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

1.2. ГИГИЕНА, ТОКСИКОЛОГИЯ, САНИТАРИЯ

Порядок отбора проб для характеристики действия наноматериалов на лабораторных животных

Методические указания
МУ 1.2.2745—10

gost.e-ecolog.ru

ББК 51.2
П59

П59 **Порядок** отбора проб для характеристики действия наноматериалов на лабораторных животных: Методические указания.— М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010.—31 с.

1. Авторский коллектив: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Г. Г. Онищенко, И. В. Брагина, Т. Ю. Завистяева); Учреждение Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт питания РАМН (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); Государственное учебно-научное учреждение 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, Самсонова О.В.); Учреждение Российской академии медицинских наук научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Почетного академика Н. Ф. Гамалеи РАМН (А. Л. Гинцбург, Б. С. Народицкий, М. М. Шмаров, Д. Ю. Логунов, Л. В. Черенова, И. Л. Тутыхина); Федеральное государственное унитарное предприятие «Всероссийский научно-исследовательский институт метрологической службы» (ФГУП ВНИИМС) (С. А. Кононогов, С. С. Голубев); Учреждение Российской Академии наук Институт биохимии им. А. Н. Баха (ИНБИ РАН) (В. О. Попов, Б. Б. Дзантиев, А. В. Жердев, И. В. Сафенкова, О. Д. Гендриксон); Учреждение Российской академии наук Центр «Биоинженерия» РАН (К. Г. Скрябин, О. А. Зейналов, Н. В. Равин, С. П. Комбарова); Учреждение Российской академии наук Институт проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова РАН (Д. С. Павлов, Ю. Ю. Дгебуадзе, Е. С. Бродский, Е. Ю. Крысанов, Т. Б. Демидова, А. В. Купцов); ООО «Интерлаб» (А. Н. Веденин, Г. В. Казыдуб). Разработаны в рамках Федеральной целевой программы «Развитие инфраструктуры наноиндустрии в Российской Федерации на 2008—2010 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 23 сентября 2010 г.

3. Введены в действие с 10 октября 2010 г.

4. Введены впервые.

ББК 51.2

© Роспотребнадзор, 2010
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010

Содержание

I. Область применения 4
II. Нормативные ссылки 4
III. Общие положения 8
3.1. Цель, назначение и особенности процедуры пробоотбора 8
3.2. Требования к организациям, проводящим пробоотбор 8
3.3. Перечень объектов и материалов, подлежащих пробоотбору 9
3.4. Соблюдение правил надлежащей лабораторной практики 9
3.5. Соблюдение мер конфиденциальности 10
3.6. Защита проб от несанкционированных внешних воздействий 10
3.7. Ответственность организации, производящей отбор проб 11
IV. Технология пробоотбора 11
4.1. Меры по обеспечению репрезентативности 11
4.2. Контрольные пробы 12
4.3. Протоколирование отбора проб 12
4.4. Методы гуманной эвтаназии животных 13
4.5. Методы препарирования биологического материала 13
4.6. Применяемое оборудование и реактивы 15
4.7. Количество отбираемых проб 18
4.8. Фиксация (консервация) проб 18
4.9. Меры предосторожности 19
4.10. Возможные нештатные ситуации и меры по их устранению 22
V. Транспортирование и хранение биологических образцов 23
5.1. Тара для транспортирования биологических образцов, упаковка и маркировка 23
5.2. Требования к транспортным средствам 25
5.3. Требования к хранилищу (банку) биологических образцов 25
5.4. Допустимые температурные режимы и сроки хранения биологических образцов 26
5.5. Признаки, свидетельствующие о порче (непригодности) биологических образцов 27
Приложение 1. Типовой протокол (акт) отбора проб для характеристики действия наноматериалов на лабораторных животных 28
Приложение 2. Термины и определения 30
Приложение 3 .Обозначения и сокращения 31

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
23 сентября 2010 г.

1.2. ГИГИЕНА, ТОКСИКОЛОГИЯ, САНИТАРИЯ

Порядок отбора проб для характеристики действия наноматериалов на лабораторных животных

Методические указания
МУ 1.2.2745—10

I. Область применения

1.1. Настоящие методические указания устанавливают требования к методам отбора проб для характеристики действия наноматериалов на лабораторных животных с учётом данных о путях поступления наноматериалов в организм и предполагаемых органах-мишенях их воздействия.

1.2. Требования, изложенные в настоящих методических указаниях, применяются в ходе проведения токсиколого-гигиенических и медико-биологических оценок безопасности наноматериалов 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 методов и средств отбора проб в ходе оценки безопасности наноматериалов и нанотехнологий для состояния здоровья человека и компонентов естественных биоценозов.

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

II. Нормативные ссылки

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

2.2. Федеральный закон Российской Федерации от 2 января 2000 г. № 29-ФЗ «О качестве и безопасности пищевых продуктов».

2.3. Федеральный закон Российской Федерации от 26 июня 2008 г. № 102-ФЗ «Об обеспечении единства измерений».

