Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

1.2. ГИГИЕНА, ТОКСИКОЛОГИЯ, САНИТАРИЯ

Порядок выявления и идентификации наноматериалов в лабораторных животных

Методические указания
МУ 1.2.2874—11

gost.e-ecolog.ru

ББК 51.2
П59

П59 **Порядок** выявления и идентификации наноматериалов в лабораторных животных: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011.—22 с.

1. Разработаны: Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Г. Г. Онищенко, И. В. Брагина, Т. Ю. Завистяева); Учреждением РАМН научно-исследовательский институт питания (В. А. Тутельян, И. В. Гмошинский, С. А. Хотимченко, Е. А. Арианова, В. В. Бессонов, М. М. Гаппаров, Р. В. Распопов, В. В. Смирнова, О. Н. Тананова, А. А. Шумакова, О. И. Передеряев); Учреждением РАМН научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Почетного академика Н. Ф. Гамалеи Минздравсоцразвития России (А. Л. Гинцбург, Б. С. Народицкий, Д. Ю. Логунов, М. М. Шмаров, Л. В. Верховская, Л. В. Черенова); Государственным учебно-научным учреждением Биологический факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова (М. П. Кирпичников, К. В. Шайтан, А. П. Бонарцев, А. В. Феофанов, Д. В. Багров, В. В. Воинова, О. В. Самсонова); Федеральным государственным унитарным предприятием «Всероссийский научно-исследовательский институт метрологической службы» (С. А. Кононогов, С. С. Голубев); Учреждением РАН Институт биохимии им. А. Н. Баха (В. О. Попов, Б. Б. Дзантиев, А. В. Жердев, И. В. Сафенкова, О. Д. Ендриксон); Учреждением РАН Центр «Биоинженерия» (К. Г. Скрябин, О. А. Зейналов, Н. В. Равин, С. П. Комбарова); ФГУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (А. И. Верещагин, А. А. Катуркина); ООО «Интерлаб» (А. Н. Веденин, Г. В. Казыдуб).

Разработаны в рамках Федеральной целевой программы «Развитие инфраструктуры наноиндустрии в Российской Федерации на 2008—2011 годы».

2. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 17 июня 2011 г.

3. Введены в действие с момента утверждения.

4. Введены впервые.

ББК 51.2

© Роспотребнадзор, 2011
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011

Содержание

I. Область применения 4
II. Нормативные ссылки 5
III. Общие положения 7
3.1. Цель выявления и идентификации наноматериалов у лабораторных животных 7
3.2. Организация исследований по выявлению и идентификации наноматериалов в лабораторных животных 7
IV. Порядок проведения эксперимента по выявлению и идентификации наноматериалов в организмах лабораторных животных 10
4.1. Дизайн исследования 10
4.2. Определение вида, линии и числа животных, пригодных для проведения исследований 11
4.3. Выбор способа введения наноматериалов 11
4.4. Подготовка проб наноматериалов для введения животным. 12
4.5. Меры по обеспечению репрезентативности исследования 13
4.6. Перечень органов, тканей и биологических сред, подлежащих исследованию на содержание наноматериалов 14
4.7. Методы гуманного умерщвления животных 14
4.8. Методы анализа наноматериалов в биологических образцах 14
4.9. Меры предосторожности 15
Приложение 1. Типовой протокол эксперимента по выявлению и идентификации наноматериалов в биологических образцах, органах и тканях, полученных в эксперименте на лабораторных животных 19
Приложение 2. Термины и определения 21

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
17 июня 2011 г.
Дата введения: с момента утверждения

1.2. ГИГИЕНА, ТОКСИКОЛОГИЯ, САНИТАРИЯ

Порядок выявления и идентификации наноматериалов в лабораторных животных

Методические указания МУ 1.2.2874—11

I. Область применения

1.1. Настоящие методические указания устанавливают порядок выявления наночастиц и наноматериалов в организмах лабораторных животных в ходе тестирования безопасности наноматериалов.

1.2. Методические указания применяются в ходе проведения исследований безопасности наноматериалов и нанотехнологий в целях принятия решений по оценке рисков, связанных с воздействием наночастиц и наноматериалов на организм человека.

1.3. Методические указания разработаны с целью обеспечения единства измерений и адаптации имеющихся методов и средств измерений в ходе оценки безопасности наноматериалов и нанотехнологий для состояния здоровья человека и компонентов естественных биоценозов.

