниям

Формируется однородная по массе (разница не более 10%), поведению и с нормальным состоянием шерстного покрова и кожи группа в количестве не менее пяти животных, предпочтительно самок.

Для каждого испытуемого образца и для контрольной пробы за 1 сут до

эксперимента на боковых поверхностях туловища лабораторных животных выстригается (ножницами или электромашинкой) шерсть в виде кожного «окошка» площадью: у кроликов – 3x5 см, у морских свинок – 2x3 см, у крыс – 2x2 см. Между кожными «окошками» шерстный покров должен составлять границу шириной не менее 1 см. Применение депиляторов недопустимо. Пригодны для испытаний только кожные «окошки» без видимых повреждений.

Из поступивших на испытания образцов одного наименования и названия (не менее двух единиц) составляют объединенную равнопропорциональную пробу общим весом (объемом) не менее 10 г (см³), а средств ухода за губами и полостью рта, косметических средств для губ – не менее 25 г (см³). Из образцов твердой консистенции перед смешиванием готовят 50% растворы или суспензии, используя в качестве растворителя дистиллированную воду. Объединенную пробу тщательно перемешивают.

Проведение испытаний

Испытания проводятся в течение трех дней открытым аппликационным способом путем ежедневного равномерного нанесения на кожные «окошки» испытуемой продукции из расчета 0,02 г (мл) на 1 см² (в жидком виде – пипеточным дозатором, в пастообразном или суспензионном виде – переносятся с подложки шпателем), аккуратно втирая пробу в поверхность кожного «окошка» стеклянной палочкой. На контрольные кожные «окошки» аналогично наносится дистиллированная вода в том же количестве. Допускается постановка на одном лабораторном животном одновременно нескольких проб при расстоянии между «окошками» не менее 1 см.

Ежедневная экспозиция составляет 4 ч, а для продуктов разового применения – 15 мин. На это время животные фиксируются в индивидуальных домиках (для исключения слизывания или механического снятия вещества с кожи) в условиях температуры окружающей среды 17-25 °С.

По окончании экспозиции ватным тампоном, смоченным в растворителе, проводится обработка опытных и контрольных кожных «окошек» – смыв остатков веществ. Манипуляция проводится аккуратно, не вызывая повреждения кожи, не менее двух раз, после этого сухим тампоном участок кожи осушается. Растворитель, применяемый для смыва, должен обладать способностью растворять испытуемое вещество, быть безвредным для кожи и в целом для организма. В основном используется теплая вода с детским мылом, для маникюрных лаков – ацетон, для красящих средств – 20% этиловый спирт.

Через 24 ч после заключительной аппликации на опытных и контрольных участках определяется функциональное состояние кожи: эритематозная реакция – визуально по четкости и выраженности тона гиперемии, а также толщина кожной складки (ТКС), измеряемая микрометром до опыта (ТКС_{фон}) и через 24 ч (ТКС_{аппл}). Процедура измерения ТКС: животное фиксируется руками, кожа захватывается пальцами рук по обеим сторонам кожного «окошка» и формируется кожная складка. Измерительные плоскости микрометра устанавливаются таким образом, чтобы они полностью заходили за край складки в середине кожного «окошка», микровинт вращается за трещотку,

сдвигая измерительные плоскости, до появления 3 щелчков. Затем обратным вращением микровинта уменьшается зажим и измерение аналогично повторяется еще дважды. Результат последнего измерения учитывается с точностью до 0,01 мм.

Обработка и оценка результатов

Оценка функционального состояния кожи на опытных и контрольных участках по интенсивности эритематозной реакции и по величине отека (нарастанию толщины кожной складки) проводится в баллах согласно табл. 1, 2.