2.4. Федеральный закон Российской Федерации от 27 декабря 2002 г. № 184-ФЗ «О техническом регулировании».

2.5. Федеральный закон Российской Федерации от 10 января 2002 г. № 7-ФЗ «Об охране окружающей среды».

2.6. Постановление Правительства Российской Федерации от 21 декабря 2000 г. № 987 «О государственном надзоре и контроле в области обеспечения качества и безопасности пищевых продуктов».

2.7. Постановление Правительства Российской Федерации от 21 декабря 2000 г. № 988 «О государственной регистрации новых пищевых продуктов, материалов и изделий».

2.8. Постановление Правительства Российской Федерации от 30.06.2004 № 322 «Об утверждении Положения о Федеральной службе в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека».

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

2.10. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 19 июня 2003 г. № 267 «Об утверждении Правил лабораторной практики».

2.11. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации и Главного государственного инспектора Российской Федерации по охране природы от 10.11.1997 № 25 и от 10.11.1997 № 03-19/24-3483 «Об использовании методологии оценки риска для управления качеством окружающей среды и здоровья населения в Российской Федерации».

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

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

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

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

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

2.17. СП 1.2.036—95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности».

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

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

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

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

2.22. МУ 1.3.2569—09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I—IV групп патогенности».

2.23. Р.3.5.1904—04 «Использование ультрафиолетового излучения для обеззараживания воздуха помещений».

2.24. ГОСТ 8.207—76 «Государственная система обеспечения единства измерений. Прямые измерения с многократными наблюдениями. Методы обработки результатов наблюдений. Основные положения».

2.25. ГОСТ 12.1.007—76 «Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности».

2.26. ГОСТ 26678—85 «Холодильники и морозильники бытовые электрические компрессионные параметрического ряда. Общие технические условия».

2.27. ГОСТ 3—88 «Перчатки хирургические резиновые. Технические условия».

2.28. ГОСТ 20015—88 «Хлороформ. Технические условия».

2.29. ГОСТ Р 51652—2000 «Спирт этиловый ректификированный из пищевого сырья. Технические условия».

2.30. ГОСТ 21241—89 «Пинцеты медицинские. Общие технические требования и методы испытаний».

2.31. ГОСТ 21239—93 «Инструменты хирургические. Ножницы. Общие требования и методы испытаний».

2.32. ГОСТ 30393—95 «Инструменты хирургические. Скальпели со съёмными лезвиями. Присоединительные размеры».

2.33. ГОСТ 24104—2001 «Весы лабораторные. Общие технические требования».

2.34. ГОСТ 25336—82 «Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры».

2.35. ГОСТ 1770—74 «Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Технические условия».

2.36. ГОСТ 9293—74 «Азот газообразный и жидкий. Технические условия».

2.37. ГОСТ 12.2.003—91 «Система стандартов безопасности труда. Оборудование производственное. Общие требования безопасности».

2.38. ГОСТ 12.2.052—81 «Система стандартов безопасности труда. Оборудование, работающее с газообразным кислородом. Общие требования безопасности».

2.39. ГОСТ 12.1.004—91 «Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования».

2.40. ГОСТ 4233—77 «Реактивы. Натрий хлористый. Технические условия».

2.41. ГОСТ 5833—75 «Реактивы. Сахароза. Технические условия».

2.42. ГОСТ 4198—75 «Реактивы. Калий фосфорно-кислый однозамещенный. Технические условия».

2.43. ГОСТ 2493—75 «Реактивы. Калий фосфорно-кислый двузамещенный 3-водный. Технические условия».

2.44. ГОСТ 6259—75 «Реактивы. Глицерин. Технические условия».

2.45. ГОСТ 4172—76 «Реактивы. Натрий фосфорно-кислый двузамещенный 12-водный. Технические условия».

2.46. ГОСТ 4199—76 «Реактивы. Натрий тетраборно-кислый 10-водный. Технические условия».

2.47. ГОСТ 9656—75 «Реактивы. Кислота борная. Технические условия».

2.48. ГОСТ Р 50444—92 «Приборы, аппараты и оборудование медицинские. Общие технические условия».

2.49. ГОСТ Р 51350—99 «Безопасность электрических контрольно-измерительных приборов и лабораторного оборудования. Часть 1. Общие требования».

2.50. ГОСТ Р ИСО/МЭК 17025—2006 «Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий».

III. Общие положения

3.1. Цель, назначение и особенности процедуры пробоотбора

3.1.1. Целью отбора проб является получение представительной и усреднённой пробы, наиболее полно отражающей физические, химические, биологические и другие свойства исследуемых биологических образцов (биологических жидкостей, органов и тканей, фекальных масс и др.), полученных от лабораторных животных, в ходе проведения исследований по токсиколого-гигиенической характеристике наночастиц или наноматериалов, в т. ч. с учётом использования соответствующих контрольных групп.

3.1.2. Назначение процедуры отбора проб заключается в отборе для заданной цели части объекта, являющейся пригодной для анализа и представительной, т. е. адекватно отражающей общий состав анализируемого объекта с учетом особенностей распределения всех компонентов.