1.4. Методические указания предназначены для специалистов органов и организаций Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, могут быть использованы научно-исследовательскими организациями гигиенического профиля, медицинскими учебными заведениями и иными организациями, проводящими исследования по оценке безопасности наноматериалов.

II. Нормативные ссылки

2.1. Федеральный закон от 30 марта 1999 года № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения».

2.2. Федеральный закон от 26 июня 2008 года № 102-ФЗ «Об обеспечении единства измерений».

2.3. Федеральный закон от 27 декабря 2002 года № 184-ФЗ «О техническом регулировании».

2.4. Федеральный закон от 10 января 2002 года № 7-ФЗ «Об охране окружающей среды».

2.5. Федеральный закон от 22 июля 2008 года № 123-ФЗ «Технический регламент о требованиях пожарной безопасности».

2.6. Приказ Министерства здравоохранения СССР от 12 августа 1977 года № 755 «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных».

2.7. Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 года № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики».

2.8. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 23 июля 2007 года № 54 «О надзоре за продукцией, полученной с использованием нанотехнологий и содержащей наноматериалы».

2.9. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 31 октября 2007 года № 79 «Об утверждении Концепции токсикологических исследований, методологии оценки риска, методов идентификации и количественного определения наноматериалов».

2.10. Приказ Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 19 июля 2007 года № 224 «О санитарно-эпидемиологических экспертизах, обследованиях, исследованиях, испытаниях и токсикологических, гигиенических и иных видах оценок».

2.11. СанПиН 2.1.7.1322—03 «Гигиенические требования к размещению и обезвреживанию отходов производства и потребления».

2.12. СанПиН 2.1.4.1074—01 «Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества».

2.13. ГН 1.2.2633—10 «Гигиенические нормативы содержания приоритетных наноматериалов в объектах окружающей среды».

2.14. СП 2.2.2.1327—03 «Гигиенические требования к организации технологических процессов, производственному оборудованию и рабочему инструменту».

2.15. СП 1.3.2322—08 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

2.16. СП 1045—73 «Санитарные правила по устройству, оборудованию и содержанию виварией».

2.17. МУ 3.5.5.1034—01 «Обеззараживание исследуемого материала, инфицированного бактериями I—IV групп патогенности, при работе методом ПЦР».

2.18. МУ 11-16/03-06 от 28.02.1995 «Методические указания по применению бактерицидных ламп для обеззараживания воздуха и поверхностей в помещениях».

2.19. МУ 1.2.2520—09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов».

2.20. МУ 4.2.2039—05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории».

2.21. МУ 1.2.2634—10 «Микробиологическая и молекулярно-генетическая оценка воздействия наноматериалов на представителей микробиоценоза».

2.22. МУ 1.2.2635—10 «Медико-биологическая оценка безопасности наноматериалов».

2.23. МУ 1.2.2740—10 «Порядок отбора проб для выявления, идентификации и характеристики действия наноматериалов в водных беспозвоночных».

2.24. МУ 1.2.2741—10 «Порядок отбора проб для выявления и идентификации наноматериалов в лабораторных животных».

2.25. МУ 1.2.2743—10 «Порядок отбора проб для выявления и идентификации наноматериалов в водных объектах».

2.26. МУ 1.2.2744—10 «Порядок отбора проб для выявления, идентификации и характеристики действия наноматериалов в рыбах».

2.27. МУ 1.2.2745—10 «Порядок отбора проб для характеристики действия наноматериалов на лабораторных животных».

2.28. МР 1.2.2566—09 «Оценка безопасности наноматериалов *in vitro* и в модельных системах *in vivo*».

2.29. МР 1.2.2522—09 «Выявление наноматериалов, представляющих потенциальную опасность для здоровья человека».

2.30. МР 1.2.2641—10 «Определение приоритетных видов наноматериалов в объектах окружающей среды, пищевых продуктах и живых организмах».

2.31. МР 1.2.2639—10 «Использование методов количественного определения наноматериалов на предприятиях наноиндустрии».

2.32. ГОСТ 7.32—2001 «Отчет о научно-исследовательской работе. Структура и правила оформления».

III. Общие положения

3.1. Цель выявления и идентификации наноматериалов у лабораторных животных

Целью выявления и идентификации наноматериалов у лабораторных животных является:

- установление возможности проникновения наноматериалов через барьеры организма;
- выявление критических органов – мишеней воздействия наноматериалов;
- установление наличия эффектов кумуляции наночастиц и наноматериалов в организме;
- оценка путей и скорости выведения наноматериалов из организма;
- сравнение поглощения и накопления в организме, в органах и тканях наноматериалов и их традиционных аналогов.