Таблица 1

Оценка выраженности эритематозной реакции

Визуальная оценка интенсивности эритемы	Оценка в баллах
Отсутствие эритемы	0
Слабая (розовый тон)	1
Умеренно выраженная (розово-красный тон)	2
Выраженная (красный тон)	3
Резко выраженная (ярко-красный тон)	4

Таблица 2

Оценка выраженности отека

Интенсивность отека	Вид животных		Оценка в баллах
	Кролики	Морские свинки, белые крысы	
	(ТКС _{аппл} – ТКС _{фон}), мм		
Отсутствие реакции	0-0,09	0-0,09	0
Слабая реакция	0,1-0,59	0,1-0,39	1
Умеренная реакция	0,6-1,0	0,4-0,69	2
Выраженная реакция	1,1-2,01	0,7-1,01	3
Резко выраженная реакция	>2,1	>1,1	4

Индекс местного раздражающего кожную реакцию действия (I_{cut}) в баллах вычисляют по формуле:

$$I_{cut} = ([(R+T)_o - (R+T)_k]_1 + [(R+T)_o - (R+T)_k]_2 + \dots + [(R+T)_o - (R+T)_k]_n) / n,$$

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

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

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

n – количество животных в группе.

При испытании местного действия продуктов, которые могут окрашивать кожу (некоторые водостойкие средства декоративной косметики, средства для

окраски волос, лаки для ногтей и другие) оценка функционального состояния кожи проводится только по выраженности отека. В этом случае индекс местного раздражающего кожу действия (I_{cut}) в баллах вычисляется по формуле:

$$I_{cut} = ((T_o - T_k)_1 + (T_o - T_k)_2 + \dots + (T_o - T_k)_n) / n.$$

За результат испытания каждого образца принимают среднее арифметическое результатов определения разницы между суммами оценивающих величин эритемы и (или) отека в баллах на соответствующем опытном и контрольном участках кожи каждого животного с доверительной границей (L) (Приложение А к настоящей Инструкции) при уровне вероятности $p = 0,95$ (Приложение Б к настоящей Инструкции).

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

ОПРЕДЕЛЕНИЕ И ОЦЕНКА ИНДЕКСА ИРРИТАТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ НА СЛИЗИСТЫЕ ОБОЛОЧКИ ГЛАЗ

1. 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 изучаемой продукции, что адекватно характеризует опасность ее действия на слизистые оболочки и другие органы (рот, верхние дыхательные пути, пищеварительный тракт).

2. Нецелесообразны определение и оценка показателя ирритативного действия на слизистые оболочки глаз вследствие заведомого наличия раздражающего слизистые оболочки действия, следующих ТНП:

материал и (или) готовый продукт, вызывающий сильное раздражение кожи;

материал и (или) готовый продукт, рН которого ≤ 2 или $\geq 11,5$;

продукция, содержащая этиловый спирт и/или органические растворители в концентрации более 25% по объему, используемая без разведения;

лаки для ногтей (кроме лаков для ногтей на водной основе), средства для отбеливания и наращивания ногтей;

дезодоранты, дезодоранты-антиперспиранты, антиперспиранты;

окислительные краски для волос, средства для осветления и мелирования волос;

средства для химической завивки и средства для выпрямления волос на основе тиоловых соединений;

средства для депиляции на основе тиогликолевой кислоты;

соли для ванн;
100% эфирные масла;
средства для отбеливания зубов, содержащие перекись водорода или другие компоненты, выделяющие перекись водорода, включая перекись карбамида и перекись цинка, с концентрацией перекиси водорода (в качестве ингредиента или выделяемой) 0,1-6,0%;
средства для автозагара;
средства, содержащие в составе абразивные включения;
средства для укладки волос пленкообразующие, воски, пасты.

3. Лабораторные животные

В качестве лабораторных животных используются кролики массой 2000-4000 г. или морские свинки массой 250-500 г.

Требования по содержанию и подбору лабораторных животных см. выше (гл. 4).

Подготовка к испытаниям

Формируется группа лабораторных животных в числе не менее трех особей любого пола, желательна не альбиносов.

Готовятся дозы из объединенных проб испытуемого ТНП в соответствии с требованиями настоящей Инструкции (см. гл. 4). Навески по 0,05 г (для кроликов) или 0,025 г (для морских свинок) взвешиваются на лабораторных весах (допустимая погрешность + 5%).

Для ПКП вязкой консистенции готовится навеска на бумажных подложках, твердой консистенции – в стаканчиках. Из твердых, порошкообразных образцов готовятся 50% растворы или суспензии.

Для СБХ готовятся концентрации согласно инструкции по применению к соответствующей продукции.

