INSO
21195
1st.Edition
2016

جمهوری اسلامی ایران
Islamic Republic of Iran
سازمان ملی استاندارد ایران
Iranian National Standardization Organization

استاندارد ملی ایران
۲۱۱۹۵
چاپ اول
۱۳۹۵

فناوری نانو- کالاهای نساجی با خاصیت ضدمیکروبی- روش‌های آزمون

Nanotechnology- Antimicrobial textiles - Test methods

ICS: 59.060.01, 71.100.01

سازمان ملی استاندارد ایران

تهران،ضلع جنوب‌غربی میدان ونک،خیابان ولیعصر، پلاک ۲۵۹۲

صندوق‌پستی: ۶۱۳۹-۱۴۱۵۵ تهران- ایران

تلفن:۵-۸۸۸۷۹۴۶۱

دورنگار: ۸۸۸۸۷۰۸۰ و۸۸۸۸۷۱۰۳

کرج، شهر صنعتی، میدان استاندارد

صندوق پستی: ۱۶۳-۳۱۵۸۵ کرج - ایران

تلفن: ۸-۳۲۸۰۶۰۳۱(۰۲۶)

دورنگار: ۳۲۸۰۸۱۱۴(۰۲۶)

رایانامه: standard@isiri.org.ir

وبگاه: http://www.isiri.org

Iranian National Standardization Organization (INSO)

No.2592 Valiasr Ave., South western corner of Vanak Sq., Tehran, Iran

P. O. Box: 14155-6139, Tehran, Iran

Tel: + 98 (21) 88879461-5

Fax: + 98 (21) 88887080, 88887103

Standard Square, Karaj, Iran

P.O. Box: 31585-163, Karaj, Iran

Tel: + 98 (26) 32806031-8

Fax: + 98 (26) 32808114

Email: standard@isiri.org.ir

Website:http://www.isiri.org

به نام خدا

آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران

سازمان ملی استاندارد ایران به موجب بند یک مادهٔ ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ تنها مرجع رسمی کشور است که وظیفهٔ تعیین، تدوین و نشر استانداردهای ملی (رسمی) ایران را به عهده دارد.

تدوین استاندارد در حوزه‌های مختلف در کمیسیون‌های فنی مرکب از کارشناسان سازمان، صاحب‌نظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی و اقتصادی آگاه و مرتبط انجام می‌شود و کوششی همگام با مصالح ملی و با توجه به شرایط تولیدی، فناوری و تجاری است که از مشارکت آگاهانه و منصفانهٔ صاحبان حق و نفع، شامل تولیدکنندگان، مصرف‌کنندگان، صادرکنندگان و واردکنندگان، مراکز علمی و تخصصی، نهادها، سازمان‌های دولتی و غیردولتی حاصل می‌شود. پیش‌نویس استانداردهای ملی ایران برای نظرخواهی به مراجع ذی‌نفع و اعضای کمیسیون‌های مربوط ارسال می‌شود و پس از دریافت نظرها و پیشنهادها در کمیتهٔ ملی مرتبط با آن رشته طرح و در صورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی (رسمی) ایران چاپ و منتشر می‌شود.

پیش‌نویس استانداردهایی که مؤسسات و سازمان‌های علاقه‌مند و ذی‌صلاح نیز با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می‌کنند درکمیته ملی طرح، بررسی و درصورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی ایران چاپ و منتشر می‌شود. بدین ترتیب، استانداردهایی ملی تلقی می‌شود که بر اساس مقررات استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵ تدوین و در کمیتهٔ ملی استاندارد مربوط که در سازمان ملی استاندارد ایران تشکیل می‌شود به تصویب رسیده باشد.

سازمان ملی استاندارد ایران از اعضای اصلی سازمان بین‌المللی استاندارد (ISO)[1]، کمیسیون بین‌المللی الکتروتکنیک (IEC)[2] و سازمان بین‌المللی اندازه‌شناسی قانونی (OIML)[3] است و به عنوان تنها رابط[4] کمیسیون کدکس غذایی (CAC)[5] در کشور فعالیت می‌کند. در تدوین استانداردهای ملی ایران ضمن توجه به شرایط کلی و نیازمندی‌های خاص کشور، از آخرین پیشرفت‌های علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بین‌المللی بهره‌گیری می‌شود.

سازمان ملی استاندارد ایران می‌تواند با رعایت موازین پیش‌بینی شده در قانون، برای حمایت از مصرف‌کنندگان، حفظ سلامت و ایمنی فردی و عمومی، حصول اطمینان از کیفیت محصولات و ملاحظات زیست‌محیطی و اقتصادی، اجرای بعضی از استانداردهای ملی ایران را برای محصولات تولیدی داخل کشور و/یا اقلام وارداتی، با تصویب شورای عالی استاندارد، اجباری کند. سازمان می‌تواند به منظور حفظ بازارهای بین‌المللی برای محصولات کشور، اجرای استاندارد کالاهای صادراتی و درجه‌بندی آن را اجباری کند. همچنین برای اطمینان بخشیدن به استفاده‌کنندگان از خدمات سازمان‌ها و مؤسسات فعال در زمینهٔ مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و صدورگواهی سیستم‌های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست‌محیطی، آزمایشگاه‌ها و مراکز واسنجی (کالیبراسیون) وسایل سنجش، سازمان ملی استاندارد این‌گونه سازمان‌ها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران ارزیابی می‌کند و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامهٔ تأیید صلاحیت به آن‌ها اعطا و بر عملکرد آن-ها نظارت می‌کند. ترویج دستگاه بین‌المللی یکاها، واسنجی وسایل سنجش، تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی ایران از دیگر وظایف این سازمان است.

1- International Organization for Standardization
2- International Electrotechnical Commission
3- International Organization for Legal Metrology (Organisation Internationale de Metrologie Legals)
4- Contact point
5- Codex Alimentarius Commission

کمیسیون فنی تدوین استاندارد

« فناوری نانو- کالاهای نساجی با خاصیت ضدمیکروبی- روش‌های آزمون»

رئیس:	سمت و/یا محل اشتغال:
قاضی خوانساری، محمود (دکترای سم‌شناسی)	دانشگاه تهران، دانشکده پزشکی
دبیر:	
مختاری، فهیم‌دخت (کارشناسی ارشد ایمونولوژی)	سازمان ملی استاندارد ایران- پژوهشگاه استاندارد
اعضا:(اسامی به ترتیب حروف الفبا)	
اربابی، سپیده (دکترای سم‌شناسی)	وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، سازمان غذا و دارو، کمیته نانوفناوری
اسلامی‌پور، الهه (کارشناسی ارشد زیست‌شناسی)	ستاد توسعه فناوری نانو
اکبری، سمیه (دکترای نساجی)	دانشگاه امیرکبیر، دانشکده نساجی
بهزادی، فرحناز (کارشناسی ارشد شیمی)	سازمان ملی استاندارد ایران، پژوهشگاه استاندارد
بشری، آزاده (دکترای نساجی)	شرکت تهران زرنخ
پزشک، لیلا (کارشناسی ارشد مدیریت تکنولوژی)	وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، سازمان غذا و دارو، کمیته نانوفناوری
پوی‌پوی، حسن (کارشناسی ارشد شیمی)	ستاد توسعه فناوری نانو

کمیسیون فنی تدوین استاندارد

« فناوری نانو- کالاهای نساجی با خاصیت ضدمیکروبی- روش‌های آزمون»

پیغامی، فریبا (کارشناسی فیزیک)	سازمان ملی استاندارد ایران، اداره کل نظارت بر اجرای استاندارد غیرفلزی
چوخاچی‌زاده مقدم، امین (کارشناسی ارشد نانوتکنولوژی)	ستاد توسعه فناوری نانو
حسن‌نژاد، حمید (کارشناسی مهندسی صنایع)	شرکت تحقیقاتی و خدماتی ساتر سبز
دشتی، علیرضا (کارشناسی ارشد نساجی)	شرکت نانوفناوران حصان
سیفی، مهوش (کارشناسی ارشد مدیریت)	کارشناس استاندارد – بازنشسته سازمان استاندارد
سمنانی رهبر، روح‌اله (دکترای نساجی)	سازمان ملی استاندارد ایران- پژوهشگاه استاندارد
صداقت، منیژه (دکترای باکتری‌شناسی)	انستیتو پاستور ایران
طهرانی، جواد (دیپلم)	شرکت تهران زرنخ
عدل‌نسب، لاله (دکتری شیمی تجزیه)	سازمان ملی استاندارد ایران- پژوهشگاه استاندارد
عسگری، محسن (کارشناسی ارشد نساجی)	ستاد توسعه فناوری نانو

کمیسیون فنی تدوین استاندارد

« فناوری نانو- کالاهای نساجی با خاصیت ضدمیکروبی- روش‌های آزمون»

غفاری، سولماز (دکترای فارماسیوتیکس)	واحد علوم دارویی دانشگاه آزاد اسلامی
فاضلی کجور، فخرالدین (کارشناسی ارشد مهندسی مواد)	ستاد توسعه فناوری نانو، واحد نانومقیاس
قاسم‌زاده، علی (کارشناسی ارشد مهندسی شیمی)	وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، سازمان غذا و دارو، کمیته نانوفناوری
کتابداری، علیرضا (کارشناسی میکروبیولوژی)	شرکت تولیدات کاغذی خراسان (گلریز)
کریمی، جواد (دکترای شیمی‌فیزیک)	شرکت تولیدات کاغذی خراسان (گلریز)
مهرپور، رامش (کارشناسی مهندسی صنایع، کنترل کیفی)	سازمان ملی استاندارد ایران- پژوهشگاه استاندارد
نازی، ملیحه (دکترای مهندسی نساجی)	سازمان ملی استاندارد ایران- پژوهشگاه استاندارد
نعیمی‌نیا، فرناز (کارشناسی ارشد مهندسی نساجی)	سازمان ملی استاندارد ایران- پژوهشگاه استاندارد
وطن‌دوست، سمیرا (کارشناسی ارشد نساجی)	شرکت نانوفناوران حصان
هاشمیان، محمدرضا (کارشناسی بازرگانی)	شرکت تولیدات کاغذی خراسان (گلریز)
یارمحمدی، محمدرضا	شرکت پوشینه طب

کمیسیون فنی تدوین استاندارد

« فناوری نانو- کالاهای نساجی با خاصیت ضدمیکروبی- روش‌های آزمون»

(کارشناسی مهندسی شیمی)

ویراستار:

مهرپور، رامش
(کارشناسی مهندسی صنایع، کنترل کیفی)
سازمان ملی استاندارد ایران- پژوهشگاه استاندارد

فهرست مندرجات

عنوان	صفحه
پیش‌گفتار	ط
۱ هدف و دامنهٔ کاربرد	۱
۲ مراجع الزامی	۱
۳ اصطلاحات و تعاریف	۲
۴ روش تعیین مشخصات فیزیکی و شیمیایی نانوذرات	۵
۴-۱ تعیین مشخصات فیزیکی	۵
۴-۲ تعیین مشخصات شیمیایی	۵
۵ تعیین میزان رهش نانوذرات	۵
۵-۱ کلیات	۵
۵-۲ رهش نانوذرات در برابر شستشو	۵
۵-۳ رهش نانوذرات در برابر عرق بدن	۶
۵-۴ تعیین میزان نانوذرات رهش یافته	۶
۶ بررسی کارایی ضدمیکروبی	۶
۶-۱ کلیات	۶
۶-۲ فعالیت ضدباکتریایی	۶
۶-۳ فعالیت ضدقارچی	۷

عنوان	صفحه
۶-۴ فعالیت ضدویروسی	۷
۶-۵ بررسی خاصیت ضدبو	۷
۷ روش‌های بررسی عوارض ناشی از تماس پوستی	۷
۷-۱ تحریک و تخریش پوستی	۷
۷-۲ حساسیت‌زایی	۷
۷-۳ بررسی سمیّت حاد پوستی	۸
پیوست الف (اطلاعاتی) روش تعیین مشخصات فیزیکی نانوذرات	۹
پیوست ب (اطلاعاتی) تعیین ترکیب شیمیایی	۱۰
پیوست پ (الزامی) تحریک و تخریش پوستی - روش آزمون درون‌تن	۱۳
پیوست ت (الزامی) تحریک و تخریش پوستی- روش آزمون‌های برون‌تن	۱۷
پیوست ث (الزامی) روش آزمون‌های بررسی حساسیت‌زایی	۲۶
پیوست ج (الزامی) روش آزمون بررسی سمیّت پوستی	۳۶
پیوست چ (اطلاعاتی) کتاب‌نامه	۳۹

پیش‌گفتار

استاندارد « فناوری نانو- کالاهای نساجی با خاصیت ضدمیکروبی- روش‌های آزمون» که پیش‌نویس آن براساس پژوهش انجام شده تهیه و تدوین شده است، پس از بررسی درکمیسیون‌های مربوط، در بیست و چهارمین اجلاسیه کمیتهٔ ملی استاندارد نانوفناوری مورخ ۱۳۹۵/۷/۵ تصویب شد. اینک این استاندارد به استناد بند یک مادهٔ ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱، به عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می‌شود.

استانداردهای ملی ایران بر اساس استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵ (استانداردهای ملی ایران- ساختار و شیوهٔ نگارش) تدوین می‌شوند. برای حفظ همگامی و هماهنگیبا تحولات و پیشرفت‌هایملی و جهانی در زمینهٔ صنایع، علوم و خدمات، استانداردهایملی ایران در صورت لزوم تجدیدنظر خواهند شد و هر پیشنهادیکه برای اصلاح و تکمیل این استانداردها ارائه شود، هنگام تجدیدنظر در کمیسیون‌های مربوط موردتوجه قرار خواهد گرفت. بنابراین، باید همواره از آخرین تجدیدنظر استانداردهای ملی ایران استفاده کرد.