3.2. Организация исследований по выявлению и идентификации наноматериалов в лабораторных животных

3.2.1. Лаборатория (организация) должна быть аккредитована на проведение работ в области исследований оценки безопасности наноматериалов.

3.2.2. В лаборатории должны соблюдаться правила надлежащей лабораторной практики в соответствии с приказом Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики».

Соблюдение правил надлежащей лабораторной практики обеспечивает:

- научную значимость исследований;
- приемлемость исследований;
- полную документированность, достоверность и признаваемость полученных результатов.

3.2.3. Наличие в организации, проводящей исследования по выявлению и идентификации наноматериалов у лабораторных животных, программы по обеспечению качества проводимых исследований. Для этого все производственные операции проводятся в соответствии со Стандартными операционными процедурами (СОП). Соблюдение СОП осуществляется в целях обеспечения качества, достоверности и воспроизводимости результатов исследования.

3.2.4. Оснащение необходимым оборудованием и средствами измерений, прошедшими поверку (калибровку) в установленном порядке. Эксплуатация оборудования и средств измерений проводится в соответствии с техническим паспортом и инструкцией по применению. Результаты проведения поверки (калибровки) и текущего ремонта оборудования фиксируются в специальном журнале, доступном в любое время сотрудникам, эксплуатирующим оборудование или обеспечивающим его обслуживание. Применяются средства измерений, имеющие сертификат Ростехрегулирования и зарегистрированные в Государственном реестре средств измерений.

3.2.5. Наличие выделенных оборудованных помещений для работы с биологическим материалом (препарирование, пробоподготовка, анализ). Материал, поступивший в лабораторию, должен быть обработан в комнате пробоподготовки. Для обработки материала должны быть установлены ламинарные шкафы, обеспечивающие горизонтальный поток воздуха, а также возможность работы без ламинарного потока и длительную экспозицию облучения внутренних поверхностей ультрафиолетовым светом. Перемещение пробирок, штативов и пр. должно производиться только в одном направлении.

3.2.6. Наличие специализированного оборудования, обеспечивающего безопасность работы с наноматериалами неорганического и биогенного происхождения: ламинарных вытяжных шкафов, перчаточных боксов, снабжённых системой вентиляции (HEPA-фильтры), препятствующей поступлению аэрозоля наноматериалов в воздух производственных помещений и в окружающую среду.

3.2.7. Наличие помещения для содержания и работы с лабораторными животными (вивария, клиники лабораторных животных).

Общие требования к организации вивария устанавливаются СП 1045—73 «Санитарные правила по устройству, оборудованию и содержанию виварием».

Виварий должен предусматривать содержание в отдельных помещениях животных, подвергаемых воздействию различных тестируемых

образцов (наноматериалов). Виварий обеспечивают боксовыми помещениями для работ, требующих особых условий.

На каждой клетке с животными прикрепляют этикетку с указанием номера клетки, наименования экспериментов, даты их начала и окончания, даты введения тестируемого образца, Ф. И. О. ответственного сотрудника, что и когда вводилось животным.

Пополнение вивария животными производится из специализированных питомников, обеспечивающих соответствие животных требованиям SPF (свободные от специфических патогенов). Прием животных в виварий производится при наличии ветеринарного свидетельства или сопроводительных документов от питомника.

3.2.8. В соответствии с международными нормами и требованиями при организации, проводящей исследования по выявлению и идентификации наноматериалов, создаётся Комиссия по биоэтике, которая определяет политику организации в области использования животных в экспериментах и осуществляет контроль за соблюдением принципов гуманного обращения с лабораторными животными. Комиссия, в состав которой входят председатель, ветеринар, опытный исследователь и представитель от коллектива организации, проводит экспертизу протоколов предстоящих экспериментов *in vivo* и даёт (или не даёт) разрешение на проведение исследований.

3.2.9. Основным документом, подтверждающим результаты проведённых исследований наноматериалов, является отчёт о проведённом исследовании.

3.2.10. Отчет должен в обязательном порядке содержать следующие сведения: название исследования; адрес организации; даты начала и завершения исследований; цель и задачи исследования; характеристика тестируемого наноматериала; перечень исследованных образцов и применяемых стандартов; вид, линию, пол и возраст используемых лабораторных животных, состав применяемых рационов, условия содержания животных, метод введения наноматериала, применяемые дозы, длительность и кратность введения; схема проведения исследования; перечень использованных средств измерений и вспомогательного оборудования и режимы их работы; методы статистической обработки результатов; результаты исследования, представленные в виде обобщающих таблиц, рисунков с соответствующей статистической обработкой и комментариев к ним; заключение; выводы; список использованных источников.

