

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель Министра –
Главный государственный
санитарный врач
Республики Беларусь


С.В.Нечай
« 14 » _____ 2025 г.

Регистрационный № 032-НШ

**АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ МЕТОД *IN VITRO* ОПРЕДЕЛЕНИЯ
РАЗДРАЖАЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ НА СЛИЗИСТЫЕ ОБОЛОЧКИ ГЛАЗ
ТОВАРОВ БЫТОВОЙ ХИМИИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

Государственное учреждение «Республиканский центр гигиены,
эпидемиологии и общественного здоровья»

АВТОРЫ:

канд. биол. наук Эрм Г.И., д-р мед. наук, профессор
Шевляков В.В., Баранов С.А., канд. мед. наук Богданов Р.В., Земцова В.О.

Минск, 2024

ГЛАВА 1 ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

1. В настоящей инструкции по применению (далее – Инструкция) изложен альтернативный метод *in vitro* определения раздражающего действия на слизистые оболочки глаз товаров бытовой химии с использованием хориоаллантоисной мембраны куриного эмбриона.

2. Настоящая Инструкция может быть использована в комплексе медицинских услуг, направленных на медицинскую профилактику заболеваний и патологических состояний, ассоциированных с неблагоприятным воздействием товаров бытовой химии.

3. Настоящая Инструкция вступает в силу с даты ее утверждения.

4. Для целей настоящей Инструкции используются следующие термины и их определение:

гиперемия – увеличение кровенаполнения в каком-либо участке периферической сосудистой системы;

испытуемая проба – подготовленная проба из образца;

контрольная проба – проба, используемая для сравнения с испытуемой пробой;

растворитель – вещество, используемое для разбавления, суспензирования, экстрагирования или растворения пробы;

товары бытовой химии – продукция химической промышленности, используемая в быту.

5. Метод, изложенный в данной инструкции, не предназначен для товаров бытовой химии, имеющих предупреждающую информацию на упаковке о вредном действии средства на организм и мерах безопасности при использовании; у которых рН составляет менее 3 ед. рН и более 11,5 ед. рН; спиртосодержащих, с процентным содержанием спирта более 25 %; дезинфицирующих и хлорсодержащих средств; средств, содержащих органические растворители и другие вещества, обладающие заведомо раздражающими свойствами при действии на слизистые оболочки*.

ГЛАВА 2 ОБОРУДОВАНИЕ, ЛАБОРАТОРНАЯ ПОСУДА, МАТЕРИАЛЫ, РЕАКТИВЫ

6. Оборудование:

весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности (по ГОСТ 24104) с пределом взвешивания 200 г; анализатор потенциометрический с погрешностью измерений $\text{pH} \pm 0,1$ (рН-метр) с набором электродов (по ГОСТ 19881); термостат электрический суховоздушный с автоматическим терморегулятором до 50 °С, позволяющие поддерживать заданную температуру с

погрешностью ± 1 °С; инкубатор с автоматическим вращающимся элементом (оптимальная температура $38,5$ °С $\pm 0,5$ °С, относительная влажность $62,5$ % $\pm 7,5$ %; стереоскопический микроскоп со стандартным диапазоном увеличения $6,3x$ – $63x$.

7. Лабораторная посуда и медицинские изделия, материалы:

дозаторы пипеточные типа ПЛ на $0,05$ см³ и $0,1$ см³; стаканы химические (50 см³), цилиндры (ГОСТ 1770) и колбы (ГОСТ 25336) разной вместимости (10 см³, 100 см³); шпатели стеклянные; стандарт титры для приготовления образцовых буферных растворов для рН-метрии (ГОСТ 8.135 ГСИ).

8. Реактивы и питательные среды:

вода дистиллированная (ГОСТ 6709); физиологический раствор NaCl ($0,9$ %).

Возможно применение оборудования и материалов с аналогичными по назначению техническими и метрологическими характеристиками. При их применении следует руководствоваться рекомендациями изготовителя.

ГЛАВА 3

ПОДГОТОВКА И ПРОВЕДЕНИЕ АЛЬТЕРНАТИВНОГО МЕТОДА *IN VITRO* ОПРЕДЕЛЕНИЯ РАЗДРАЖАЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ НА СЛИЗИСТЫЕ ОБОЛОЧКИ ГЛАЗ ТОВАРОВ БЫТОВОЙ ХИМИИ

9. Приготовление испытуемой пробы.

Измеряют водородный показатель рН испытуемого образца*.

Для продукции вязкой и жидкой консистенции – в стеклянную емкость вносят, дозируя пипеткой (дозатором) испытуемый образец в количестве 10 см³ $\pm 0,01$ см³ и готовят 50 % исходный раствор, добавляя 10 см³ растворителя.

Для продукции твердой консистенции – взвешивают на лабораторных весах в стакане 10 г $\pm 0,01$ г испытуемого образца. Кристаллическую и крупнозернистую продукцию предварительно доводят до порошкообразного состояния, растирая пестиком в ступке. Готовят исходный раствор, эмульсию или суспензию с массовой долей испытуемой продукции 50 %, дозируя пипеткой (дозатором) в стакан с навеской испытуемого образца растворитель в объеме $10,0$ см³ с последующим перемешиванием содержимого до однородной консистенции, устанавливая стакан с внесенным магнитным якорьком на 10 мин. на магнитную мешалку.