В качестве растворителя используется дистиллированная вода с рН 5,4-6,6.

Из косметических салфеток, средств личной гигиены, игрушек, одежды, обуви, тканей готовится вытяжка в дистиллированную воду при соотношении площади образца (см²) к объему дистиллированной воды (см³) 1:2, выдерживая пробы в течение 24 ч при 37°С;

Проведение испытаний

В нижний конъюнктивальный свод правого глаза каждого лабораторного животного однократно вносится (инсциллируется) пипеточным дозатором жидкий испытуемый образец в нативном виде в количестве по 0,05 см³ (кролики) или 0,025 см³ (морские свинки). Навески продукции вязкой консистенции, порошкообразные или предварительно измельченные твердые переносятся с подложки глазным шпателем или засыпаются на слизистую оболочку свода глаза при оттягивании нижнего века. В левый глаз (контрольный) аналогично в той же дозе вносится дистиллированная вода.

Визуальное наблюдение за состоянием слизистой оболочки и конъюнктивы глаз лабораторных животных с регистрацией признаков раздражения слизистой оболочки (блефароспазм, птоз, слезотечение, инъекции сосудов, отек век) и их выраженности проводится через 24 ч после

внесения образца ТНП.

Обработка и оценка результатов

Характеристика выраженности симптомов раздражения слизистой оболочки опытного и контрольного глаз и их оценка в баллах представлены согласно табл. 3.

Таблица 3

Оценка симптомов ирритативного действия испытуемого образца на слизистые оболочки глаза лабораторного животного

Симптомы раздражения		Характеристика выраженности симптомов	Оценка, балл
А	Гиперемия конъюнктивы	Отсутствие видимой гиперемии, четкий сосудистый рисунок	0
		Сосуды инъецированы (расширены)	1
		Отдельные сосуды трудно различить, легкое покраснение слизистой оболочки	2
		Диффузное глубокое покраснение	3
Б	Отек век	Отсутствие отека	0
		Слабый отек (набухшие веки)	1
		Выраженный отек с частичным выворачиванием век	2
		В результате отека глаз закрыт наполовину	3
		В результате отека глаз закрыт полностью	4
В	Выделения из глаза	Отсутствие выделений	0
		Минимальное количество к углу глаза	1
		Количество выделений увлажняет веки	2
		Количество выделений увлажняет веки и окружающие ткани	3

Индекс ирритативного действия испытуемого образца на слизистую оболочку глаза (I_{ir}) в баллах вычисляют по формуле:

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

где R – выраженность гиперемии в баллах;

T – выраженность отека в баллах;

B – выраженность выделений в баллах;

0 – результаты суммарной оценки состояния слизистой оболочки опытного глаза;

k – результаты суммарной оценки состояния слизистой оболочки контрольного глаза;

$1, \dots, n$ – порядковый номер животного;

n – количество животных в группе.

За результат испытания принимают среднее арифметическое результатов определения разницы между суммами оценивающих величин гиперемии,

отека и выделений в баллах на опытном и контрольном глазах у каждого животного с доверительной границей (L) (Приложение А) при уровне вероятности $p = 0,95$ (Приложение Б настоящей Инструкции).

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

ОПРЕДЕЛЕНИЕ И ОЦЕНКА РАЗДРАЖАЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ И ИНДЕКСА СЕНСИБИЛИЗИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ

Содержащиеся в ТНП высокомолекулярные соединения при контакте с кожей и слизистыми оболочками обычно не представляют реальной аллергоопасности. Однако многие низкомолекулярные средства и ингредиенты (особенно красители, отдушки, стабилизаторы, бактерицидные вещества и другие) способны к трансдермальному проникновению и образованию (за счет активных химических детерминант) конъюгатов с аутобелками организма, что может индуцировать гиперчувствительность замедленного и (или) немедленного типов к этим веществам и их содержащим. Поэтому необходима оценка сенсibilизирующего действия и прогнозирование аллергоопасности изучаемых образцов при контакте с кожей.

Раздражающее действие и индекс сенсibilизирующего действия определяются на привлекаемых волонтерах постановкой закрытой эпикутанной «лоскутной» пробы или открытой эпикутанной «капельной» пробы.