3.2.11. Оформление отчёта о результатах исследования должно соответствовать требованиям ГОСТ 7.32—2001 «Отчёт о научно-исследовательской работе. Структура и правила оформления».

3.2.12. Отчет о результатах проведенного исследования составляется ответственным исполнителем, утверждается руководителем организации и скрепляется печатью организации.

3.2.13. Организация, проводящая исследования по выявлению и идентификации наноматериалов в организмах животных, должна обеспечить конфиденциальность результатов исследований в рамках принятых ею обязательств и в соответствии с законодательством Российской Федерации.

3.2.14. Сотрудники, принимающие участие в проведении исследований по выявлению и идентификации наноматериалов, обязаны соблюдать конфиденциальность в отношении любых данных, полученных в ходе исследования, в соответствии с законодательством Российской Федерации.

IV. Порядок проведения эксперимента по выявлению и идентификации наноматериалов в организмах лабораторных животных

4.1. Дизайн исследования

4.1.1. Составление плана (дизайна) исследования проводится по утвержденному плану с ведением протокола и составлением отчета, в который заносятся все результаты исследований. Исследования на животных проводятся в соответствии с установленными правилами и обеспечением контроля за соблюдением правовых и этических норм использования лабораторных животных при проведении исследований в соответствии с утвержденным протоколом. Объем проводимых исследований наноматериалов определяется в зависимости от степени их потенциальной опасности согласно МР 1.2.2522—09.

4.1.2. План исследования включает: цель и задачи исследования; имеющиеся сведения об определяемом наноматериале (физические, химические, биологические, токсикологические свойства); наличие традиционного аналога наноматериала; животные, вид, пол, количество и перечень групп; схема исследования: доза, способ, сроки введения; способ отбора и хранения исследуемых образцов; определяемые показатели; методы анализа; методы статистической обработки результатов исследования.

4.1.3. Вносимые в протокол исследования изменения утверждаются руководителем исследования, а отклонения от протокола (незапланированные события, непредвиденные обстоятельства и так далее) записываются, пронумеровываются, подписываются руководителем исследования, датируются в приложении с указанием причин.

4.1.4. Выбор метода идентификации определяется сведениями о предполагаемом составе наночастиц (наночастицы неорганических частиц, наночастицы синтетических полимеров, ДНК-, РНК-содержащие наночастицы, белковые наночастицы и др.). Методы идентификации наноматериалов, отвечающие наибольшей биологической специфичности тестирования, приведены в п. 4.8 методических указаний.

4.2. Определение вида, линии и числа животных, пригодных для проведения исследований

4.2.1. Выявление и идентификация наноматериалов проводятся в экспериментах на здоровых половозрелых животных, прошедших карантин в течение не менее 10 дней. В зависимости от задач исследования пол, исходный возраст и масса животных устанавливаются в соответствии с МУ 1.2.2520—09.

4.2.2. Исследования можно проводить как на линейных (крысы линий Wistar, Sprague-Dawley и др.; мыши линий СВА, С57В1/6 и др.), так и нелинейных животных. В случае использования линейных животных в плане исследования необходимо указать линию животных. Количество животных, используемых в эксперименте, должно быть минимальным, однако достаточным для получения статистически достоверных результатов. Численность экспериментальной группы животных определяется в соответствии с пунктом 4.5 методических указаний. Для снижения числа животных в группе следует добиваться минимальной дисперсии определяемого показателя, для чего использовать животных высокого качества, свободных от специфических патогенов (SPF) и (применительно к мелким лабораторным животным) принадлежащих к определённой линии.

Разброс по исходной массе тела животных в группе не должен превышать ± 10 %.

4.3. Выбор способа введения наноматериалов

4.3.1. Введение наноматериалов лабораторным животным осуществляется путем, который предполагается при использовании наноматериалов в дальнейшем или при котором наноматериал воздействует на

человека: наноматериалы, предназначенные для парентерального введения, вводят внутривенно, внутрибрюшинно, подкожно, внутримышечно или в желудочки мозга; наноматериалы, поступающие энтерально, вводятся в составе корма или зондом; для местного применения – наносят на кожу; при ингаляционном поступлении лабораторных животных помещают в затравочные камеры, снабженные генераторами аэрозоля, или применяют внутритрахеальное, внутриглоточное или внутригортанное ингаляционное введение.