نتایج پژوهشی که برای تهیه و تدوین این استاندارد مورد استفاده قرار گرفته به شرح زیر است:

- مطالعات و تحقیقات انجام شده در پژوهشگاه استاندارد، پژوهشکده صنایع غذایی و کشاورزی
- مطالعات و تحقیقات انجام شده در پژوهشگاه استاندارد، پژوهشکده شیمی و پتروشیمی
- مطالعات و تحقیقات انجام شده در ستاد فناوری نانو

فناوری نانو- کالاهای نساجی با خاصیت ضدمیکروبی- روش‌های آزمون

۱- هدف و دامنهٔ کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد، تعیین روش‌های آزمون برای ارزیابی کالاهای نساجی است که با افزودن نانومواد، دارای خاصیت ضدمیکروبی شده‌اند.

این استاندارد برای انواع کالاهای نساجی، شامل پارچه‌های تار و پودی، حلقوی بافت، منسوج نبافته، لایی، نخ، الیاف که نانومواد در حین ساخت، بعد از تکمیل[1] یا با پیونددهی[2] در آنها به‌کار رفته و دارای خصوصیت ضدمیکروبی هستند، کاربرد دارد.

این استاندارد برای فراورده‌های سلولزی بهداشتی یکبار مصرف مانند دستمال کاغذی نیز کاربرد دارد.

این استاندارد برای فراورده‌هایی که تولیدکننده ادعای خصوصیت درمانی آن را دارد، کاربرد ندارد.

۲- مراجع الزامی

در مراجع زیر ضوابطی وجود دارد که در متن این استاندارد به‌صورت الزامی به آن‌ها ارجاع داده شده است.بدین‌ترتیب، آن ضوابط جزئی از این استاندارد محسوب می‌شوند.

درصورتی‌که به مرجعی با ذکر تاریخ انتشار ارجاع داده شده باشد، اصلاحیه‌ها و تجدیدنظرهای بعدی آن برای این استاندارد الزام‌آور نیست. در مورد مراجعی که بدون ذکر تاریخ انتشار به آن‌ها ارجاع داده شده است، همواره آخرین تجدیدنظر و اصلاحیه‌های بعدی برای این استاندارد الزام‌آور است.

استفاده از مراجع زیر برای کاربرد این استاندارد الزامی است:

۲-۱ استاندارد ملی ایران شماره ۱۷۶، نساجی- آزمون‌های ثبات رنگ - ثبات رنگ در برابر عرق بدن

۲-۲ استاندارد ملی ایران شماره ۱۶۷۲- روش آزمون خواص ضد قارچی کاغذ و مقوا

۲-۳ استاندارد ملی ایران شماره ۱۷۲۸، آب مورد مصرف در آزمایشگاه تجزیه- ویژگی‌ها و روش های آزمون

۲-۴ استاندارد ملی ایران شماره ۱- ۷۱۰۶، زئولیت (A4) ـ روش آزمون تعیین درصد تبلور نسبی بوسیله دستگاه پراش اشعه ایکس ـ (XRD) پودری روش آزمون

1- Finishing
2- Grafting

۲-۵ استاندارد ملی ایران شماره ۲- ۷۲۱۶، ارزیابی زیست شناختی وسایل پزشکی- قسمت دوم - الزامات بهزیستی حیوانات

۲-۶ استاندارد ملی ایران شماره ۷۶۶۴، نساجی- روش‌های شستشو و خشک کردن خانگی برای آزمون‌های نساجی

۲-۷ استاندارد ملی ایران شماره ۹۴۸۸- منسوجات -ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی به روش انتشار در آگار

۲-۸ استاندارد ملی ایران شماره ۱۱۰۷۰، نساجی- تعیین فعالیت ضد باکتریایی در کالاهای نساجی

۲-۹ استاندارد ملی ایران شماره ۱۲۰۹۸، فناوری نانو- واژه‌ها- اصطلاحات و تعاریف اصلی

۲-۱۰ استاندارد ملی ایران شماره ۱۴۷۴۴- فناوری نانو- روش شناسی طبقه بندی و رده بندی نانو مواد

۲-۱۱ استاندارد ملی ایران شماره ۱۶۲۴۷، آنالیز اندازه ذره - پراکندگی نور دینامیک (DLS)

۲-۱۲ استاندارد ملی ایران شماره ۱۶۴۶۴، فناوری نانو- ویژگی‌های مواد- راهکاری برای تعیین ویژگی‌های نانو اشیاء

۲-۱۳ استاندارد ملی ایران شماره ۲-۱۹۲۱۰، نساجی-تعیین فعالیت ضد قارچی در کالای نساجی- قسمت ۲- روش شمارش کلنی در پلیت

۲-۱۴ استاندارد ملی ایران شماره ۲۰۸۳۶- نساجی- تعیین فعالیت ضدویروسی در کالاهای نساجی

2-15 BS EN 16711-1:2015, Textiles. Determination of metal content. Determination of metals using microwave digestion

2-16 BS EN 16711-2:2015, Textiles. Determination of metal content. Determination of metals extracted by acidic artificial perspiration solution

۳- اصطلاحات و تعاریف

در این استاندارد، اصطلاحات و تعاریف زیر به‌کار می‌رود:

۳-۱ نانوفناوری

Nanotechnology

به‌کارگیری دانسته‌های علمی برای کنترل و استفاده از مواد نانومقیاس است، به‌گونه‌ای که خواص و پدیده‌های مرتبط با اندازه مشاهده شود.

[استاندارد ملی ایران شماره ۱۲۰۹۸]

۳-۲ نانوساختار

Nanostructure

ویژگی یک ماده که ساختار دورنی یا سطحی آن نانومقیاس است.

[استاندارد ملی ایران شماره ۱۲۰۹۸]

۳-۳ ماده نانوساختار

Nanostructured material

هر ماده یا سطحی که دارای کمیتی در نانومقیاس به‌طور مجزا یا ساختار نانومقیاس است.

[استاندارد ملی ایران شماره ۱۲۰۹۸]

۳-۴ نانوماده

Nanomaterial

ماده‌ای که یا نانوشیی یا نانوساختار است.

[استاندارد ملی ایران شماره ۱۲۰۹۸]

۳-۵ نانومقیاس

Nanoscale

محدوده اندازه تقریباً ۱ nm تا ۱۰۰ nm است.

[استاندارد ملی ایران شماره ۱۲۰۹۸]

۳-۶ کالای نساجی

Textile

کلیه محصولات نساجی که شامل نخ، الیاف، انواع پارچه و منسوج نبافته است.

۳-۷ منسوج نبافته

Non-woven

نوعی منسوج متشکل از جنس‌های مختلف، از قبیل الیاف، رشته‌های یکسره یا غیریکسره، نخ‌های خرد شده[1] است که با روش‌های گوناگون تشکیل لایه تارعنکبوتی[2] داده و به یکدیگر اتصال و/یا پیوند داده می‌شوند.

[استاندارد ملی ایران شماره ۵۶۳۴]

۳-۸ نمونه کنترل

Control

همان نمونه مورد آزمون است، با این تفاوت که نانومواد در آن به‌کار نرفته و به‌منظوراعتباربخشی به آزمون‌ها به‌کار می‌رود.

1- Chopped yarns
2- Web

۳-۹ فعالیت ضدمیکروبی

Antimicrobial activity

فعالیت ناشی از نانومواد که در حین ساخت فراورده، بعد از تکمیل یا با پیونددهی منسوجات، به منظور جلوگیری یا کم کردن رشد، کاهش تعداد یا از بین بردن میکروارگانیسم‌ها، شامل باکتری‌ها، قارچ‌ها و ویروس‌ها در آنها به‌کار رفته است.

۳-۱۰ تحریک پوستی

Skin irritation

پاسخ غیراختصاصی موضعی به ماده‌ای است که به صورت مجزا[1]، مکرر[2] یا مداوم[3] به‌کار رفته و پس از تماس با آزمونه به مدت حداکثر ۴ ساعت، آسیب برگشت‌پذیر پوستی ایجاد میکند.

۳- ۱۱ تخریش پوستی

Skin corrosion

ایجاد آسیب غیرقابل برگشت به پوست، شامل نکروز قابل مشاهده، از اپیدرم تا داخل پوست، پس از تماس به مدت حداکثر ۴ ساعت است.

مشخصه واکنش‌های تخریش، تشکیل زخم، خونریزی، پوسته پوسته شدن، تغییر رنگ و بی‌رنگ شدن پوست، کچلی و زخم تا پایان زمان بررسی (۱۴روز) است.

۳-۱۲ حساسیت پوستی

Skin sensitization

واکنش جلدی اختصاصی ایمونولوژیک به یک ماده است.

یادآوری- در انسان، پاسخ‌ها می‌تواند بوسیله خارش[4]، التهاب پوست، ادم، زگیل‌ها[5]، تاول‌ها[6]، بثورات[7] یا ترکیبی ازاین‌ها مشخص شود. در سایر گونه‌ها واکنش‌ها می‌تواند متفاوت بوده و تنها التهاب پوست و ادم دیده شود.

۳-۱۳ سمیت حاد پوستی

Acute Dermal Toxicity

اثرات نامطلوب موضعی و سیستمیک از طریق تماس پوستی، در یک مدت زمان کوتاه تماس پوست طبق شرایط تعیین شده در این استاندارد است.

1- Individualy
2- Repeatedly
3-Continuosly
4- Pruritis
5- Papules
6- Vesicles
7- Bullae

۳-۱۴ آزمون درون‌تن

In vivo

آزمونی است که در آن نمونه در شرایط طبیعی، و با استفاده از حیوانات آزمایشگاهی مورد آزمون قرار می‌گیرد.

۳-۱۵ آزمون برون‌تن

In vitro

آزمونی است که در شرایط آزمایشگاهی شبیه‌سازی شده با شرایط بدن موجود زنده، انجام می‌شود.

۴- روش تعیین مشخصات فیزیکی و شیمیایی نانوذرات

۴-۱ تعیین مشخصات فیزیکی

مشخصات فیزیکی شامل ریخت‌شناسی نانوذرات، میانگین اندازه و توزیع نانوذرات در نمونه مورد آزمون می‌باشد.

برای آماده‌سازی نمونه و اجرای روش‌های آزمون تعیین مشخصات فیزیکی نانوذرات، تا تدوین استانداردهای ملی مرتبط، به پیوست الف مراجعه کنید.

یادآوری- با توجه به تنوع گسترده احتمالی نانوذرات بکار رفته و نوع کالاهای نساجی، روش‌های آزمون تجربی متفاوتی توسط کاربر می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد.

۴-۲ تعیین مشخصات شیمیایی

مشخصات شیمیایی و ساختاری شامل نوع، ترکیب و مقدار مؤثر نانوذرات موجود در نمونه مورد آزمون است.

برای اجرای روش‌های آزمون تعیین ترکیب شیمیایی و آماده‌سازی نمونه، تا تدوین استانداردهای ملی مرتبط، به پیوست ب مراجعه کنید.

۵- تعیین میزان رهش نانوذرات

۵-۱ کلیات

میزان رهش نانوذرات، به دو روش، در برابر شستشو و در برابر محلول عرق بدن انجام می‌شود.

یادآوری - برای فراورده‌های سلولزی بهداشتی که یکبار مصرف هستند، اجرای این بند ضرورت ندارد.

۵-۲ رهش نانوذرات در برابر شستشو

در این روش، میزان رهش نانوذرات از کالای نساجی، پس از شستشوی متعدد با روش شستشوی معمول خانگی براساس استاندارد ملی ایران شماره ۷۶۶۴ تعیین می‌شود.

کاهش غلظت نانوذرات قبل و بعد از شستشو، برحسب درصد طبق بند ۵-۴ محاسبه می‌شود. این مقدار، نشان‌دهنده میزان رهش نانوذرات است.

۵-۲-۱ روش شستشو

نمونه مورد آزمون را طبق یکی از روش‌های ذکر شده در استاندارد ملی ایران شماره ۷۶۶۴ و براساس ادعای سازنده، شسته، آبکشی و خشک کنید.

تعداد دفعات عملیات شستشو، آبکشی و خشک کردن براساس ادعای سازنده و نوع نمونه تعیین می‌شود.

۵-۳ رهش نانوذرات در برابر عرق بدن

در این روش، میزان رهش نانوذرات از کالای نساجی، پس از قرارگیری در برابر محلول عرق بدن، طبق استاندارد BS EN 11671-2 تعیین می‌شود.

کاهش غلظت ذرات قبل و بعد از قرارگیری، در محلول عرق بدن، طبق بند ۵-۴ برحسب درصد محاسبه می‌شود.

۵-۴ تعیین میزان نانوذرات رهش یافته

مقدار نانو ماده مؤثر را در محلول حاصل از آزمونه‌ای که تحت عملیات شستشو، آبکشی و خشک شدن قرار گرفته، با استفاده از روش‌های طیف‌سنجی نشر اتمی به روش پلاسما جفت شده القایی (ICP)، طیف سنجی جذب شعله اتمی(AAS) و فلورسانس اشعه ایکس (XRF) تعیین کرده (A_1)، و با میزان محاسبه شده در محلول حاصل از آزمونه قبل از شستشو (A_0) مقایسه و تفاوت مقدار (X) را برحسب درصد گزارش کنید.

$$X = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

۶- بررسی کارایی ضدمیکروبی

۶-۱ کلیات

کارایی ضدمیکروبی منسوج نانو شامل فعالیت ضدباکتریایی، ضدقارچی و ضدویروسی قبل و پس از شستشو و قرارگیری در معرض محلول عرق بدن براساس خصوصیات اعلام شده توسط سازنده انجام می‌شود.