Нецелесообразны определение и оценка индекса сенсibilизирующего действия вследствие заведомого наличия раздражающего действия на кожные покровы и неосуществимости адекватной оценки возможного сенсibilизирующего действия, следующих ТНП:

материал и (или) готовый продукт, вызывающий сильное раздражение кожи;

материал и (или) готовый продукт, рН которого ≤ 2 или $\geq 11,5$.

Объекты наблюдения

В испытаниях участвуют волонтеры в возрасте старше 18 лет, давшие согласие и не имеющие противопоказаний со стороны здоровья.

Подготовка к испытаниям

Формируется группа не менее пяти человек, отбираемых в соответствии с условиями и требованиями безопасности при определении раздражающего влияния и индекса сенсibilизирующего действия на волонтерах в соответствии с Приложением В настоящей Инструкции.

Изготавливаются четырехслойные марлевые тампоны размером 1x1 см, накладки из полиэтиленовой пленки размером 2 x 2 см.

Готовятся дозы испытуемых ТНП, взвешивание производится на

лабораторных весах (допустимая погрешность + 5%) по 0,05 г изделий вязкой консистенции (непосредственно на марлевых тампонах), по 0,1 г продукта твердой консистенции (в стаканчиках), из которых готовятся 50% растворы, эмульсии или суспензии. Из спиртосодержащих продуктов готовятся двойные объемные водные разведения в соотношении 1:1; из моющих средств для тела и волос – 10% водные растворы. В качестве растворителя используется дистиллированная вода. Приготовленные растворы или жидкие ТНП дозируются по 0,05 см³ на марлевые тампоны, размещенные на полиэтиленовых накладках.

Для СБХ готовятся концентрации согласно инструкции по применению к соответствующей продукции.

В качестве растворителя используется дистиллированная вода с рН=5,4-6,6.

Из косметических салфеток, тканевых косметических масок, полосок для депиляции, средств личной гигиены, игрушек, одежды, обуви, тканей готовится вытяжка в дистиллированную воду при соотношении площади образца (см²) к объему дистиллированной воды (см³) 1:2, выдерживая пробы в течение 24 ч при 37°С.

Пробоподготовка ЛКМ проводится путем их равномерного нанесения на химически инертную поверхность – стеклянные пластины размером 5 см x 5 см с последующим полным отверждением в термостате при температуре 40°С в течение периода времени, указанного в рекомендациях предприятий-производителей. Допускается использование иных температурных режимов в соответствии с технологией применения ЛКМ. Далее готовится вытяжка в дистиллированную воду при соотношении площади образца (см²) к объему дистиллированной воды (см³) 1:2, выдерживая пробы в течение 24 ч при 37°С.

Испытания закрытой эпикутанной «лоскутной» пробы

Постановка закрытой эпикутанной «лоскутной» пробы включает первичную сенсibilизирующую и вторичную провокационную аппликации. Первичная аппликационная проба выполняется наложением на кожу внутренней поверхности предплечья и/или плеча волонтера (после обработки этиловым спиртом) марлевого тампона с дозой испытуемого продукта, покрытого полиэтиленовой накладкой, фиксацией пробы к коже полосками лейкопластыря или бинтованием. Контрольная проба с дистиллированной водой выполняется аналогично опытной. Допускается постановка у одного волонтера одновременно нескольких закрытых эпикутанных «лоскутных» проб при расстоянии между ними не менее 2 см.

Первичная аппликация через 24 ч снимается, смываются остатки вещества с кожи опытного и контрольного участков струей теплой воды с туалетным мылом или ватным тампоном с растворителем (20% этиловый спирт) и через 1 ч регистрируется функциональное состояние кожи на месте аппликации (по эритематозной реакции).