4.3.2. Количество наноматериала рассчитывают на единицу массы тела животного при введении внутрь различными способами (мг/кг массы тела), на площадь поверхности при нанесении на кожу (мг/см^2) или на единицу объёма вдыхаемого воздуха (мг/м^3) при ингаляционном воздействии. Для выражения количества наноматериала используют единицы массы наноматериала (мг). В случае, если для наноматериала известны такие параметры, как отношение количества частиц к массе наноматериала (10^{12}мг$^{-1}$) и отношение площади поверхности частиц к массе наноматериала (см^{2}мг$^{-1}$), дозу воздействующего наноматериала можно выражать через общую площадь поверхности (см^2) или число частиц (10^{12}) в расчёте на единицу массы тела, площадь поверхности кожи или единицу объёма вдыхаемого воздуха, соответственно.

4.3.3. Изучаемые наноматериалы должны вводиться ежедневно на протяжении всего периода эксперимента. В течение всего эксперимента должны использоваться образцы наноматериалов одной и той же партии.

4.4. Подготовка проб наноматериалов для введения животным

4.4.1. Подготовка проб осуществляется в соответствии с нормативными документами, утверждёнными в установленном порядке.

4.4.2. Перед инъекционным введением животным наноматериалов, дающих устойчивые дисперсии в воде и биологических жидкостях (преимущественно это наноматериалы биогенного происхождения), приготавливают их растворы на основе стерильной деионизованной воды либо физиологического раствора.

4.4.3. Введение нерастворимых наноматериалов допускается в виде дисперсий (суспензий, взвесей). Возможно применение специальных носителей, стабилизирующих дисперсии наноматериалов (электролиты, полимеры, растворы ПАВ), которые не должны в применяемых концентрациях оказывать токсическое, мутагенное и другие воздействия на животных, что подтверждается литературными данными или дополнительными исследованиями.

4.4.4. При приготовлении дисперсии наноматериалов необходимо применять физические методы диспергирования (перемешивание, встряхивание, ультразвуковая обработка). Применение детергентов, способных оказать токсическое действие на организм животного, не допускается.

4.4.5. Размер частиц наноматериалов, подлежащих введению в организм животных, контролируется во вводимом препарате методом ПЭМ согласно МР 1.2.2641—10 и МР 1.2.2639—10. Допускается использование других методов (АСМ, фотонно-корреляционной спектроскопии), применение которых утверждено в установленном порядке. Характеристике подлежат средний размер наночастиц во вводимом препарате, распределение наночастиц по размеру, степень агрегации/агломерации наночастиц, средний размер агрегата/агломерата.

4.5. Меры по обеспечению репрезентативности исследования

Для медико-биологических исследований достоверными (достаточными) считаются доверительные границы, установленные с вероятностью безошибочного прогноза не менее 95 %. При этом вероятность выхода средней величины в генеральной совокупности за пределы доверительных границ будет равна или менее 5 %, то есть уровень значимости $-p \le 0{,}05$.

В случае, если тест проведен на N животных и для каждого из которых определено значение исследуемого фактора X_n, принимают гипотезу о нормальном распределении фактора X. Далее рассчитывают среднее по выборке $\bar{X} = \sum_{i=1}^{n} X_i$ и несмещенную выборочную дисперсию

$$S^2 = \frac{1}{N-1}\sum_{i=1}^{n}\left(X_i - \bar{X}\right)^2$$

В этом случае вероятность нахождения истинного значения исследуемого параметра X_0 в интервале $\left(\bar{X} - t_{0,025,N-1}\cdot\frac{S}{\sqrt{N}}; \bar{X} + t_{0,025,N-1}\cdot\frac{S}{\sqrt{N}}\right)$ равна 0,95, где $t_{0,025,N-1}$ – коэффициент Стьюдента с $(N-1)$ степенью свободы для квантиля распределения, равного 0,025 (2,5 %).

Таким образом, число экспериментов N для определения доверительного интервала для истинного значения зависит не только от требуемой ширины интервала, но и от выборочной дисперсии для выборки X_i, которая может быть установлена опытным путём. Задаваясь величиной

доверительного интервала (d) 10 % от выборочного среднего (X), определяют их фактические значения для выборки из 10 животных ($N = 9$; $t = 2{,}68$), сравнивают с заданным соотношением, после чего численность обследуемой группы животных увеличивают, если $d > 0{,}1X$, а в противном случае – уменьшают.