Для товаров бытовой химии на носителях (салфетки) – готовят вытяжку в растворитель при соотношении площади образца к объему растворителя $1:2$, путем вырезания ножницами испытуемого образца размером 2×2 см (площадь 4 см²), внесения измельченного ножницами испытуемого образца в стаканчик (10 – 20 см³), дозирования пипеткой

(дозатором) 8 см³ растворителя, инкубации в течение 24 ч в суховоздушном термостате при температуре 37 °С при периодическом (5–6 раз) перемешивании содержимого стаканчика стеклянной палочкой. Водную фазу отделяют фильтрацией в стакан через фильтр с помощью делительной воронки.

Для проведения метода используют 1 % раствор испытуемой пробы. В случае, если на маркировке потребительской упаковки имеется информация о необходимости использования разведения, из испытуемой пробы приготавливают раствор в соответствии с рекомендуемым режимом применения, указанным на маркировке потребительской упаковки.

В качестве растворителя используют дистиллированную воду.

9.1. Подготовка куриных яиц.

Для проведения метода используют не менее 3-х фертильных куриных яиц массой от 50 г до 60 г в контрольной и опытной группе.

Фертильные куриные яйца (1-3-дневные) размещают тупыми концами вверх на лотках инкубатора с автоматическим вращающимся элементом при температуре 38,5 °С ± 0,5 °С и относительной влажности 62,2 % ± 7,5 %. Вращение необходимо для предотвращения прилипания эмбриона к одной стороне яйца.

Контроль температуры и относительной влажности внутри инкубатора осуществляется ежедневно.

На 6-9-е сутки после закладки фертильные куриные яйца просвечивают при помощи люминесцентной лампы. При нормальном развитии зародыша на желтке видна хорошо развитая кровеносная система, а зародыш едва различим, так как он глубоко погружен в желток. При отставании в развитии зародыш лежит под скорлупой, кровеносная система на желтке развита слабо. Фертильные куриные яйца с нежизнеспособными, погибшими зародышами отбраковывают.

Не допускается взбалтывание и любые другие механические раздражения фертильных куриных яиц при их подготовке.

9.2. Проведение метода.

На 10-е сутки фертильные куриные яйца поочередно помещают на подставку тупым концом вверх. Маркером отмечают воздушную полость, медицинским пинцетом удаляют отмеченный участок скорлупы, вскрывая и освобождая воздушную камеру. Для предотвращения высыхания на поверхность подскорлуповой оболочки наносят 0,4 см³ физиологического раствора NaCl (0,9 %). Для снятия травматического шока фертильные куриные яйца помещают обратно в инкубатор с температурой 38,5 °С ± 0,5 °С и относительной влажностью 62,2 % ± 7,5 % на 20 мин.

Фертильные куриные яйца поочередно извлекают из инкубатора, удаляют пинцетом подскорлуповую оболочку таким образом, чтобы не повредить хориоаллантоисную мембрану. В случае, если произошло

повреждение хориоаллантаической мембраны или возникли кровотечения, фертильное куриное яйцо отбраковывают.

На освобожденную хориоаллантаическую мембрану фертильных куриных яиц опытной группы наносят раствор испытуемой пробы в объеме 0,05 см³, на хориоаллантаическую мембрану фертильных куриных яиц контрольной группы наносят физиологический раствор NaCl (0,9 %) в том же объеме. Через 5 мин. с хориоаллантаической мембраны фертильных куриных яиц опытной группы физиологическим раствором NaCl (0,9 %) аккуратно смывают раствор испытуемой пробы и регистрируют реакцию хориоаллантаической мембраны.

9.3. Оценка выраженности раздражающего действия.

По изменениям в хориоаллантаической мембране (увеличение сети капилляров, точечные и крупные кровоизлияния) при нанесении на нее раствора испытуемой пробы судят о ее потенциальной способности вызывать раздражение.

9.3.1. Оценку выраженности раздражающего действия раствора испытуемой пробы на хориоаллантаическую мембрану проводят согласно шкале, приведенной в таблице.

Таблица – Шкала оценки выраженности раздражающего действия раствора испытуемого образца на хориоаллантаическую мембрану

Критерии оценки повреждений хориоаллантаической мембраны	Оценка в баллах	Выраженность раздражающего действия
Отсутствие видимой гиперемии, четкий сосудистый рисунок	0	Отсутствие
Увеличение сети капилляров, сосуды инъецированы (расширены)	1	Слабое
Точечные кровоизлияния, отдельные сосуды трудно различимы	2	Умеренное
Крупные кровоизлияния, диффузное глубокое покраснение	3	Выраженное
Денатурация белка (внутрисосудистая и внесосудистая)	4	Резко выраженное

Индекс раздражающего действия раствора испытуемой пробы на хориоаллантаическую мембрану I_{cam} в баллах вычисляют по формуле:

$$I_{cam} = (R_o - R_k)_1 + (R_o - R_k)_2 + \dots + (R_o - R_k)_n / n,$$

где R – выраженность раздражающего действия на хориоаллантаическую мембрану в баллах;

o – фертильное куриное яйцо опытной группы;

k – фертильное куриное яйцо контрольной группы;

$1, 2, \dots, n$ – порядковый номер;

n – количество фертильных куриных яиц в опытной (контрольной) группе.

За результат испытаний принимают среднее значение суммы каждой разности выраженности раздражающего действия раствора испытуемой пробы на хориоаллантоисную мембрану между опытной и контрольной группами.

9.3.2. Интерпретация результатов.

В случае, если значение индекса раздражающего действия на хориоаллантоисную мембрану I_{cam} менее 1,0 балла, делают заключение об отсутствии раздражающего действия на слизистые оболочки глаз у испытуемого образца товаров бытовой химии.

В случае, если значение индекса раздражающего действия на хориоаллантоисную мембрану I_{cam} равен 1,0 или более баллов, делают заключение о наличии раздражающего действия на слизистые оболочки глаз у испытуемого образца товаров бытовой химии.