При возникновении у волонтера в период аппликационной экспозиции негативных клинических симптомов раздражения (ощущение зуда, жжения, болезненности) даже слабой (переносимой) интенсивности со стороны опытного

участка кожи проба немедленно снимается. В этом случае, а также при определении на опытном участке кожи эритемы после первичной аппликации (при отсутствии таковой на контрольном) первичная аппликация у конкретного волонтера повторяется на другом участке кожи со снижением концентрации испытуемого продукта не менее чем в два раза. В случае появления в процессе и после завершения повторной первичной аппликации субъективных симптомов раздражения и (или) эритематозной реакции кожи только у одного волонтера (с повышенной чувствительностью к данному изделию) он исключается из дальнейших исследований. При регистрации негативных проявлений у двух и более лиц дальнейшие испытания не проводятся и делается вывод о том, что он обладает раздражающим действием на кожу (условное обозначение $I_{cut} = 1$ балл).

При отсутствии субъективных симптомов или объективных признаков раздражения ($I_{cut} = 0$ баллов) после первичной аппликации аналогично рядом с предыдущей (на расстоянии не менее 2 см) на «чистом» участке кожи ставится на 1 сут вторичная аппликация с тем же продуктом, а также контрольная проба с дистиллированной водой (на том же первичном участке кожи).

Возникновение у одного или нескольких волонтеров в период проведения вторичной аппликации клинических симптомов зуда, жжения, болезненности, в т. ч. на кожных участках первичной аппликации, свидетельствует о развитии немедленного типа гиперчувствительности. Опыт с испытуемым образцом немедленно прекращается, учитываются результаты по выраженности клинических симптомов и дальнейшие испытания не проводятся.

Через 1 (после обработки), 24 и 48 ч после суточной аппликационной экспозиции одновременно на участках вторичной и первичной аппликаций испытуемого изделия и контрольной пробы визуально регистрируется функциональное состояние кожи (интенсивность эритематозной реакции, наличие первичных высыпаний), а также учитываются негативные и субъективные клинические симптомы (зуд, жжение, болезненность) и их выраженность.

Проведение испытаний открытой эпикутанной «капельной» пробы

Открытая эпикутанная «капельная» проба предназначена для продуктов периодического и разового применения, красящих, с возможным раздражающим кожу действием. Ежедневная экспозиция составляет от 15 мин до 2 ч в зависимости от ингредиентного состава, назначения, условий применения.

Постановка открытой «капельной» эпикутанной пробы включает первичную сенсibilизирующую и вторичную провокационную аппликации. Первичная аппликационная проба выполняется путем нанесения на кожу внутренней поверхности предплечья и/или плеча волонтера (после обработки этиловым спиртом) дозы испытуемого продукта. Контрольная проба с дистиллированной водой выполняется аналогично опытной. Допускается постановка у одного волонтера одновременно нескольких открытых эпикутанных «капельных» проб при расстоянии между ними не менее 2 см.

Первичная аппликация через определенный экспертом период времени смывается с кожи опытного и контрольного участков струей теплой воды с

туалетным мылом или ватным тампоном с растворителем (20% этиловый спирт). Через 1 ч регистрируется функциональное состояние кожи на месте аппликации (по эритематозной реакции).

При возникновении у волонтера в период аппликационной экспозиции негативных клинических симптомов раздражения (ощущение зуда, жжения, болезненности) даже слабой (переносимой) интенсивности со стороны опытного участка кожи проба немедленно смывается. В этом случае, а также при определении на опытном участке кожи эритемы после первичной аппликации (при отсутствии таковой на контрольном) первичная аппликация у конкретного волонтера повторяется на другом участке кожи со снижением концентрации испытуемого продукта не менее чем в 2 раза. В случае появления в процессе и после завершения повторной первичной аппликации субъективных симптомов раздражения и (или) эритематозной реакции кожи только у одного волонтера (с повышенной чувствительностью к данному изделию) он исключается из дальнейших исследований. При регистрации негативных проявлений у двух и более лиц дальнейшие испытания не проводятся и делается вывод о том, что он обладает раздражающим действием на кожу (условное обозначение $I_{cut} = 1$ балл).

При отсутствии субъективных симптомов или объективных признаков раздражения после первичной аппликации аналогично рядом с предыдущей (на расстоянии не менее 2 см) на «чистом» участке кожи ставится на 24 ч вторичная аппликация с тем же продуктом, а также контрольная проба с дистиллированной водой (на том же первичном участке кожи). Возникновение хотя бы у одного волонтера в период проведения вторичной аппликации клинических симптомов зуда, жжения, болезненности, в т. ч. на кожных участках первичной аппликации, свидетельствует о развитии немедленного типа гиперчувствительности. Опыт с испытуемым образцом немедленно прекращается, учитываются результаты выраженности клинических симптомов, а дальнейшие испытания не проводятся.