4.6. Перечень органов, тканей и биологических сред, подлежащих исследованию на содержание наноматериалов

4.6.1. Органы: легкие, сердце, желудок, тонкая и толстая кишка, печень, поджелудочная железа, почки, семенники, простата, селезенка, лимфатические узлы, тимус, щитовидная железа, надпочечники, головной мозг и другие в зависимости от целей исследования.

4.6.2. Ткани: гомогенаты ткани печени и головного мозга, мышечная ткань и другие в зависимости от целей исследования.

4.6.3. Биологические жидкости: кровь, плазма, сыворотка крови, бронхоальвеолярный лаваж, моча, кал.

4.7. Методы гуманного умерщвления животных

4.7.1. Гуманное умерщвление лабораторных животных проводят в соответствии с Приказом Министерства здравоохранения СССР от 12 августа 1977 года № 755. Исполнителем должен быть обеспечен контроль за соблюдением правовых и этических норм использования лабораторных животных при проведении забоя животных и отбора проб.

4.7.2. Допустимы методы гуманной эвтаназии лабораторных животных, представленные в пункте 4.4 МУ 1.2.2745—10.

4.8. Методы анализа наноматериалов в биологических образцах

4.8.1. Выбор метода анализа наноматериалов в биологических образцах определяется а) природой наноматериала – наночастицы неорганических веществ, органических соединений, наночастицы биогенного происхождения и б) задачами исследования – качественная идентификация наночастиц в образце, количественный анализ.

4.8.2. При проведении анализов следует придерживаться рекомендаций, содержащихся в МР 1.2.2641—10 и МР 1.2.2639—10. Помимо содержащихся в указанных документах, к использованию допускаются и другие методики, являющиеся метрологически аттестованными и утверждёнными в установленном порядке.

4.8.3. Наночастицы неорганических веществ (металлов – золота, серебра, платиновой группы и др.; оксидов металлов и неметаллов; би-

нарных соединений (нитридов, карбидов, силицидов, арсенидов, халькогенидов металлов); тройных и более сложных неорганических соединений – солей, силикатов и алюмосиликатов.

Отбор проб проводится согласно МР 1.2.2641—10, п. 5.1.5.

Подготовка проб проводится согласно МР 1.2.2639—10, п. 6.4.4.

Анализ содержания наночастиц методом ПЭМ согласно МР 1.2.2641—10, п. 5.1.6.

Анализ химического состава наночастиц методом ИСП-МС согласно МР 1.2.2641—10, п. 6.2.

Анализ химического состава наночастиц методом АЭС согласно МР 1.2.2641—10, п. 6.1.

4.8.4. ДНК-содержащие наночастицы.

Отбор проб проводится согласно МР 1.2.2641—10, п. 5.1.5.

Подготовка проб и анализ проб проводится методом ПЦР согласно МР 1.2.2641—10, п.п. 8.2—8.6.

4.8.5. РНК-содержащие наночастицы.

Отбор проб проводится согласно МР 1.2.2641—10, п. 5.1.5.

Анализ проб проводится методом ПЦР-ОТ с использованием протоколов исследования, утверждённых в установленном порядке.

4.8.6. Наночастицы белковых веществ.

Отбор проб проводится согласно МР 1.2.2641—10, п. 5.1.5.

Подготовка проб и анализ проб проводится методом ИФА согласно МР 1.2.2639—10, пп. 10.1—10.4.

4.8.7. Фуллерены.

Отбор проб проводится согласно МР 1.2.2641—10, п. 5.1.5.

Подготовка проб методом многократной экстракции проводится толуолом осч согласно протоколам, утверждённым в установленном порядке.

Анализ проб проводится методом изократической ВЭЖХ на колонке с обращённой фазой согласно МР 1.2.2641—10, п. 7.2.7.

4.9. Меры предосторожности

4.9.1. Наночастицы и наноматериалы, используемые в биологических экспериментах, следует во всех случаях рассматривать как потенциально опасные вещества, если иное не установлено. Уровень потенциальной опасности наноматериалов для человека и окружающей среды может быть предварительно оценен с применением МР 1.2.2522—09.

Каждый наноматериал, используемый в исследовании, должен быть снабжён паспортом безопасности, составленным в соответствии с ГОСТ 30333—2007.

4.9.2. При розливе наноматериала внутри бокса биологической безопасности необходимо предпринять следующие меры.

4.9.2.1. Подождать по крайней мере 5 минут, чтобы произошла очистка воздуха от аэрозоля.