۶-۲ فعالیت ضدباکتریایی

فعالیت ضدباکتریایی برای کالاهای نساجی را طبق استاندارد ملی ایران شماره ۱۱۰۷۰ تعیین کنید.

برای تعیین فعالیت ضدباکتریایی فراورده‌های سلولزی بهداشتی یکبار مصرف را، طبق استاندارد ملی ایران شماره ۹۴۸۸ تعیین کنید.

۶-۳ فعالیت ضدقارچی

فعالیت ضدقارچی برای کالاهای نساجی و فراورده‌های سلولزی بهداشتی یکبار مصرف را طبق استاندارد ملی ایران شماره ۲-۱۹۲۱۰تعیین کنید.

۶-۴ فعالیت ضدویروسی

فعالیت ضدویروسی کالاهای نساجی و فراورده‌های سلولزی بهداشتی یکبار مصرف را طبق استاندارد ملی ایران شماره ۲۰۸۳۶ تعیین کنید.

۶-۵ بررسی خاصیت ضدبو

در صورت ادعای سازنده مبنی برخصوصیت ضدبو، فراورده را طبق استاندارد ملی ایران شماره ۱۱۰۷۰ و با استفاده از *باسیلوس گزروزیس*[1] (DSMZ 20170) به‌عنوان میکروارگانیسم تکمیلی مورد آزمون قرار دهید.

۷- روش‌های بررسی عوارض ناشی از تماس پوستی

۷-۱ تحریک و تخریش پوستی

هدف از اجرای این آزمون، بررسی امکان ایجاد تحریک و تخریش پوستی با روش‌های درون‌تن و برون‌تن ناشی از تماس منسوج ضدمیکروبی مورد آزمون با پوست است.

روش اجرای آزمون بررسی تحریک و تخریش پوستی با روش درون‌تن در پیوست پ شرح داده شده است.

روش اجرای آزمون‌های بررسی تحریک و تخریش پوستی با روش برون‌تن در پیوست ت شرح داده شده است.

۷-۲ حساسیت‌زایی

هدف از اجرای این آزمون، تعیین حساسیت‌زایی منسوج ضدمیکروبی مورد آزمون است که خطرات سلامت ناشی از تماس کوتاه مدت پوستی ارائه می‌دهد.

حساسیت‌زایی در حال حاضر فقط به‌وسیله آزمون‌های درون‌تن انجام‌پذیر است، که شامل آزمون غدد لنفاوی موضعی[2] (LLNA) در موش[3]، پچ تست[4] در خوکچه هندی یا آزمون بیشینه‌سازی در خوکچه هندی[5] (GPMT) می‌باشد.

1- *Bacillus xerosis*
2- Local Lymph Node Assay (LLNA)
3- Mice
4- The occluded patch test
5- The Guinea Pig Maximization Test

روش اجرای آزمون‌های بررسی حساسیت‌زایی در پیوست ث شرح داده شده است.

۷-۳ بررسی سمیّت حاد پوستی

هدف از اجرای این آزمون، تعیین احتمال ایجاد سمیّت ناشی از تماس کوتاه مدت منسوج ضدمیکروبی مورد آزمون با پوست است، که ممکن است بدنبال ورود احتمالی نانوذرات از طریق پوست به‌وجود آید.

۷-۳-۱ در مورد منسوجات، اجرای این بند مشروط به اینست که رهش ذرات طبق بند ۵ بیش از ۲۰ درصد باشد.

۷-۳-۲ در مورد فراورده‌های بهداشتی سلولزی یک‌بار مصرف اجرای این بند الزامی است.

روش اجرای آزمون بررسی سمیّت حاد پوستی در پیوست ج شرح داده شده است.

پیوست الف

(الزامی)

روش تعیین مشخصات فیزیکی نانوذرات

الف-۱ ریخت‌شناسی ذرات

شکل ذره را می‌توان با میکروسکوپ الکترونی گسیل میدانی[1] (FESEM) و میکروسکوپ الکترونی عبوری[2] (TEM) بررسی نمود.

یادآوری- برای راهنمایی بیشتر به استاندارد ملی ایران شماره ۱۶۴۶۴ مراجعه شود.

الف-۲ تعیین اندازه و توزیع ذرات

میانگین اندازه ذرات به‌وسیله بررسی و تحلیل چشمی تصاویر میکروسکوپ الکترونی گسیل میدانی (FESEM) یا میکروسکوپی الکترونی عبوری (TEM) تعیین می‌شود. درصورتی‌که بررسی چشمی جهت تحلیل تصاویر کافی نباشد، از نرم‌افزار تحلیل‌گر تصویر[3] استفاده می‌شود. نتایج به‌صورت اندازه نانوذرات بین ۱ nm تا ۱۰۰ nm در هر سه بعد اعلام می‌شود.

یادآوری- برای راهنمایی بیشتر به استاندارد ملی ایران شماره ۱-۱۰۰۹۹ مراجعه شود.

الف-۳ آماده‌سازی و آزمون نمونه‌ها

برای آماده‌سازی و آزمون نمونه برمبنای ماتریکس نمونه و نوع نانوذره به‌کار رفته تا تدوین استانداردهای ملی و بین‌المللی طبق دستورالعمل‌های مصوب آزمایشگاه انجام شود.

1- Field Emission Scanning Electron Microscopy (FESEM)
2- Transmission electron microscopy (TEM)
3 - Image Analyzer

پیوست ب

(الزامی)

تعیین ترکیب شیمیایی

ب-۱ تعیین ترکیب شیمیایی و غلظت نانوماده

برای تعیین ترکیب شیمیایی و مقدار نانو ماده فلزی، استفاده از روش‌های طیف‌سنجی نشر اتمی به روش پلاسما جفت‌شده القایی[۱] (ICP)، یا طیف سنجی جذب اتمی[۲] (AAS) یا فلورسانس اشعه ایکس[۳] (XRF) توصیه می‌شود.

یادآوری- برای شناسایی ترکیب می‌توان از طیف سنجی پراش پرتو ایکس[۴] (EDX) و طیف سنجی تفکیک طول موج[۵] (WDS) در هنگام تصویربرداری FESEM استفاده کرد.

برای آماده‌سازی نمونه‌ها به بندهای ب-۳ و ب-۴ مراجعه کنید.

ب-۲ شناسایی فازهای نانومواد

برای تعیین فاز نانوماده استفاده شده در محصول، از روش پراش پرتو ایکس[۶] (XRD) استفاده شود.

یادآوری- برای راهنمایی بیشتر در مورد این روش می‌توان از استانداردهای EN 13925 قسمت‌های ۱ تا ۳ (بندهای ۶ تا ۸ کتاب‌نامه) استفاده کرد.

---

1 –Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP)

2- Atomic absorption spectroscopy (AAS)

3 –X-ray fluorescent analyzer (XRF)

4 –Energy-dispersive X-ray Spectroscopy (EDX)

5- Wavelength-dispersive X-ray spectroscopy (WDS)

6- X-ray diffraction (XRD)

ب-۳ آماده‌سازی نمونه با روش مایکرویو

برای آماده‌سازی نمونه‌ها برای تعیین مواد فلزی موجود در منسوج، می‌توان از استاندارد BS EN 16711-1 استفاده کرد.

ب-۴ آماده‌سازی نمونه با روش هضم اسیدی

ب-۴-۱ دامنه کاربرد روش

این روش یک روش هضم اسیدی قوی است که تقریباً برای تمام مواد کاربرد دارد. این روش هضم برای نمونه های پلی‌اولفین (پلی‌پیروپیلن) کاربرد ندارد.

ب-۴-۲ تجهیزات و وسایل لازم

- کاغذ صافی واتمن شماره ۴۱ یا مشابه آن
- ترازوی آزمایشگاهی، قابل تنظیم و با قابلیت نگهداری در دمای EC ۹۵- ۹۰ (مانند هات پلیت، بلاک هضم‌کننده)
- بشر ۲۵۰ میلی لیتری
- قیف یا وسایل مشابه
- بالن حجمی ۱۰۰ ml

ب-۴-۵ مواد و واکنشگرها

همه مواد و اکنشگرهای مورد استفاده در تمام آزمون‌ها باید دارای درجه خلوص آزمایشگاهی باشند. از سایر درجات نیز می‌توان استفاده کرد، به‌شرط آنکه اطمینان حاصل شود که خلوص لازم بدون تأثیرات منفی بر دقت آزمون را دارا هستند. اگر خلوص یک ماده مؤثر در آزمون مورد تردید است، باید سطح خلوص آن تعیین شود.

- آب با درجه خلوص ۳ مطابق استاندارد ملی ایران شماره ۱۷۲۸؛
- سولفوریک اسید غلیظ (H_2SO_4)، با درجه خلوص آزمایشگاهی؛
- پرکلریک اسید غلیظ ($HClO_4$)، با درجه خلوص آزمایشگاهی.

یادآوری- همه مراحلی که با اسید کار می‌شود، باید زیر هود و توسط کارکنان آموزش دیده و وسایل مناسب آزمایشگاهی انجام شود. توصیه می‌شود از سیستم‌های جذب بخار اسید استفاده شود.

ب-۴-۳ روش آزمون

برای هضم نمونه‌ها، ۱g تا ۲g از نمونه را با دقت ۰٫۰۱ گرم وزن کرده و داخل بشر ۲۵۰ml منتقل کنید. نمونه باید به صورت قطعات ریز بریده شود، تا هضم راحت‌تر و سریع‌تر انجام گیرد. سپس با افزودن مکرر محلول هضم (۲۰ml سولفوریک اسید (H_2SO_4) و ۲ ml پرکلریک اسید ($HClO_4$)) نمونه را حل کنید. این محلول را حداقل به مدت ۱۰min در دمای $۸۰^{\circ C}$ تا $۱۰۰^{\circ C}$ روی هیتر حرارت داده تا نمونه کاملاً حل شده و محلول شفافی بدست آید. حرارت‌دهی را تا زمان حل شدن کامل نمونه ادامه دهید. پس از این مدت زمان، محلول حاصل را توسط قیف و با استفاده از کاغذصافی واتمن فیلتر کرده و روی فیلتر را با آب مقطر شستشو دهید. محلول زیر صافی را به بالن حجمی ۱۰۰ml منتقل کنید. سپس محلول را توسط نیتریک اسید ٪۱۰ به حجم برسانید. سپس این محلول را توسط دستگاه جذب اتمی یا پلاسمای جفت شده القایی آنالیز کنید.

ب-۵ کنترل کیفی

ب-۵-۱ برای هر بهر از نمونه، در تمام مراحل آماده‌سازی و آنالیز نمونه، باید از یک شاهد خالی (بلانک) استفاده شود. این شاهد خالی، بخصوص اگر نمونه حاوی آلودگی باشد، مفید است.

ب-۵-۲ نمونه‌های اسپایک شده باید به‌صورت معمولی و نیز هنگام آزمون نمونه‌های دارای ماتریکس جدید، استفاده شوند. نمونه‌های اسپایک شده برای تعیین انحراف معیار و دقت آزمون به کار می‌روند.

پیوست پ

(الزامی)

تحریک و تخریش پوستی- روش آزمون درون‌تن

پ-۱ اساس آزمون

نمونه مورد آزمون روی پوست حیوان آزمایشگاهی گذاشته شده و قسمت‌هایی از پوست حیوان که مورد تیمار قرار نگرفته، به‌عنوان کنترل مورد استفاده قرار می‌گیرد، یا از تعدادی حیوان بدون تیمار آزمونه به‌عنوان کنترل استفاده می‌شود. پس از گذشت مدت زمان تیمار، درجه تحریک/ تخریش پوستی خوانده شده و ثبت می‌شود. مدت زمان آزمون باید طوری انتخاب شود که برای ارزیابی اثرات قابل برگشت یا غیرقابل برگشت مناسب باشد.

پ -۲ روش اجرای آزمون

پ -۲-۱ انتخاب حیوان

از خرگوش آلبینو به عنوان حیوان آزمون استفاده کنید. باید از حیوانات بالغ جوان استفاده شود. درصورت استفاده از سایر حیوانات، باید دلیل و توجیه منطقی وجود داشته باشد.

پ-۲-۱-۱ آماده کردن حیوانات آزمون

تقریباً h ۲۴ قبل از آزمون، موی ناحیه پشتی حیوانات را تراشیده و دقت کنید که به پوست صدمه‌ای وارد نشود، و فقط حیوانات سالم با پوست سالم (صدمه ندیده) را مورد استفاده قرار دهید.

یادآوری- برخی از گونه‌های خرگوش، تکه‌هایی دارای موی ضخیم دارند که در برخی از اوقات سال بیشتر دیده می‌شود. این نواحی نباید برای آزمون مورد استفاده قرار گیرند.

پ-۲-۱-۲ شرایط نگهداری و تغذیه حیوانات آزمون

حیوانات را در قفس‌های جداگانه نگهداری کنید. دمای اتاق نگهداری خرگوش‌ها باید $۲۰^{\circ}C \pm ۳^{\circ}C$ باشد. رطوبت نسبی اتاق باید حداقل ٪۳۰ و ترجیحاً ٪۶۰- ٪۵۰ بوده و بجز در زمان شستشو بالاتر از ٪۷۰ نشود. در اتاق حیوانات باید از نور مصنوعی، و با تناوب روشنایی و تاریکی ۱۲h استفاده شود. برای تغذیه حیوانات، از رژیم معمول آزمایشگاه، همراه با میزان نامحدود آب استفاده کنید.