Через 1 (после обработки), 24 и 48 ч после 24-часовой аппликационной экспозиции одновременно на участках вторичной и первичной аппликаций испытуемого изделия и контрольной пробы визуально регистрируется функциональное состояние кожи (интенсивность эритематозной реакции, наличие первичных высыпаний), а также учитываются негативные и субъективные клинические симптомы (зуд, жжение, болезненность) и их выраженность.

Обработка и оценка результатов

Оценка раздражающего действия на кожу на опытных и контрольных участках по интенсивности эритематозной реакции и величине отека проводится в баллах согласно настоящей Инструкции (гл. 5).

Сенсибилизирующее действие после провокационной вторичной аппликации оценивается в баллах согласно табл. 4.

Таблица 4

Оценка сенсибилизирующего действия при контакте с кожей человека испытуемой продукции

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

Индекс сенсibilизирующего действия (I_s) испытуемого ТНП в баллах вычисляется по формуле

$$I_s = ((H_0 - H_k)_1 + (H_0 - H_k)_2 + \dots + (H_0 - H_k)_n) / n,$$

где H – выраженность объективных и субъективных симптомов гиперчувствительности в баллах на опытном (о) и контрольном (к) участках кожи;

1, 2, ..., n – порядковый номер волонтера;

n – число волонтеров в группе.

При оценке сенсibilизирующего действия испытуемого образца ТНП учитывают наибольший результат I_s за время наблюдения.

За результат испытаний образца ТНП принимают среднее арифметическое результатов определения разницы выраженности объективных и субъективных симптомов гиперчувствительности в баллах на опытном и контрольном участках кожи доверительной границей (L) при уровне вероятности $p = 0,99$ (Приложение Б настоящей Инструкции).

Сенсibilизирующее действие у испытуемого образца ТНП при контакте с кожей отсутствует (условное обозначение $I_s = 0$ баллов), если значение индекса равно нулю или его сумма с величиной доверительной границы менее одного балла ($I_s + L < 1$).

Образец ТНП обладает сенсibilизирующим действием и потенциально аллергоопасен (условное обозначение $I_s = 1$ балл), если сумма значения индекса и величины доверительной границы равна или превышает 1 балл ($I_s + L \geq 1$).

Алгоритм расчета
доверительной границы случайной погрешности измерения

А.1 Доверительные границы (L) случайной погрешности измерения находят по формуле

$$L = t * S_{\bar{x}},$$

где t – коэффициент Стьюдента, который в зависимости от доверительной вероятности P и числа результатов наблюдений n (количество животных в эксперименте) находят по таблице Приложения Б;

$S_{\bar{x}}$ – средняя ошибка средней арифметической, рассчитывают по формуле

$$S_{\bar{x}} = \frac{\sigma}{\sqrt{n}},$$

где σ – среднее квадратическое отклонение результатов измерения;
 n – число результатов наблюдений.

А.2 Среднее квадратическое отклонение результатов измерения оценивают по формуле

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}},$$

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

Приложение Б

Значение коэффициента t для случайной величины выборки, имеющей распределение Стьюдента с $n-1$ степенями свободы

$n-1$	$p=0,95$	$p=0,99$	$p=0,999$
3	3,18	5,84	12,94
4	2,78	4,60	8,61
5	2,57	4,03	6,86
6	2,45	3,71	5,96
7	2,37	3,50	5,41
8	2,31	3,36	5,04
9	2,26	3,25	4,78
10	2,23	3,17	4,59
11	2,20	3,11	4,44
12	2,18	3,06	4,32
13	2,16	3,01	4,22
14	2,15	2,98	4,14
15	2,13	2,95	4,07

Условия и требования безопасности при определении раздражающего действия и индекса сенсibiliзирующего действия

Требования к персоналу испытательной лаборатории

Персонал, непосредственно участвующий в проведении испытаний раздражающего действия и индекса сенсibiliзирующего действия на волонтерах, должен в совершенстве знать методики их выполнения, возможные негативные проявления и осложнения (клиническую симптоматику), владеть приемами и способами оказания экстренной медицинской помощи.