4.9.2.2. Во время уборки обязательно надеть халат, очки и перчатки.

4.9.2.3. Во время проведения уборки оставить бокс включенным.

4.9.2.4. Время действия дезинфицирующих средств должно быть не менее 20 минут.

4.9.2.5. Собрать пролитую жидкость специальной абсорбирующей губкой или одноразовыми впитывающими салфетками, замоченными в дезинфицирующем растворе.

4.9.2.6. Специальными дезинфицирующими салфетками протереть все поверхности внутри бокса, включая стены, рабочую поверхность и размещенное внутри бокса оборудование.

4.9.2.7. Утилизировать все загрязненные одноразовые материалы согласно правилам лаборатории по утилизации и дезинфицированию биологически опасных материалов.

4.9.2.8. Предметы многократного использования перед процедурами очистки и автоклавирования должны быть помещены в контейнеры с крышками или должны быть завернуты в бумагу.

4.9.2.9. Предметы, которые нельзя автоклавировать, перед удалением из рабочей зоны бокса биологической безопасности необходимо на 20 минут замочить в дезинфицирующем растворе.

4.9.2.10. Вся одежда, в которой проводилась уборка бокса биологической безопасности, должна быть запечатана в пакеты и автоклавирована.

4.9.2.11. Перед возобновлением работы (или перед выключением бокса) оставить бокс биологической безопасности работающим еще на 10 минут.

4.9.3. При розливе биологически опасного материала в лаборатории, вне бокса биологической безопасности необходимы следующие меры.

4.9.3.1. Вызвать специальную службу, если пролитый материал представляет серьезную биологическую опасность, относится к уровню биологической безопасности второго уровня или выше.

4.9.3.2. Удалить из лаборатории весь персонал. В зону пролитой жидкости можно вернуться только тогда, когда осядет аэрозоль и не ранее, чем через 15 минут.

4.9.3.3. Всю загрязненную одежду запечатать в специальные пакеты для биологических отходов и проавтоклавировать.

4.9.3.4. При проведении уборки надеть одноразовый халат, обязательно использовать очки и перчатки из латекса или полимерного материала.

4.9.3.5. Проводить дезинфекцию следующим образом:

• сначала положить на пролитую жидкость нескольких бумажных полотенец для абсорбции жидкости, сверху разместите второй слой полотенец или салфеток, пропитанных дезинфицирующим средством;

• окружить место пролитой жидкости дополнительными дезинфицирующими средствами, минимизируя появление аэрозолей;

• продезинфицировать все предметы, находившиеся в зоне розлива;

• выдержать время гермицидного действия дезинфицирующих средств не менее 20 минут;

• протереть поверхности всего оборудования соответствующим дезинфицирующим средством.

4.9.3.6. Утилизировать все загрязненные одноразовые материалы согласно правилам лаборатории по утилизации и дезинфицированию биологически опасных материалов.

4.9.3.7. Предметы многократного использования продезинфицировать соответствующим образом.

4.9.4. При розливе наноматериала внутри центрифуги необходимо:

4.9.4.1. Удалить из лаборатории весь персонал.

4.9.4.2. Надеть лабораторный халат, очки и перчатки.

4.9.4.3. Поместить ротор и стаканы для проведения процедуры очистки в ближайший бокс биологической безопасности.

4.9.4.4. Тщательно продезинфицировать все внутренние поверхности центрифуги.

4.9.4.5. Утилизировать все загрязненные одноразовые материалы согласно правилам лаборатории по утилизации и дезинфицированию биологически опасных материалов.

4.9.5. При транспортировке материала вне лаборатории.

4.9.5.1. Вызвать представителей специальных служб и оказывать им все содействие по устранению пролитой жидкости, представляющей биологическую опасность.

4.9.5.2. Материал, представляющий биологическую опасность, должен быть промаркирован и запечатан в контейнере, размещенном внутри специальной тары для транспортирования. Эта тара должна иметь крышку, быть небьющейся и иметь маркировку биологически опасного материала.

4.9.5.3. Если розлив произошел в месте скопления людей, не пытаться устранить его без оборудования персональной защиты.

4.9.5.4. Ограничить зону пролитой жидкости, не допускать туда посторонних людей.

Приложение 1

Типовой протокол эксперимента по выявлению и идентификации наноматериалов в биологических образцах, органах и тканях, полученных в эксперименте на лабораторных животных

ПРОТОКОЛ

эксперимента по выявлению и идентификации наноматериалов в биологических образцах, органах и тканях, полученных в эксперименте на лабораторных животных

от «__» _____20__ г.