پ-۲-۲ انجام آزمون

یک مربع ۲٫۵ cm × ۲٫۵ cm یا مقداری معادل ۰٫۵ g از نمونه را به‌عنوان آزمونه روی قسمت کوچکی از پوست (تقریباً ۶ cm) قرار دهید و با یک گاز زخم‌بندی بسته و با چسبی که تحریک‌زا نباشد، ثابت کنید (پچ).

بهتر است آزمونه را با مقداری آب یا در صورت لزوم، ماده حامل دیگر (که تأثیر احتمالی آن بر التهاب پوستی حداقل است)، مرطوب کنید تا تماس مناسبی با پوست داشته باشد.

آزمونه را باید طوری ببندید که زیاد محکم نبوده، ودر مدت زمان آزمون کاملاً با پوست در تماس باشد. حیوان نباید به ناحیه مورد آزمون یا آزمونه دسترسی داشته باشد، تا بتواند آن را خورده یا باز کند.

برای هر نمونه سه حیوان را مورد آزمون قرار دهید. ابتدا آزمونه را به مدت ۴ h بر روی دو حیوان قراردهید. در صورتی‌که علائم خورندگی مشاهده شد، نیازی به استفاده از حیوان سوم نیست. درغیراین‌صورت، حیوان سوم نیز باید مورد آزمون قرار گیرد. درصورت‌مشاهده پاسخ‌های مشکوک دال بر تحریک پوستی، باید آزمون مجدداً تکرار شود.

یادآوری- اگر شواهدی دال بر خورندگی نمونه در دسترس نباشد، می‌توان در یک بار آزمون، سه حیوان، را هم‌زمان مورد آزمون قرار داد.

در پایان مدت تماس، منسوج باید برداشته شده و محل آزمون، با آب یا محلول شستشوی مناسب دیگر، بدون ایجاد تغییر در پاسخ مشاهده شده شسته شود.

پ-۲-۳ مشاهدات بالینی و درجه‌بندی واکنش‌های پوستی

همه حیوانات را از نظر وجود علائم قرمزی[1]، اِدم[2] و زخم‌جوش[3] بررسی کنید و پاسخ‌های مشاهده شده در زمان‌های ۶۰min، ۲۴ h، ۴۸ h و ۷۲ h پس از برداشتن پچ را ثبت کنید بررسی آزمون اولیه در هر حیوان، باید بلافاصله پس از برداشتن پچ انجام شود.

واکنش‌های پوستی[4] را براساس جدول شماره ۱ درجه‌بندی و ثبت کنید. اگر به پوست صدمه‌ای وارد آمده باشدکه به‌عنوان تحریک یا تخریش قابل شناسایی یا درجه‌بندی نباشد، مشاهدات را تا ۱۴ روز ادامه دهید تا برگشت‌پذیری اثر تعیین شود و اگر برگشت اثرات مشاهد شد، آزمون در همان زمان پایان‌یافته تلقی می‌شود. مشاهدات باید در فواصل زمانی مناسب انجام شود (ترجیحاً روزانه)، تا مشاهده اثرات احتمالی و برگشت‌پذیر بودن آنها امکان‌پذیر باشد.

حیواناتی را که در هر یک از مراحل آزمون، علائم ادامه‌دار استرس شدید یا درد نشان می‌دهند، با روش‌های اخلاقی کشته، و نمونه را براساس نشانه‌های همان زمان ارزیابی کنید.

1- Erythema
2- Edem
3- Scar
4- Dermal

علاوه‌بر مشاهدات مربوط به تحریک و تخریش، تمام اثرات سمّی موضعی، نظیر از دست دادن چربی پوستی، و هرگونه عوارض نامطلوب سیستمیک (مانند علائم سمّیت بالینی و کاهش وزن) را بررسی و ثبت کنید. در صورت وجود پاسخ‌های مشکوک، می‌توان از بررسی‌های هیستوپاتولوژیک استفاده کرد.

درجه‌بندی پاسخ‌های پوستی باید براساس مشاهدات چشمی انجام شود. برای ایجاد هماهنگی در تفسیر مشاهدات، افراد مسئول آزمون و تفسیر نتایج باید آموزش‌های لازم را دیده باشند. استفاده از راهنماهای تصویری برای درجه‌بندی تحریکات پوستی می‌تواند مفید باشد.

جدول پ - ۱ راهنمای درجه‌بندی واکنش‌های پوستی براساس قرمزی و تشکیل زخم‌جوش

علائم تحریک شامل قرمزی و تشکیل زخم‌جوش	درجه
عدم قرمزی	۰
قرمزی بسیار ملایم (به‌سختی قابل مشاهده)	۱
قرمزی مشهود	۲
قرمزی متوسط تا شدید	۳
قرمزی شدید (قرمز گوشتی) تا ایجاد زخم‌جوشی که مانع درجه‌بندی قرمزی می‌شود	۴
حداکثر درجه	۴

جدول پ - ۲ راهنمای درجه‌بندی واکنش‌های پوستی براساس ایجاد اِدم

ایجاد اِدم (خیز، ورم)	درجه
عدم اِدم	۰
اِدم بسیار ملایم (به‌سختی قابل مشاهده)	۱
اِدم ملایم	۲
اِدم متوسط (برجستگی تا ۱ mm)	۳
اِدم شدید (برجستگی بیش از ۱ mm و گسترش تا نواحی اطراف منطقه تماس)	۴
حداکثر درجه	۴

پ-۲-۴ تفسیر نتایج

درجات تحریک پوستی باید با درنظرگرفتن ماهیت و شدت صدمات و برگشت‌پذیری یا عدم برگشت‌پذیری باشد. برگشت‌پذیری ضایعات پوستی باید در پاسخ‌های تحریک‌پذیر مدنظر قرار گیرد.

اگر واکنش‌هایی مثل کچلی (در مناطق محدود پوست)، کراتینه شدن (هایپرکراتینوزیس[1])، هایپرپلازیا[2]، و پوسته پوسته شدن تا پایان ۱۴ روز دوره مشاهده دوام داشت، ماده مورد آزمون تحریک‌زا درنظرگرفته می‌شود.

پ-۳ گزارش آزمون

گزارش آزمون باید جامع و در برگیرنده اطلاعات مربوط به نمونه، ماده مرطوب کننده (حامل)، حیوانات مورد استفاده در آزمون و نتایج حاصل از درجه‌بندی ضایعات، در قالب جدول خلاصه شده و شامل شرح دقیق همه ضایعات و درجه تحریک یا تخریش و در صورت وجود، نتایج یافته‌های پاتولوژی و سایر صدمات باشد.

1- Hypercratinosis
2 - Hyperplasia

پیوست ت

(الزامی)

تحریک و تخریش پوستی- روش آزمون‌های برون‌تن

ت-۱ کلیات

به‌جای آزمون درون‌تن بیان شده در پیوست پ، آزمون‌های برون‌تن بیان شده در این پیوست می‌توانند مورد استفاده قرار گیرند. در این پیوست، سه روش برون‌تن برای بررسی تخریش‌پوستی و سه روش برون‌تن برای بررسی تحریک‌زایی پوستی بیان شده است.

قبل از استفاده از یک روش برون‌تن، باید قابل اعتماد بودن، دقت و حدود آزمون برای نمونه مورد بررسی تعیین شود، تا از قابل مقایسه بودن آن با روش‌های مرجع صحه‌گذاری شده اطمینان حاصل شود. می‌توان از کیت‌های آزمون آماده مصرف که در بازار موجود هستند، و بنا بر مدارک معتبر صحه‌گذاری شده‌اند، استفاده کرد.

ت-۲ تخریش

ت-۲-۱ روش مقاومت الکتریکی وراپوستی[1] (TER)

ت-۲-۱-۱ اساس آزمون

این آزمون براساس مقاومت الکتریکی وراپوستی در رت[2] و با استفاده از دیسک‌های پوستی انجام می‌شود. پوست رت به‌دلیل حساسیت بالای آن مورد استفاده قرار می‌گیرد، و تنها دیسک پوستی است که برای این آزمون با روش‌های معتبر صحه‌گذاری شده است.

در این روش، ایجاد نقص در لایه شاخی پوست[3] که منجر به تغییر در عملکرد و نقش محافظتی آن می‌گردد، نشان‌دهنده قابلیت تخریش نمونه است. این روش در مقایسه با روش درون‌تن صحه‌گذاری شده است، و نشان داده شده که می‌توان برای بررسی تخریش، از آن به‌عنوان یک روش مرجع معتبر[4] به‌جای روش درون‌تن استفاده کرد.

1- Transcutaneous Electrical Resistance Test Method (TER)
2- Rat
3- Stratum Corneum
4- Validated Reference Method – VRM

براساس یک مطالعه صحه‌گذاری بر روی۱۲۲ ماده شیمیایی و سایر مدارک منتشر شده، گزارش شده که روش TER پوست رت برای تمایز بین قابلیت و عدم قابلیت تخریش مطابق با UN CHS[1] با حساسیت ٪۹۴ (۵۱ از ۵۴ مورد) و اختصاصی بودن ٪۷۱ (۴۸ از ۶۸ مورد) کاربرد داشته است.

سیستم آزمون شامل دو جزء است، که در آن دیسک‌های پوستی به‌عنوان متمایز کننده بین دو جزء به‌کار می‌رود. نمونه مورد آزمون به مدت حداکثر ۲۴ h روی سطح اپیدرمی (روپوست) دیسک‌های پوستی تماس داده می‌شود.

دیسک‌های پوستی از رت‌های ۲۸ تا ۳۰ روزه که با روش اخلاقی کشته شده‌اند، به‌دست می‌آیند. تخریش‌زایی نمونه‌ها با توانایی آنها در کاهش فعالیت سد مانند لایه شاخی نشان داده می‌شود، که به‌وسیله افزایش در مقاومت الکتریکی پوست اندازه‌گیری می‌شود. برای پوست رت، افزایش بیش از ۵ KΩ به‌عنوان حد آستانه در نظر گرفته شده است، در حالیکه مواد تخریش‌زا بسیار بالاتر از این مقدار یعنی افزایش بیش از ۱۰ KΩ و مواد غیرتخریش‌زا بسیار پایین‌تر از ۳ KΩ تغییر در مقاومت الکتریکی پوست ایجاد می‌کنند. عموماً موادی که در حیوانات غیرتخریش‌زا بوده، ولی تحریک‌زا هستند، نمی‌توانند مقاومت الکتریکی را تا بیش از حد آستانه افزایش دهند.

برای تأیید نتایج مثبت در آزمون، از رنگی استفاده می‌شود، که افزایش مقاومت ناشی از افزایش قابلیت نفوذ پوست به یون‌ها را نشان می‌دهد.

توصیه می شود قبل از استفاده از این روش به‌عنوان یک روش معمول، آزمایشگاه توانایی خود را براساس OECD 430 (بند ۱۴ کتاب‌نامه) در آزمون مهارت درجه‌بندی ۱۲ ماده شیمیایی مندرج در جدول ۱ استاندارد مذکور، ارزیابی و تأیید کند.

ت-۲-۱-۲ روش اجرای آزمون

آزمون باید براساس دستورالعمل‌های معتبر موجود در آزمایشگاه انجام شود.

برای کسب اطلاعات دقیق در مورد اجرای آزمون به OECD 430 مراجعه شود.

ت-۲-۱-۳ نتایج آزمون

ت-۲-۱-۳-۱

نمونه برای پوست غیر تخریش‌زا در نظر گرفته می‌شود، اگر:

الف- میانگین مقدار TER به‌دست آمده برای نمونه بیشتر از ۵ KΩ باشد، یا

ب- میانگین مقدار TER به‌دست آمده برای نمونه کمتر یا مساوی ۵ KΩ باشد و

1- United Nations (UN) Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)

- بر روی دیسک‌های پوستی هیچ ضایعه قابل مشاهده‌ای (مانند سوراخ) وجود نداشته باشد، و
- میانگین رنگ دیسک کمتر از میانگین رنگ دیسک حاوی کنترل مثبت (Hcl 10M) باشد که همزمان با نمونه مورد آزمون قرار گرفته است.

ت-۲-۱-۳-۱

نمونه برای پوست تخریش‌زا در نظر گرفته می‌شود، اگر:
الف- میانگین مقدار TER به‌دست آمده برای نمونه کمتر یا مساوی ۵ KΩ باشد و
- دیسک‌های پوستی به‌طور قابل مشاهده‌ای دچار ضایعه (مانند سوراخ) شده باشند، یا
ب- میانگین مقدار TER به‌دست آمده برای نمونه کمتر یا مساوی ۵ KΩ باشد و
- بر روی دیسک‌های پوستی هیچ ضایعه قابل مشاهده‌ای (مانند سوراخ) وجود نداشته باشد، اما
- میانگین رنگ دیسک بیشتر یا معادل میانگین رنگ دیسک حاوی کنترل مثبت (Hcl 10M) باشد که همزمان با نمونه مورد آزمون قرار گرفته است.
یک آزمون باید حداقل با سه تکرار، یعنی سه دیسک پوستی برای هر نمونه انجام شود. در مواردی که نتایج نزدیک به مرز است، مانند نتایج غیریکسان در تکرارها و / یا میانگین‌های معادل ۵ KΩ ± ۰/۵ KΩ باید مجدداً یک آزمون مستقل انجام شود. در مواردی که نتایج بین دو آزمون انجام شده، ناهماهنگ باشد، انجام آزمون سوم ضروری است.