Требования к отбору волонтеров

К испытаниям привлекаются лица не моложе 18 лет, добровольно изъявившие согласие участвовать в них, на основе двустороннего соглашения.

К испытаниям в качестве волонтеров не допускаются лица, имеющие следующие противопоказания со стороны здоровья:

- любые нозологические формы заболеваний в острой форме и хронические заболевания в стадии обострения, а также в период реконвалесценции;
- любые хронические заболевания кожи;
- хронические заболевания печени;
- хронические заболевания сердечно-сосудистой системы и бронхолегочного аппарата с выраженной недостаточностью функции;
- органические заболевания центральной нервной системы со стойкими выраженными нарушениями функции, психические заболевания;
- любые аутоиммунные и аллергические заболевания;
- непереносимость конкретных наименований средств и препаратов;
- беременность и лактация.

Требования к условиям безопасного проведения испытаний

Ответственное за испытание лицо должно проинформировать волонтеров о возможных негативных проявлениях, проинструктировать о порядке выполнения испытаний, соблюдении способа применения испытуемых образцов, мерах предосторожности и поведении при возникновении негативных проявлений.

Определение и оценка сенсibiliзирующего действия должны выполняться в строгом соответствии с методикой, особенно в части соблюдения доз и концентрации образцов, учета и оценки результатов аппликационных проб.

При проведении испытаний следует соблюдать определенные меры предосторожности, в т. ч.:

- испытания немедленно прекращают при возникновении у волонтера негативных клинических симптомов – зуда, жжения, болезненности, отека, слезотечения и т.п. или объективных проявлений со стороны кожи и слизистых оболочек – эритематозные реакции, высыпания и т.п.;

- при возникновении негативных проявлений остатки испытуемого продукта с участков их приложения тотчас удаляют путем смыва под проточной теплой водой с туалетным мылом или тампоном с соответствующим безвредным растворителем (60% этиловый спирт, ацетон).

При возникновении у волонтеров негативных последствий испытаний необходимо оказать неотложную медицинскую помощь:

- в случае появления на участках кожи негативных проявлений (эритема, высыпания, отечность) следует назначить местно мази, содержащие глюкокортикостероиды (фторокорт, синалар, лоринден и т.п.);

- при возникновении объективных симптомов, выходящих за границы аппликационных проб или зоны непосредственного применения испытуемого образца, следует назначить внутрь антигистаминные препараты (фенкарол, супрастин и т.п.);

- в случае необходимости (возникновение крапивницы, отека Квинке и т.п. обширных осложнений) пострадавшего необходимо сопроводить (направить) в соответствующее лечебно-профилактическое учреждение;

- в случае возникновения общих симптомов анафилактического шока (жалобы на чувство жара, слабость, головокружение, тошноту, тяжесть и боли в голове, за грудиной, в животе, затрудненное дыхание; объективно: бледность, цианоз губ, заторможенность, холодный пот, одышка, потеря сознания и т.п.) следует немедленно вызвать скорую медицинскую помощь, уложить пострадавшего на твердую поверхность на спину, приподнять ноги, поместить холод на место нанесения ТНП; ввести внутримышечно в несколько точек (в т. ч. по возможности выше места аппликации) по 0,2 мл 0,1% адреналина (общая доза до 1 мл), а также внутримышечно 2 мл 2% супрастина и 2 мл 0,1% димедрола.

Для оказания неотложной медицинской помощи испытательная лаборатория должна иметь аптечку, укомплектованную в достаточном количестве средствами смыва остатков веществ (60% этиловый спирт, ацетон), лекарственными препаратами (антигистаминные, кортикостероидные и т.п.).

Ответственность за соблюдение условий и требований безопасного проведения испытаний с привлечением волонтеров возлагается на ответственного исполнителя работы по оценке ТНП. Контроль над выполнением требований настоящей Инструкции осуществляет руководитель испытательной лаборатории (центра).