Наименование и адрес заявителя: _____

Наименование и адрес организации, которая производила отбор проб (образцов) _____

Наличие информации, представленной заявителем _____

наличие сведений о свойствах наноматериала _____

наличие сведений о традиционном аналоге _____

наличие растворителя, разбавителя, эмульгатора и т. д. _____

– концентрация

– стабильность

– объем

Используемые животные:

– вид, линия, пол

– число животных в группе

– перечень групп и контролей

Наименование вводимого наноматериала _____

– доза введения

– способ введения

– схема введения

– время между введениями

Наименование традиционного аналога наноматериала _____

– доза

– способ введения

– время между введениями

Наименование исследуемого материала (пробы) _____

Единица измерений проб (объем, масса) _____

Размер партии _____

Метод отбора _____

Способ консервации пробы _____
Количество отобранных образцов _____
из них контрольных
лабораторных
Метод исследования пробы
Результаты исследований в виде данных
Метод статистической обработки результатов
Сводная таблица результатов исследования
Заключение ответственного исполнителя на официальном бланке, утвержденное руководителем организации

Сводная таблица результатов исследования

№ пробы	Наименование исследуемого материала, проба\объем (масса)	Метод идентификации	Наименование идентифицированного наноматериала	Содержание наноматериала в пробе

Подписи:
От заявителя _____

От организации, проводившей исследование проб _____

Приложение 2

Термины и определения

Воспроизводимость результатов биотестирования – характеристика качества биотестирования, отражающая близость результатов, полученных по одной методике, на одном и том же эталонном наноматериале, но в различных условиях.

Документация – записи в любой форме, которые описывают методы проведения и/или результаты исследования наноматериалов, а также факторы, влияющие на проведение исследования, и действия, совершаемые при проведении исследования.

Критерий токсичности – установленное значение изменения выбранного показателя жизнедеятельности тест-объекта, на основании которого делают вывод о токсичности тестируемого наноматериала.

Нормативные документы – государственные (национальные стандарты) (ГОСТ), методические указания (МУ), ветеринарные правила и нормы (ВетПиН) и санитарные правила и нормы (СанПиН), устанавливающие нормы, правила, методы.

Отчет – представленные в письменной форме результаты исследования наноматериалов в объектах природной среды, включающие описание инструментальных, биологических и статистических методов, данные, полученные в ходе исследования, и выводы.

Первичные данные исследования – документы, отражающие наблюдения и манипуляции, проводимые во время исследования (записи в рабочих листах, лабораторных журналах, фотографии, распечатки с автоматизированных приборов, записи на магнитных носителях, записи об эксплуатации и техническом обслуживании оборудования, расчетные процедуры).

Проба (репрезентативная проба) – одна или несколько единиц (объёмов) вещества, отобранных установленными способами из совокупности (лота, партии), позволяющая получить информацию о заданной характеристике совокупности и являющаяся основой для принятия решения о совокупности, веществе или процессе их производства.

Протокол исследования — документ, который описывает задачи, методологию, процедуры, методы статистической обработки данных и организацию исследования.

Руководитель исследования – лицо, ответственное за проведение исследования.

Стандартные операционные процедуры – документы, в которых детально изложено выполнение определенных лабораторных процедур,

которые, как правило, не детализированы в протоколах исследований и методических руководствах.

Тест-объект(ы) – специально подобранный(е) микроорганизм(ы) или их компоненты, чувствительный(е) к действию наноматериалов и подготовленный(е) в лабораторных условиях к биотестированию, а также естественные микробиоценозы, ассоциированные с определенными органами (системами) органов организма животного.

Традиционный аналог наноматериала – вещество, идентичное наноматериалу по химическому составу и фазовой структуре, но, в отличие от него, представленное частицами с размерами по всем трём измерениям более 100 нм.

Обозначения и сокращения

АСМ	Атомно-силовая микроскопия
ВЭЖХ	Высокоэффективная жидкостная хроматография
ИФА	Иммуноферментный анализ
МР	Методические рекомендации
МУ	Методические указания
ОТ	Обратная транскрипция
ПАВ	Поверхностно-активное вещество
ПЦР	Полимеразная цепная реакция
ПЭМ	Просвечивающая электронная микроскопия
СИЗ	Средства индивидуальной защиты
СОП	Стандартные операционные процедуры
СП	Санитарные правила

gost.e-ecolog.ru