ت-۲-۳-۳ گزارش آزمون

گزارش آزمون باید جامع و در برگیرنده اطلاعات مربوط به نمونه مورد آزمون و کنترل یا کنترل‌های مورد استفاده، حیوان دهنده پوست (نوع، جنس، سن و شرایط نگهداری) جزئیات مربوط به تهیه دیسک پوستی، شرایط آزمون باشد. نتایج باید در قالب جدول گزارش شوند و نشان‌دهنده مقادیر مقاومت (بر حسب KΩ) و در صورت لزوم، مقادیر رنگ (برحسب µg/ دیسک) برای نمونه مورد آزمون و کنترل‌های مثبت و منفی و حاوی داده‌های مربوط به هر تکرار آزمون و مقادیر میانگین و انحراف معیارها باشد. ضایعات مشاهده شده در دیسک‌های پوستی باید برای هر نمونه گزارش شوند. همچنین شرایط آزمون، از جمله، دقت و قابلیت اعتماد آن، معیارهای ارزیابی و طبقه‌بندی و هرگونه اثر مشاهده شده باید در گزارش آزمون بیان شود.

ت-۲-۲ روش روپوست (اپیدرم) بازساخته شده انسانی[1] (RhE)

ت-۲-۲-۱ اساس آزمون

این روش آزمون بررسی برون‌تن تحریک‌زایی پوستی و اثر آن بر سلامت انسان با استفاده از اپیدرم (روپوست) بازسازی شده انسانی (RhE) است، که خواص فیزیکی و شیمیایی لایه رویی پوست را تقلید می‌کند. در این آزمون از کراتینوسیت‌های تمایزنیافته انسانی به عنوان منبع سلولی یک مدل اپیدرمی استفاده می‌شود که از نظر ساختار سلولی و بافتی شاخص سلول‌های انسانی است.

براساس یک مطالعه صحه‌گذاری با استفاده از ۶۰ ماده نشان داده شده که آزمون‌ها با مدل‌های پوست انسان قابلیت تمایز بین مواد تخریش‌زا با غیرتخریش‌زا را با حساسیت ٪۸۲ (۲۳ از ۲۸ مورد) و اختصاصی بودن ٪۸۴ (۲۷ از ۳۲ مورد) دارا می‌باشد. آزمون قابلیت تشخیص بین مواد بسیار تخریش‌زا و کم تخریش‌زا را نیز دارد، ولی برای بررسی تحریک‌زایی مواد و درجه‌بندی تخریش‌زایی مواد کاربرد ندارد.

کراتینوسیت‌های روپوست انسانی کشت داده می‌شوند تا یک "مدل چندلایه کاملاً تمایزیافته روپوست انسان[2]" تشکیل شود. این چندلایه شامل لایه اصلی، اسپینوس و لایه‌های گرانولی و لایه شاخی چند لایه حاوی لیپید لایه‌ای بین‌سلولی که شاخص کلاس‌های اصلی لیپیدی بدن است. نمونه مورد آزمون بر روی این مدل سه بعدی RhE گذاشته می‌شود. آزمون بر این اساس استوار است که مواد تخریش‌زا که دارای خاصیت سمیّت‌زایی سلولی هستند، می‌توانند از لایه‌های پوستی نفوذ کرده یا آنها را تخریب کنند.

در روش RhE زنده‌مانی سلول‌ها را می‌توان با تغییر رنگ حیاتی[3] به نمک فورمازان آبی[4] تعیین کرد، که به‌صورت کمّی پس از استخراج از بافت‌ها قابل اندازه‌گیری است.

مواد شیمیایی تخریش‌زا با کاهش زنده‌مانی[5] سلولی تا زیر حدآستانه[6] (کمتر یا مساوی ٪۵۰) مشخص می‌شوند.

توصیه می‌شود قبل از استفاده از روش RhE به‌عنوان یک روش معمول، آزمایشگاه توانایی خود را براساس OECD 431 (بند ۱۵ کتاب‌نامه) در آزمون مهارت درجه‌بندی ۱۲ ماده شیمیایی مندرج در جدول ۱ استاندارد مذکور، ارزیابی و تأیید کند.

1- Reconstructed human Epidermis (RhE)
2- Multilayered differentiated model of the human epidermis
3- 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Thiazolyl blue; CAS number 298-93-
4- Formosan Blue
5-Viability

۶ - مطابق طبقه‌بندی UN GHS درجه ۲

ت-۲-۲-۲ روش اجرای آزمون

مدل‌های آماده روپوست انسانی یا در بازار موجود است[1] و/یا باید در آزمایشگاه‌های آزمون ساخته شود.

توصیه می‌شود هر مدل جدید، حداقل با الزامات بند ۱۱ استاندارد OECD 431 (به مرجع شماره ۱۵کتابنامه مراجعه کنید) صحه‌گذاری شده و با شرایط بندهای ت-۲-۲-۲-۱ و ت-۲-۲-۲-۲ مطابقت داشته باشد.

ت-۲-۲-۲-۱ شرایط عمومی

برای بازسازی اپی‌تلیوم باید از کراتینوسیت‌های انسانی استفاده شود. سلول‌های اپی‌تلیال زنده (شامل لایه پایه، *استراتوم اسپینوزوم*[2]، *استراتوم گرانولوزوم*[3]) باید زیر لایه شاخی (*استراتوم کورنیوم*) باشند. *استراتوم کورنیوم* باید یک چندلایه حاوی پروفایل لیپیدهای پایه باشد تا بتواند یک سد عملکردی مناسب ایجاد کند تا بتواند نفوذ نشانگرهای شیمیایی سایتوتوکسیک (سدیم دودسیل سولفات (SDS) یا تریتون X-100) را نشان دهد. سد غشایی باید با تعیین غلظتی که نشانگر بتواند زنده‌مانی بافت‌ها را ٪۵۰ کاهش دهد، یا با تعیین زمان تماس لازم برای کاهش زنده‌مانی تا ٪۵۰ (ET_{50}) با یک غلظت ثابت، ارزیابی شود. مدل RhE مورد استفاده باید عاری از هرگونه آلودگی باکتریایی، ویروسی، مایکوپلاسمایی و قارچی باشد.

ت-۲-۲-۲-۲ شرایط عملکردی

میزان زنده‌مانی معمولاً با استفاده از رنگ MTT یا سایر رنگ‌های حیاتی اندازه‌گیری می‌شود. در این موارد چگالی نوری (OD) رنگ خارج شده از بافت‌های کنترل منفی باید حداقل ۲۰ برابر بزرگتر از OD حلّال باشد. بافت کنترل منفی باید در مدت زمان آزمون در کشت ثابت باشد تا تعیین مقادیر ثابت امکان‌پذیر گردد. ضخامت لایه *استراتوم کورنیوم* باید به‌حدی باشد که در برابر نفوذ سریع مواد شیمیاییِ نشانگر سمیّت (مانند تریتون X-100 ٪۱)، مقاومت کند. این خصوصیت را می‌توان با بررسی زمان تماس لازم برای کاهش زنده‌مانی سلول‌ها تا ٪۵۰ (ET_{50}) تعیین کرد (برای مثال، این زمان برای مدل‌های EpiDerm™ و EPISKIN™ موجود در بازار بیشتر از ۲ h است). تجدیدپذیری بافت باید در تمام مدت آزمون و ترجیحاً در مطالعات بین آزمایشگاهی نشان داده شود. علاوه براین، باید بتوان امکان تشخیص تخریش‌پذیری مواد شیمیایی آزمون مهارت مندرج در جدول ۱ استاندارد OECD 431 (طبق بند ۱۵ کتاب‌نامه) را با روش جدید اثبات نمود.

استانداردهای روش‌های اجرایی این روش تدوین شده توسط EC-ECVAM صحه‌گذاری شده و در دسترس است.

1- EpiDerm™, EPISKIN™
2- *Stratum spinosum*
3- *Stratum granulosum*

برای کسب اطلاعات دقیق در مورد اجرای آزمون به OECD 431 (طبق بند ۱۵ کتاب‌نامه) مراجعه کنید.

ت-۲-۳-۳ گزارش آزمون

گزارش آزمون باید جامع و در برگیرنده اطلاعات مربوط به نمونه مورد آزمون، روش برون‌تن مورد استفاده، مدل روپوست، مواد و کیت‌های تجاری و کنترل یا کنترل‌های مورد استفاده در قالب جدول و به‌صورت داده‌های مجزا برای هر تکرار نمونه و کنترل، شامل درصد زنده‌مانی سلولی (در استفاده از MTT) همراه با میانگین‌ها و انحراف استاندارد باشد. همچنین شرایط آزمون، از جمله، دقت و قابلیت اعتماد آن، معیارهای ارزیابی و طبقه‌بندی و هرگونه اثر مشاهده شده باید در گزارش آزمون بیان شود.

ت-۲-۳ روش سد غشایی

ت-۲-۳-۱ اساس آزمون

سیستم آزمون از دو جزء تشکیل شده است، یک سد بیولوژیک ماکرومولکولی سنتتیک و یک سیستم ردیابی شیمیایی[1] که شامل یک محلول شناساگر حساس در برابر تغییر در وجود مواد شیمیایی یا واکنش‌های الکتروشیمیایی است. اساس این آزمون، بررسی صدمه به سد غشایی ناشی از ماده مورد آزمون پس از تماس نمونه با سطح سدغشایی مصنوعی است، که بنظر می‌رسد، مشابه همان مکانیسمی باشد که موجب ایجاد تخریش بر روی پوست زنده می‌شود. نفوذ یا عبور از سدغشایی را می‌توان با روش‌های مختلف، مانند تغییر در رنگ یک شناساگر pH، یا با استفاده از سایر خواص محلول‌های شناساگر پشت سد بررسی نمود. سیستم اندازه‌گیری می‌تواند بصری یا الکترونیک باشد.

نتیجه به‌صورت زمان (دقیقه) سپری شده بین تماس نمونه مورد آزمون با سد غشایی و نفوذ به درون غشاء در مقایسه با کنترل یا کنترل‌های مثبت اعلام می‌شود.

سد غشایی باید صحه‌گذاری شده باشد، یعنی، قابلیت اعتماد و مرتبط بودن آن برای استفاده مورد نظر اثبات شده باشد. سدغشایی، محلول و شناساگر باید در آزمایشگاه تهیه شود یا بصورت آماده تجاری موجود است. که برای ارزیابی تخریش پوستی از کیت‌های آزمون صحه‌گذاری شده آماده مصرف موجود در بازار[2] می‌توان استفاده کرد.

ت-۲-۳-۲ روش اجرای آزمون

آزمون باید براساس دستورالعمل‌های معتبر موجود در آزمایشگاه انجام شود.

1- Chemical Detection System (CDS)

۲ - نمونه‌ای از این کیت‌ها شامل سد غشایی ®Corrositex است که صحه‌گذاری شده و روش اجرای آن در دستورالعمل‌های بین‌المللی (http://iccvam.niehs.nih.gov) قابل دسترسی است.

برای کسب اطلاعات دقیق در مورد اجرای آزمون به OECD 435 (طبق بند ۱۶کتاب‌نامه) مراجعه کنید.

ت-۲-۳-۳ گزارش آزمون

گزارش آزمون باید جامع و در برگیرنده اطلاعات مربوط به نمونه مورد آزمون، مدل سد غشایی و کنترل یا کنترل‌های مورد استفاده در قالب جدول و به‌صورت داده‌های مجزا برای هر تکرار نمونه و کنترل، شامل زمان (دقیقه) سپری شده بین تماس نمونه مورد آزمون با سد غشایی در مقایسه با کنترل یا کنترل‌های مثبت همراه با میانگین‌ها و انحراف استاندارد باشد. همچنین شرایط آزمون، از جمله، دقت و قابلیت اعتماد آن، معیارهای ارزیابی و طبقه‌بندی و هرگونه اثر مشاهده شده باید در گزارش آزمون بیان شود.

ت-۳ تحریک

ت-۳-۱ روش روپوست (اپیدرم) بازساخته شده انسانی (RhE)

ت-۳-۱-۱ اساس آزمون

این روش آزمون بررسی برون‌تن تحریک‌زایی پوستی و اثر آن بر سلامت انسان با استفاده از اپیدرم (روپوست) بازسازی شده انسانی (RhE) است، که خواص فیزیکی و شیمیایی لایه رویی پوست را تقلید می‌کند. در این آزمون از کراتینوسیت‌های تمایزنیافته انسانی به عنوان منبع سلولی یک مدل اپیدرمی استفاده می‌شود که از نظر ساختار سلولی و بافتی شاخص سلول‌های انسانی است.

کراتینوسیت‌های روپوست انسانی تهیه شده، و کشت داده می‌شوند تا یک "مدل چندلایه کاملاً تمایزیافته روپوست انسان" تشکیل شود. این چندلایه شامل لایه اصلی، اسپینوس و لایه‌های گرانولی و لایه شاخی چند لایه حاوی لیپید لایه‌ای بین‌سلولی که شاخص کلاس‌های اصلی لیپیدی بدن است. نمونه مورد آزمون بر روی این مدل سه بعدی RhE گذاشته می‌شود.

تحریک در پوست که عمدتاً به‌وسیله قرمزی و اِدم قابل تشخیص است، به‌واسطه محرک‌های شیمیایی حاصل از یک آبشار آنزیمی به‌وجود می‌آید که با نفوذ مواد شیمیایی از لایه شاخی (زیرلایه‌های کراتینوسیتی و سایر سلول‌های پوستی) صدمه دیده به خون ایجاد می‌شود. به این ترتیب که سلول‌های صدمه دیده، با آزاد کردن واسطه‌های التهابی یا تولید آبشار مواد التهابی، بر روی سلول‌های موجود در پوست، بخصوص استروما و سلول‌های اندوتلیال رگ‌های خونی اثر می‌گذارند. بنابراین، در روش‌های RhE، بدون ایجاد رگ‌زایی[1] در سیستم آزمون، می‌توان شروع آبشار التهابی، نظیر صدمه به سلول‌ها و بافت‌ها را با استفاده از زنده‌مانی سلول‌ها با یک سیستم خوانش تعیین کرد.

در روش‌های RhE زنده‌مانی سلول‌ها را می‌توان با تغییر رنگ حیاتی MTT به نمک فورمازان آبی تعیین کرد، که به‌صورت کمّی پس از استخراج از بافت‌ها قابل اندازه‌گیری است.

مواد شیمیایی تحریک‌زا قادرند زنده‌مانی سلولی را تا زیر حدآستانه[2] (کمتر یا مساوی ٪۵۰) کاهش دهند. براساس استانداردهای موجود[3] موادی که اثر آنها بر روی زنده‌مانی سلول‌ها بالاتر از ٪۵۰ باشد، تحریک‌زا محسوب نمی‌شوند.

---

1 Angiogenesis

۲ - مطابق طبقه‌بندی UN GHS درجه ۲

3- OECD 439

ت-۳-۱-۲ روش اجرای آزمون

آزمون باید براساس دستورالعمل‌های معتبر موجود در آزمایشگاه انجام شود.

دستورالعمل مربوط به چهار روش آزمون موجود در بازار و مستندات مربوط به صحه‌گذاری آنها در استاندارد OECD 439 (طبق بند ۱۷کتاب‌نامه) بیان شده است.

استانداردهای روش‌های اجرایی این روش تدوین شده توسط EC-ECVAM صحه‌گذاری شده و در دسترس است.

ت-۳ گزارش آزمون

در نتایج آزمون باید روش برون‌تن مورد استفاده بیان شود.

گزارش آزمون باید جامع و در برگیرنده اطلاعات مربوط به نمونه مورد آزمون، روش برون‌تن مورد استفاده، مدل روپوست، مواد و کیت‌های تجاری و کنترل یا کنترل‌های مورد استفاده در قالب جدول و به‌صورت داده‌های مجزا برای هر تکرار نمونه و کنترل، شامل درصد زنده‌مانی سلولی (در استفاده از MTT) همراه با میانگین‌ها و انحراف استاندارد باشد. همچنین شرایط آزمون، از جمله، دقت و قابلیت اعتماد آن، معیارهای ارزیابی و طبقه‌بندی و هرگونه اثر مشاهده شده باید در گزارش آزمون بیان شود.

پیوست ث

(الزامی)

روش آزمون‌های بررسی حساسیت‌زایی

ث-۱ کلیات

حساسیت‌زایی در حال‌حاضر فقط به‌وسیله آزمون‌های درون‌تن، انجام‌پذیر است، که شامل آزمون غدد لنفاوی موضعی[1] (LLNA) در موش، پچ تست بسته[2] یا آزمون بیشینه‌سازی[3] (GPMT) می‌باشد.

برای بررسی حساسیت‌زایی با دو روش پچ تست یا خوکچه هندی حیوان انتخابی است. در آزمون پچ تست بسته، نمونه بدون اجوانت در تماس با پوست قرار می‌گیرد، در حالی‌که در آزمون بیشینه‌سازی، با تزریق نمونه همراه اجووانت کامل فروند (FCA) حساسیت تحریک می‌شود. روش آزمون غدد لنفاوی موضعی با استفاده از تزریق در موش و جداسازی و شمارش لنفوسیت‌ها انجام می‌شود.

ث-۲ روش پچ تست بسته

ث-۲-۱ اساس آزمون

آزمونه مرطوب شده با آب یا حامل مناسب دیگر، روی قسمت پشت خوکچه‌های هندی که موی آن یک روز قبل تراشیده شده، گذاشته شده و با استفاده از وسیله مناسب مثل گاز یا چسب ضدحساسیت‌زا بسته شده و به مدت ۶ h در تماس با پوست حیوان قرار می‌گیرد. پس از پایان زمان آزمون، محل تماس با آزمونه، از نظر وجود سرخی و ادم مورد بررسی قرار می‌گیرد. آزمون در روز صفر انجام شده و در روزهای ششم تا هشتم، و سیزدهم تا پانزدهم تکرار می‌شود و نتیجه نهایی حساسیت‌زایی در پایان مدت ۳ هفته تفسیر می‌شود. درصورت‌نیاز، مواجهه مجدد در روزهای ۲۷ تا ۲۹ تکرار می‌شود.

در صورت ایجاد علائم شدید حساسیت، آزمون بر روی حیوان متوقف می‌شود.

ث-۲-۲ انتخاب حیوان

از خوکچه هندی آلبینو بالغ سالم نر و یا ماده از هر جنس به وزن ۳۰۰g تا ۵۰۰g به‌عنوان حیوان مورد آزمون استفاده کنید. اگر از حیوانات ماده استفاده می‌شود، باید زاد و ولد نکرده و حامله نباشند.

1- Local Lymph Node Assay (LLNA)
2- The occluded patch test
3- The Guinea Pig Maximization Test

از ۲۰ حیوان در گروه تیمار و ۱۰ حیوان در گروه کنترل استفاده کنید. می‌توان از حداقل ۱۰ حیوان برای گروه آزمون، و ۵ حیوان برای گروه کنترل استفاده کرد، ولی اگر با حداقل تعداد حیوان نتیجه مبنی بر حساسیت‌زا بودن یا نبودن نمونه، به‌دست نیاید، آزمون باید روی گروه دیگری از حیوانات ادامه یابد، تا تعداد کل حیوانات آزمون ۲۰ و حیوانات کنترل۱۰ شود.

ث-۲-۳ شرایط نگهداری و تغذیه حیوانات آزمون

حیوانات را در قفس‌های جداگانه نگهداری کنید. دمای اتاق نگهداری خوکچه‌ها باید ۲۰°C ± ۳ °C باشد. رطوبت نسبی اتاق باید حداقل٪۳۰ و ترجیحاً ٪۶۰-٪۵۰ بوده و بجز در زمان شستشو بالاتر از٪۷۰ نشود. در اتاق حیوانات باید از نور مصنوعی، و با تناوب روشنایی و تاریکی ۱۲ h استفاده شود. برای تغذیه حیوانات، از رژیم معمول آزمایشگاه، همراه با میزان نامحدود آب استفاده کنید. در رژیم غذایی خوکچه‌های هندی باید مقدار کافی آسکوربیک اسید وجود داشته باشد.

حیوانات باید حداقل از ۵ روز قبل از آزمون با شرایط آزمایشگاه خو گرفته باشند. قبل از آزمون، حیوانات را بطور تصادفی در گروه‌های تیمار و کنترل تقسیم کنید. تقریباً ۲۴ h قبل از آزمون، موی ناحیه پشتی حیوانات را تراشیده یا با مواد شیمیایی بزدایید، و دقت کنید که به پوست صدمه‌ای وارد نشود. فقط حیوانات سالم با پوست سالم (صدمه ندیده) باید مورد استفاده قرار گیرند.

ث-۲-۴ روش اجرای آزمون

ث-۲-۴-۱ تحریک: تماس موضعی

- روز صفر: گروه تیمار

موهای ناحیه‌ای در پشت حیوان را بزدایید. قطعه‌ای از منسوج مرطوب شده با آب یا حامل مناسب دیگر را روی این ناحیه بگذارید تا به مدت ۶ ساعت کاملاً در تماس با پوست قرار گیرد. منسوج می‌تواند به‌شکل گرد یا مربع و سطح آن حدود ۴ cm^2 -۷ cm^2 باشد.

- روز صفر: گروه کنترل

مطابق گروه تیمار، منسوج کنترل مرطوب شده با آب را روی ناحیه‌ای که موی آن زدوده شده بگذارید تا به مدتh ۶ کاملاً در تماس با پوست قرار گیرد. اگر اثبات شده باشد که نیازی به منسوج کنترل نیست، می‌توان از یک گروه کنترل بدون منسوج کنترل[1] استفاده کرد.

پچ تست باید کاملاً بسته[2] باشد و با وسیله مناسبی روی بدن حیوان محکم شود. برای این منظور می‌توان از قید استفاده کرد تا حرکت حیوان باعث باز شدن آن نشود.

1- Naive control group
2- Oocclusive patch

یادآوری- منظور از بسته شدن اینست که هوا به پوست نرسیده، و رطوبت، حرارت، مایعات بدن و ماده در تماس با پوست، زیر بسته کاملاً حفظ شود. این پچ می‌تواند لایه نازکی از پلاستیک باشد که با چسب به پوست بچسبد.

- روزهای ۶ تا ۸ و ۱۳ تا ۱۵: گروه‌های تیمار و کنترل

در روزهای ششم تا هشتم، و روزهای سیزدهم تا پانزدهم، آزمون را مانند روز صفر روی همان ناحیه‌ها تکرار کنید. در صورت لزوم، قبل از آزمون، مجدداً موهای نواحی تماس یزدایید.

پچ‌ها را با وسیله مناسبی روی بدن حیوانات محکم کنید.

ث-۲-۴-۲ مواجهه[1]

- روزهای ۲۷ تا ۲۹: گروه‌های تیمار و کنترل

آزمون را مانند روز صفر، با گذاشتن منسوج آزمون به مدت شش ساعت، بر روی قسمتی از پوست پشت حیوانات گروه‌های تیمار که در آزمون قبلی مورد استفاده قرار نگرفته، تکرار کنید. موهای ناحیه مورد تماس را قبل از آزمون بزدایید.

مطابق گروه تیمار، منسوج کنترل مرطوب شده با آب را روی ناحیه‌ای که موی آن زدوده شده بگذارید تا به مدت۶ h کاملاً در تماس با پوست قرار گیرد.

یادآوری- در صورت لزوم، می‌توانید منسوجآزمون و کنترل را به مدت شش ساعت، روی قسمت شکمی حیوانات گروه‌های تیمار و کنترل که در آزمون قبلی مورد استفاده قرار نگرفته است، قرار دهید.

پچ‌ها را با وسیله مناسبی روی بدن حیوانات محکم کنید.

ث-۲-۵ مشاهدات

در هر بار آزمون تقریباً ۲۱ h پس از برداشتن وصله‌ها، ناحیه تماس را خوب تمیز کرده و در صورت لزوم، موهای آن را بزدایید. تقریباً ۳ h بعد (حدوداً ۳۰ ساعت پس از شروع آزمون مواجهه) واکنش‌های پوستی را بررسی نموده و براساس جدول ث-۱ درجه‌بندی کنید.

تقریباً ۲۴ h پس از مشاهده اول، (۵۴ h پس از شروع آزمون)، مجدداً محل آزمون را مشاهده و درجات واکنش را ثبت کنید.

توصیه می‌شود بررسی واکنش‌های تیمار و کنترل به‌صورت تصادفی (بدون دانستن آنکه کدام مربوط به نمونه و کدام کنترل است،) انجام شود.

1- Challenge

جدول ث- ۱ – درجه‌بندی مگنسون و کلیگمن[1] برای ارزیابی واکنش‌های حاصل از آزمون مواجهه با پچ

میزان و نوع تغییر	درجه
بدون تغییر	۰
قرمزی واضح یا تکه‌ای	۱
قرمزی متوسط و پخش شونده	۲
قرمزی شدید و بادکردگی	۳

ث-۲-۵-۱ تماس مجدد

درصورت لزوم برای تأیید و مشخص کردن نتایج، بهتر است مواجهه مجدد با استفاده از گروه کنترل اولیه یا یک گروه کنترل جدید تقریباً یک هفته پس از اولین مواجهه انجام شود.

ث-۲-۵-۲مشاهدات بالینی تکمیلی

تمام واکنش‌های پوستی و هر یافته غیرمعمول دیگر، که ممکن است ناشی از روش‌های آزمون و مواجهه باشد، باید ثبت شود. می‌توان از سایر بررسی‌ها، مثل بررسی‌های بافت‌شناسی، اندازه‌گیری ضخامت پوست نیز برای روشن شدن نتایج مشکوک استفاده کرد.

ث-۳ روش اجرای آزمون بیشینه‌سازی

ث-۳-۱ اساس آزمون

حیوانات مورد آزمون در یک دوره زمانی ۱۰ تا ۱۴ روزه که در طی آن پاسخ‌های ایمنی ایجاد می‌شود، به‌وسیله تزریق داخل جلدی و یا تماس در معرض یک دوز نمونه قرار داده شده و پس از این مدت زمان، شدت و درجه واکنش‌های پوستی بررسی شده و حیوانات آزمون با حیوانات کنترل مقایسه می‌شوند.

ث-۳-۲ تحریک سیستم ایمنی: تزریق‌های داخل جلدی

یادآوری- در صورتی‌که تهیه یک محلول تزریقی از منسوج نمونه به ابعاد cm ۴ در cm ۲ در یک حلال یا حامل مناسب، امکان‌پذیر باشد، تحریک سیستم ایمنی با استفاده از تزریق داخل جلدی قابل انجام است، در غیر اینصورت، فقط از روش تحریک سیستم ایمنی با تماس جلدی استفاده کنید.

- روز صفر: گروه آزمون

سه جفت تزریق حاوی ml ۰٫۱ از محلول‌های تهیه شده از منسوج نمونه، به شرح زیر، در محل شانه حیوان، که موی آن زدوده شده (هر سری از جفت تزریق‌ها در یک طرف بدن)، انجام دهید.

1- Magusson and Kligman grading scale

- یک مخلوط ۱:۱ (حجم به حجم) از آب یا سالین فیزیولوژیک در FCA
- نمونه حل شده در حامل مناسب (ترجیحاً آب) بدون FCA
- نمونه حل شده در مخلوط ۱:۱ (حجم به حجم) از آب یا سالین فیزیولوژیک در FCA

یادآوری- نمونه‌های قابل‌حل در آب، باید ابتدا در آب حل شده و سپس FCA به آن اضافه شود یا نسبت ۱:۱ بدست آید، در حالیکه نمونه‌های قابل حل در چربی باید ابتدا در FCA حل شده و سپس با آب به نسبت ۱:۱ می‌رسند.

تزریق‌های ۱ و۲ باید نزدیک هم و نزدیک به سر باشند، در حالیکه تزریق ۳ باید نزدیک به دم حیوان باشد.

- روز صفر: گروه کنترل

سه جفت تزریق حاوی ۰٫۱ ml از محلول‌ها، به شرح زیر، در محل شانه حیوان، که موی آن زدوده شده (هر سری از جفت تزریق‌ها در یک طرف بدن)، انجام دهید.

- یک مخلوط ۱:۱ (حجم به حجم) از آب یا سالین فیزیولوژیک در FCA
- حامل بکار رفته برای حل کردن نمونه بدون رقیق شدن (ترجیحاً آب)، بدونFCA
- مخلوط٪۵۰ (وزن به حجم) حامل در مخلوط ۱:۱(حجم به حجم) از آب یا سالین فیزیولوژیک در FCA.

ث-۳-۳ تحریک سیستم ایمنی: تماس جلدی

- روزهای ۷-۵: گروه‌های تیمار و کنترل

تقریباً ۲۴ h قبل از تماس موضعی، نمونه را، اگر تحریک‌زای پوستی نیست، روی محل آزمون (قسمت تراشیده شده پوست) با ۰٫۵ ml سدیم لوریل سولفات ٪۱۰در وازلین بمالید، تا تحریک موضعی ایجاد شود.

- روزهای ۸-۶: گروه تیمار

موهای همان محل را دوباره بزدایید. منسوج نمونه به ابعاد ۴ cm در ۲ cm را (مرطوب شده با یک حامل مناسب، ترجیحاً آب)، روی موضع گذاشته و با یک پوشش مناسب به مدت ۴۸ h ببندید.

- روزهای ۸-۶: گروه کنترل

موهای همان محل را دوباره بزدایید. منسوج کنترل به ابعاد ۴ cm در ۲cm را (مرطوب شده با یک حامل مناسب، ترجیحاً آب)، روی موضع گذاشته و با یک پوشش مناسب به مدت ۴۸ h ببندید.

ث-۳-۴ تماس موضعی

- روزهای ۲۲-۲۰: گروه‌های تیمار و کنترل

موهای نواحی اطراف موضع تماس در حیوانات تیمار و کنترل را زدوده، منسوج مورد آزمون را که با آب یا حامل مناسب دیگر مرطوب شده، روی بدن حیوان بگذارید. در قسمت دیگر، منسوج کنترل مرطوب شده را گذاشته و هر دو پچ را با وسیله مناسبی روی بدن محکم کنید. پچ‌ها باید به مدت ۲۴ h در تماس با پوست حیوان باشند.

ث-۳-۵ مشاهدات

تقریباً ۲۱ h پس از برداشتن پچ‌ها، نواحی تماس را خوب تمیز کرده و در صورت لزوم، موهای آن را بزدایید.

تقریباً ۳ h بعد (حدوداً ۴۸ h پس از شروع آزمون مواجهه) واکنش‌های پوستی را بررسی نموده و براساس جدول ث-۱ درجه‌بندی کنید.

تقریباً ۲۴ h پس از مشاهده اول، (۷۲ h پس از شروع آزمون)، مجدداً محل آزمون را مشاهده و درجات واکنش را ثبت کنید.

توصیه می‌شود بررسی واکنش‌های تیمار و کنترل بصورت تصادفی (بدون دانستن آنکه کدام مربوط به نمونه و کدام کنترل است،) انجام شود.

ث-۳-۵-۱ تماس مجدد

درصورت لزوم برای تأیید و مشخص کردن نتایج، بهتر است تماس مجدد با استفاده از گروه کنترل اولیه یا یک گروه کنترل جدید تقریباً یک هفته پس از اولین مواجهه انجام شود.

ث-۳-۵-۲ مشاهدات بالینی تکمیلی

تمام واکنش‌های پوستی و هر یافته غیرمعمول دیگر، که ممکن است ناشی از روش‌های تحریک و مواجهه باشد، باید ثبت شود. می‌توان از سایر بررسی‌ها، مثل بررسی‌های بافت‌شناسی، اندازه‌گیری ضخامت پوست نیز برای روشن شدن نتایج مشکوک استفاده کرد.

ث-۴ آزمون غدد لنفاوی موضعی (LLNA)

ث-۵-۱ کلیات

آزمون LLNA یک روش جایگزین برای تشخیص احتمال حساسیت‌زایی مواد است. با این روش می‌توان حساسیت‌زا بودن یا نبودن مواد را تعیین نمود. البته قبل از انتخاب این روش، باید ماهیت ماده مورد آزمون، خصوصیات فیزیکوشیمیایی آن و نتایج حاصل ازسایر مطالعات توکسیستی درون‌تن و برون‌تن، مد نظر قرار گیرد.

در این روش، فاز تحریک از مراحل حساسیت‌زایی بررسی می‌شود، و مواد حساسیت‌زای ملایم تا متوسط که در آزمون‌های درون‌تن بر روی خوکچه‌ها بعنوان کنترل مثبت استفاده می‌شوند، در این روش نیز می‌توانند به‌عنوان کنترل مثبت به‌کار روند.

یک روش کاهش یافته (rLLNA) نیز که در آن تعداد حیوانات تا ٪۴۰ کاهش می‌یابد در OECD 429 شرح داده شده است.

این آزمون، یک روش درون‌تن است، گرچه حیوانات از آزمون حذف نمی‌شوند، ولی حداقل درد و رنج ناشی از گذاشتن وصله و اثرات پوستی آن کاهش یافته و می‌توان تعداد حیوانات را نیز در این آزمون کاهش داد. این آزمون براساس وقایع ایمونولوژیکی است که در فاز تحریک به‌دلیل تأثیر ماده مورد آزمون ایجاد می‌شود.

محدودیت‌های روش LLNA شامل نتایج منفی کاذب حاصل از برخی فلزات، نتایج مثبت کاذب ناشی از برخی از محرک‌های پوستی مثل بعضی مواد شیمیایی فعال در سطح، یا حلالیت مواد آزمون است.

ث-۵-۲ اساس آزمون

آزمون LLNA براین اساس است که مواد حساسیت‌زا می‌توانند موجب تحریک لنفوسیت‌ها در غدد لنفاوی ناحیه‌ای که در معرض تماس با ماده مورد آزمون بوده، شوند. تکثیر لنفوسیت‌ها به‌وسیله مقایسه میانگین تعداد لنفوسیت‌های گروه‌های تیمار با میانگین تعداد لنفوسیت‌ها در گروه کنترل و تعیین نسبت آنها به‌عنوان شاخص تحریک[1] (SI) انجام می‌شود. اگر ضریب تحریک بیشتر یا مساوی ۳ باشد، ماده حساسیت‌زا محسوب می‌شود. در روشی که در اینجا شرح داده شده، با استفاده درون‌تن از مواد رادیواکتیو برای نشاندار کردن لنفوسیت‌های تکثیر شده، می‌توان تعداد آنها را در غدد لنفاوی موضع شمارش کرد. غیر از استفاده از مواد رادیواکتیو، می‌توان از روش‌های دیگر نیز برای نشاندار کردن لنفوسیت‌ها بهره برد.

ث-۵-۳ روش اجرای آزمون

ث-۵-۳-۱ انتخاب حیوان

برای این آزمون، موش حیوان انتخابی است. از موش‌های ماده بالغ جوان از نژاد CBA/Ca یا CBA/J می‌توان استفاده کرد. حیوانات باید زاد و ولد نکرده و حامله نباشند. در شروع آزمون، سن حیوانات باید بین ۸ تا ۱۲ هفته بوده و تغییرات وزن باید به حداقل رسیده و بیش از ٪۲۰ میانگین وزن نباشد. از سایر نژادها و یا جنس نر نیز، به شرط وجود دلایل منطقی می‌توان استفاده کرد.

موش‌ها را باید گروهی در قفس‌ها نگهداری کنید، مگر انکه دلایلی موجود باشد که باید آنها را به تنهایی نگهداری نمود. دمای اتاق نگهداری موش‌ها باید ۲۲ °C ± ۳ °C باشد. رطوبت نسبی اتاق باید حداقل٪۳۰ و

1- Stimulation Index (SI)

ترجیحاً ٪۶۰-٪۵۰ بوده و بجز در زمان شستشو، بالاتر از ٪۷۰ نشود. در اتاق حیوانات باید از نور مصنوعی، و با تناوب روشنایی و تاریکی h ۱۲ استفاده کنید. برای تغذیه حیوانات، از رژیم معمول آزمایشگاه، همراه با میزان نامحدود آب می‌توان استفاده کرد.

ث-۵-۳-۲ آماده‌سازی حیوانات

حیوانات باید بطور تصادفی انتخاب شده و به مدت حداقل ۵ روز قبل از آزمون با شرایط آزمایشگاه خو گرفته باشند.

قبل از آزمون باید همه حیوانات بررسی شوند تا اطمینان حاصل شود که هیچگونه ضایعه پوستی قابل مشاهده ندارند.

ث-۵-۳-۳ آماده‌سازی آزمونه

منسوج به ابعاد cm ۴ در cm ۲ مورد آزمون باید در یک حلال یا حامل مناسب سوسپانسیون شده و حل شوند. نمونه‌های غیرمحلول، باید استخراج شوند تا تمام اجزای قابل استخراج آنها در دسترس قرار گیرد. انتخاب حامل یا حلال و آماده‌سازی آزمونه باید براساس شرایط و دستورالعمل‌های معتبر آزمایشگاه انجام شود.

حلال یا حامل نباید در نتایج آزمون تداخل یا اریبی[1] ایجاد کند و باید با توجه به حداکثر قابلیت حلالیت و ایجاد بالاترین غلظت از نمونه انتخاب شود.

حامل‌های توصیه شده شامل روغن زیتون (نسبت حجمی ۱ به ۴)، n-دی‌متیل‌فرمامید[2]، متیل‌اتیل‌کتون[3]، پروپیلن گلیکول[4]، و دی‌متیل سولفوکسید[5] هستند، ولی از سایر حامل‌های مناسب نیز می‌توان استفاده کرد.

در مورد نمونه‌های آب‌دوست، توصیه می‌شود از حامل‌هایی استفاده شود که قابلیت حلالیت مناسب داشته، پوست را مرطوب کرده، ولی سریع تبخیر نشده و از بین نمی‌روند. بنابراین بهتر است از حامل‌های کاملاً آبی پرهیز شود. هر نمونه باید همان روز آزمون آماده شود، مگر اینکه یافته‌ها و سوابق مربوط به پایداری نمونه، نشان دهد که نگهداری نمونه در مدت زمان مشخص، قابل قبول بوده و تغییری در حساسیت‌زایی آن بوجود نمی‌آورد.

ث-۵-۳-۴ تعداد حیوانات و میزان نمونه

حداقل ۴ حیوان برای گروه آزمون و ۴ حیوان برای گروه کنترل منفی (NC) استفاده کنید.

1- Bias
2- N,N-dimethylformamide
3- Methyl ethyl ketone
4- Propylene glycol
5- Dimethyl sulphoxide

گروه کنترل مثبت (PC) براساس راهبردهای آزمایشگاه و با در نظر گرفتن قابلیت اعتماد و عملکرد مناسب روش با نشان دادن پاسخ‌های مناسب و تجدیدپذیر در فواصل زمانی مناسب تعیین شده توسط آزمایشگاه به‌کار می‌رود.

برای راهنمایی بیشتر به استاندارد OECD TG 429 (طبق بند ۱۳کتاب‌نامه) مراجعه کنید.

آزمون و کار با حیوانات گروه‌های کنترل دقیقاً مانند گروه تیمار انجام می‌شود.

ث-۵-۳-۵ تزریق

- **روز اول: گروه‌های تیمار و کنترل**

قبل از شروع آزمون، هر حیوان را باید توزین کرده، وزن و هر گونه علائم بالینی مشاهده شده را ثبت کنید. در گروه تیمار، ۲۵ µl از آزمونه تهیه شده، و در گروه کنترل منفی، ۲۵ µl از حامل را در ناحیه پشت گوش هر حیوان تزریق کنید.

- **روزهای ۲ و ۳: گروه‌های تیمار و کنترل**

آزمون را مانند روز اول تکرار کنید.

- **روزهای ۴ و ۵: گروه‌های تیمار و کنترل**

هیچ تیماری انجام ندهید.

- **روز ۶: گروه‌های تیمار و کنترل**

هر حیوان را توزین و وزن آن را ثبت کنید. به همه موش‌های گروه‌های کنترل و تیمار، ۲۵۰µl از فسفات بافر سالین (PBS) استریل حاوی ۲۰µCi (۷٫۴ × ۱۰^{5} Bq) 3H- متیل تیمدین[1] از طریق دم تزریق کنید. می‌توان ۲۵۰µl از فسفات بافر سالین (PBS) استریل حاوی ۲µCi (۷٫۴ × ۱۰$_{5}$ Bq) ۱۲۵-یدودِاکسی‌اوریدین و ۱۰^{5} M فلورودِاکسی‌اوریدین را از طریق دم به همه موش‌های گروه‌های کنترل و تیمار تزریق کرد. بعد از پنج ساعت، موش‌ها با روش اخلاقی کشته شده، لنفوسیت‌های غدد لنفاوی هر دو طرف هر حیوان بطور جداگانه[2]، یا مخلوط لنفوسیت‌های هر دو طرف مربوط به همه حیوانات در هر گروه تیمار یا کنترل[3] را در PBS سوسپانسیون کنید.

یادآوری- برای کسب اطلاعات بیشتر در مورد دیاگرام و جزئیات شناسایی و برداشتن غدد لنفاوی می‌توان از منابع معتبر و OECDTG429 استفاده کرد.

1- Tritiated (3H)-methyl thymidine
2- Individual animal approach
3- Pooled treatment group approach

پایش پاسخ‌های موضعی پوستی و بررسی پارامترهای دیگر مثل، درجه‌بندی سرخی یا ندازه‌گیری ضخامت گوش می‌تواند در بررسی نتایج آزمون مؤثر باشد.

سوسپانسیون سلول‌های غدد لنفاوی[1] (LNC) را جمع‌آوری کنید. مخلوط لنفوسیت‌ها را، با تکان دادن ملایم و عبور از صافی استنلس استیل با قطر منافذ ۲۰۰μm یا هر وسیله مناسب دیگر، باز کرده و یک سوسپانسیون یکنواخت به‌دست آورید. سپس LNCها را دو بار با PBS شسته و DNA را با تری‌کلرواستیک اسید (TCA) در ۴ °C به مدت ۱۸ h رسوب دهید. رسوب جمع‌آوری شده را یا در ۱ ml TCA سوسپانسیون کرده و به ویال‌های سنتیلاسیون[2] حاوی ۱۰ ml مایع سنتیلاسیون برای شمارش ^{3}H منتقل کرده، یا مستقیماً به تیوب‌های شمارش گاما برای شمارش ^{125}I انتقال دهید.

ث-۵-۳-۶ تعیین میزان تکثیر سلولی (مجموع فعالیت رادیواکتیویتی)

جمع ^{3}H – متیل تیمدین با شمارش β- سنتیلاسیون به‌صورت از هم پاشیدگی در دقیقه[3] (DPM) شمارش می‌شود. پیوستگی یا تلفیق ۱۲۵- یدودِاکسی‌اوریدین با شمارش ^{125}I تعیین شده و به‌صورت DPM بیان می‌شود. براساس روش جمع‌آوری لنفوسیت‌ها، نتیجه به‌صورت DPM به ازای هر موش یا DPM به ازای هر گروه تیمار بیان می‌شود.

برای کسب اطلاعات بیشتر درمورد نحوه محاسبات و تفسیر نتایج و قابلیت اعتماد روش به استاندارد OECD 429 مراجعه کنید.

ث-۶ گزارش آزمون

گزارش آزمون باید جامع و در برگیرنده اطلاعات مربوط به نمونه، ماده مرطوب کننده (حامل)، حیوانات مورد استفاده در آزمون و نتایج حاصل باشد.

نتایج آزمون باید به شکل جدول خلاصه شده برای هر گروه ثبت و نگهداری شود. تعداد حیوانات در شروع آزمون، زمان مرگ هر حیوان، تعداد حیواناتی که علائم حساسیت نشان داده‌اند، شرح مشاهدات پوستی و میزان فعالیت رادیواکتیویتی (در مورد روش LLNA) و سایر یافته‌ها باید ثبت شود.

1- Lymph node cells (LNC)
2- Scintillation vials
3- Disintegrations per minute (DPM)

پیوست ج

(الزامی)

روش آزمون بررسی سمیّت پوستی

ج-۱ اساس آزمون

نمونه بر روی پوست تعدادی از حیوانات مورد آزمون تماس داده می‌شود. سپس، اثرات سمّی و مرگ احتمالی حیوانات بررسی می‌شود. حیواناتی که در حین آزمون می‌میرند، کالبدگشایی شده و سایر حیوانات نیز در پایان مدت زمان آزمون، کشته و کالبدگشایی می‌شوند. حیواناتی که علائم شدید و پایدار درد و رنج نشان می‌دهند، به‌طور اخلاقی کشته می‌شوند.

ج-۲ روش اجرای آزمون

ج-۲-۱ انتخاب حیوان

از هر دو جنس رت، خرگوش یا خوکچه هندی بالغ سالم می‌توان استفاده کرد. وزن رت‌ها ۲۰۰g تا ۴۵۰g، وزن خرگوش‌ها ۲ kg تا ۳ kg، و خوکچه هندی به وزن ۳۵۰g تا ۴۵۰g باید باشد. پوست حیوانات آزمون باید سالم و دست نخورده باشد.

در هر گروه باید از حداقل ۵ حیوان از یک جنس استفاده شود. برای هر جنس یک گروه ۵ تایی برای نمونه استفاه می‌شود. حیوانات ماده، باید حامله نبوده و اصلاً زایمان نکرده باشند. در برخی موارد می‌توان به شرط وجود دلیایل منطقی از تعداد کمتر حیوان استفاده کرد. در صورت وجود اطلاعاتی مبنی بر حساس‌تر بودن یکی از جنس‌ها، آن جنس باید مورد آزمون قرار گیرد.

ج-۲-۲ شرایط نگهداری و تغذیه حیوانات آزمون

حیوانات را باید در قفس‌های جداگانه نگهداری کنید. دمای اتاق نگهداری جوندگان باید ۲۲ °C ± ۳ °C و دمای اتاق خرگوش‌ها باید ۲۰°C ± ۳ °C باشد. رطوبت نسبی اتاق باید حداقل ٪۳۰ و ترجیحاً ٪۶۰-٪۵۰ بوده و بجز در زمان شستشو بالاتر از ٪۷۰ نشود. در اتاق حیوانات باید از نور مصنوعی، و با تناوب روشنایی و تاریکی ۱۲ h استفاده کنید. برای تغذیه حیوانات، از رژیم معمول آزمایشگاه، همراه با میزان نامحدود آب می‌توان استفاده کرد.

ج-۲-۳ آماده کردن حیوانات آزمون

حیوانات بالغ سالم که به مدت حداقل ۵ روز به شرایط آزمایشگاه خو گرفته‌اند، در آزمون مورد استفاده قرار می‌گیرند. قبل از آزمون، حیوانات را به‌طور تصادفی در گروه‌های آزمون و کنترل تقسیم کنید. تقریباً ۲۴ h قبل از آزمون، موی ناحیه پشتی حیوانات را بزدایید. باید دقت شود که پوست حیوانات صدمه نبینند که موجب تغییر در قابلیت نفوذ پوست می‌شود. ناحیه مورد استفاده برای آزمون باید با در نظر گرفتن وزن حیوان و ابعاد آزمونه و پوشش رویی انتخاب شده و حداقل ٪۱۰پوست حیوان باشد.

منسوج نمونه مورد آزمون باید با آب، یا در صورت لزوم با حامل مناسب دیگر (که تأثیر احتمالی آن بر التهاب پوستی حداقل است)، کاملاً مرطوب شده تا تماس کامل با پوست برقرار شود. در صورت استفاده از یک حامل، باید اثر آن بر قابلیت نفوذپذیری پوست در نظر گرفته شود.

ج-۲-۴ روش اجرای آزمون

یک مربع ۲٫۵ cm × ۲٫۵ cm ازمنسوج، یا مقداری معادل ۲ g به ازای هر کیلوگرم وزن بدن حیوان را در دو گروه نر و ماده، هر گروه شامل ۵ حیوان روی ناحیه‌ای موی آن زدوده شده، که حدود ٪۱۰ سطح بدن حیوان است، بگذارید و با یک گاز زخم‌بندی بسته و با چسبی که تحریک‌زا نیست، برای مدت ۲۴ h ثابت کنید.

آزمونه را باید طوری ببندید که زیاد محکم نبوده، ودر مدت زمان آزمون کاملاً با پوست در تماس باشد. حیوان نباید به ناحیه مورد آزمون، یا آزمونه دسترسی داشته باشد، تا بتواند آن را خورده یا باز کند.

در پایان مدت تماس، منسوج را بردارید و محل آزمون را با آب یا محلول شستشوی مناسب دیگر، بدون ایجاد تغییر در پاسخ مشاهده شده یا اپیدرم بشویید.

ج-۲-۵ مشاهدات بالینی

گرچه مدت زمان آزمون ثابت نیست و به واکنش‌های توکسیک مشاهده شده، زمان شروع و طول مدت زمان بهبودی ارتباط دارد، ولی مشاهدات حداقل باید به مدت ۱۴ روز انجام شود. زمان مشاهده علائم توکسیسیتی و ناپدید شدن آنها، طول آن و زمان مرگ از اهمیت برخوردار است، به خصوص اگر بنظر برسد که زمان مرگ به تأخیر می‌افتد.

مشاهدات باید در اولین روز و سپس با فواصل زمانی مناسب، حداقل روزی یکبار انجام شود. حیواناتی که در طول آزمون مرده‌اند، باید جدا شده و در یخچال نگهداری شده یا همان زمان کالبدگشایی شوند، همچنین حیواناتی که ضعیف شده یا در حال مرگ هستند، باید کشته شوند. مشاهدات از بیرون قفس نیز شامل تغییر در مو، چشم‌ها و غشاهای مخاطی حیوانات و نیز تنفس، گردش خون و سیستم عصبی خودکار و مرکزی و فعالیت‌های سوماتیک و الگوی رفتاری آنها است. به علائمی نظیر لرزش، تشنج، ترشح بزاق، اسهال، رخوت و خواب طولانی و اغماء باید توجه ویژه شود. زمان مرگ باید در حد امکان به‌دقت ثبت شود.

وزن تک تک حیوانات را بلافاصله پس از شروع آزمون، هفته‌ای یک‌بار و در زمان مرگ تعیین کرده و ثبت کنید. تغییرات وزن نیز باید محاسبه و ثبت گردد. در پایان مدت زمان آزمون، همه حیوانات را قبل از کشته شدن، توزین کنید.

همه حیوانات را باید در پایان مدت زمان آزمون کالبدشکافی کرده و مشاهدات مربوط به بررسی ظاهری را ثبت کنید. اندام‌هایی که نشانه‌ای از تغییرات ظاهری دارند، باید از نظر میکروسکوپی مورد بررسی قرار دهید.

اگر مرگ و میری که بنظر می‌رسد ناشی از نمونه باشد، مشاهده شود، تمام آزمون باید متوقف گردد.

ج-۲-۶ گزارش آزمون

گزارش آزمون باید جامع و در برگیرنده اطلاعات مربوط به نمونه، ماده مرطوب کننده (حامل)، حیوانات مورد استفاده در آزمون، و نتایج حاصل باشد.

نتایج آزمون باید به‌شکل جدول خلاصه شده برای هر گروه ثبت و نگهداری شود. تعداد حیوانات در شروع آزمون، زمان مرگ هر حیوان، تعداد حیواناتی که علائم سمیّت نشان داده‌اند، شرح اثرات سمّی و یافته‌های نکروپسی باید ثبت شود. حیواناتی که بعلت درد و رنج ناشی از اثرات مربوط به نمونه کشته شده‌اند، نیز باید به‌عنوان مرگ ناشی از نمونه ثبت شوند.

پیوست چ

(اطلاعاتی)

کتاب‌نامه

۱- استاندارد ملی ایران ۱-۱۰۰۹۹- تجزیه و تحلیل اندازه ذره- روش‌های تجزیه و تحلیل تصویری ثابت

۲- استاندارد ملی ایران ۱۰۱۴۱- تجزیه میکروپرتویی- میکروسکوپ الکترونی روبشی- دستور کار برای کالیبراسیون بزرگ‌نمایی تصویر

۳- استاندارد ملی ایران ۱۱۷۸۹- آنالیز اندازه ذره- طیف سنجی همبستگی فوتون

4- ISO 18184: Textiles - Determination of antiviral activity of textile products

5- ISO 13322-1- Particle size analysis- Image analysis methods -- Part 1: Static image analysis methods

6- BS EN 13925-1:2003- Non-destructive testing. X-ray diffraction from polycrystalline and amorphous materials. General principles

7- BS EN 13925-2:2003- Non-destructive testing. X-ray diffraction from polycrystalline and amorphous materials. Procedures

8- BS EN 13925-3:2005- Non-destructive testing. X-ray diffraction from polycrystalline and amorphous materials. Instruments

9- ASTM E 2859:2011- Standard Guide for Size Measurement of Nanoparticles Using Atomic Force Microscopy

10-OECD 402- 1987: Acute Dermal Toxicity

11-OECD 404- 2002: Acute Dermal Irritation/Corrosion

12-OECD 406- 1992: Skin Sensitisation

13- OECD 429- 2002: Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay

14- OECD 430- 2004: *In Vitro* Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test (TER)

15-OECD 431- 2004: *In Vitro* Skin Corrosion: Human Skin Model Test

16- OECD 435- 2006*: In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion

17-OECD 439- 2013: *In Vitro* Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method

18-C. Lorenz, L. Windler, N. von Goetz, R.P. Lehmann, M. Schuppler, K. Hungerbuhler, M. Heuberger, B. Nowack, Chemosphere 89 (2012) 817-824: Characterization of silver release from commercially available functional (nano) textiles