3.1.3. Биологические образцы, полученные от животных, которым по условиям эксперимента (биологического тестирования) были введены наночастицы (наноматериалы), могут содержать их остаточные количества и поэтому должны рассматриваться как объекты, обладающие повышенной биологической опасностью. Особенности процедур отбора проб должны обеспечивать снижение риска воздействия наночастиц и наноматериалов, а также инфицированных микроорганизмами образцов на персонал организаций (лабораторий), проводящих отбор проб и последующие исследования биологических показателей, а также на население и окружающую среду до приемлемого уровня.

3.2. Требования к организациям, проводящим пробоотбор

3.2.1. Организации, проводящие отбор проб, должны быть уполномочены в установленном порядке на право проведения медико-биологических исследований на лабораторных животных и обладать системой контроля качества, обеспечивать независимость и прозрачность процедуры пробоотбора.

3.2.2. Организации, проводящие отбор проб для характеристики действия наноматериалов у лабораторных животных, должны быть оснащены необходимым оборудованием (в т. ч. средствами измерений), прошедшим поверку (калибровку) в установленном порядке.

3.2.3. Эксплуатация оборудования проводится в соответствии с техническим паспортом и инструкцией по эксплуатации. Результаты проведения поверки (калибровки) средств измерений и текущего ремонта оборудования фиксируются в специальном журнале, доступном в любое время сотрудникам, эксплуатирующим оборудование или обеспечивающим его обслуживание.

3.2.4. Персонал, проводящий отбор проб, должен иметь профессиональную подготовку в области работы с лабораторными животными и пройти инструктаж по технике безопасности и методам преодоления последствий нештатных ситуаций, возникающих в процессе работы.

3.3. Перечень объектов и материалов, подлежащих пробоотбору

Перечень биологических материалов, являющихся предметом пробоотбора, определяется целями и задачами проводимых исследований, способом введения наноматериалов животным, физико-химическими характеристиками наноматериалов (размер частиц, химический и фазовый состав), а также имеющимися в распоряжении лаборатории, проводящей исследование, данными об органах-мишенях воздействия наноматериалов. Как правило, для характеристики действия наноматериалов у лабораторных животных производят отбор тканей печени, почек, селезенки, толстого и тонкого кишечника, сердца, аорты, трахеи, легких, тимуса, семенников, предстательной железы, головного мозга, костного мозга бедренной кости, а также фекальных масс из толстого кишечника, цельной крови.

3.4. Соблюдение правил надлежащей лабораторной практики

3.4.1. В процессе отбора проб для характеристики действия наноматериалов у лабораторных животных необходимо руководствоваться правилами надлежащей лабораторной практики в соответствии с положениями приказа Минздрава России от 19 июня 2003 г. № 267.

3.4.2. Соблюдение правил надлежащей лабораторной практики обеспечивает:

- систему качества процедуры проботобора;
- документальное сопровождение всех этапов пробоотбора;
- совместимость различных методов пробоотбора между собой и отсутствие неконтролируемых перекрёстных влияний различных процедур пробоотбора на результаты биологического тестирования;
- репрезентативность отбираемых проб;
- гуманное обращение с лабораторными животными.

3.4.3. Соблюдение правил надлежащей лабораторной практики применительно к процедурам отбора биологических образцов включает:

- назначение руководителем организации лиц, ответственных за мониторинг качества и репрезентативности отбираемого биологического материала (из числа сотрудников, не участвующих в исследовании);
- систему регистрации отбираемых образцов, их хранение и транспортирование в условиях, исключающих возможность порчи, изменения физико-химических и биологических свойств;

• наличие и соблюдение стандартных операционных процедур (СОП) на все производственные операции, включая: составление списка (перечня) отбираемых проб, отбор, идентификацию, маркировку, предварительную обработку проб, использование и хранение исследуемых веществ; обслуживание и градуировку средств измерения (весов, пипеток, дозаторов), применяемых при пробоотборе; приготовление реактивов, кормов; протоколирование отбора проб; обслуживание помещений; обезвреживание или утилизацию биологических образцов (если это необходимо); ликвидацию последствий нештатных ситуаций;

• наличие средств измерений, прошедших поверку (калибровку) в установленном порядке;

• эксплуатацию оборудования в соответствии с техническим паспортом и инструкцией по применению, регулярную фиксацию результатов поверки средств измерений и текущего ремонта оборудования в специальном журнале;

• наличие помещения для лабораторных животных (вивария), обеспечивающего изоляцию (карантин) поступающих животных, больных животных и животных, подозреваемых в носительстве инфекций; позволяющего осуществлять раздельное содержание различных видов животных и животных одного вида, используемых в исследованиях биологического действия различных наноматериалов; соответствующего санитарно-эпидемиологическим и ветеринарным требованиям;

• наличие отдельных помещений, инвентаря и оборудования для приготовления кормов для лабораторных животных, а также для работы с опасными для здоровья и жизни человека объектами исследования, соответствующих установленным санитарно-эпидемиологическим требованиям.

3.5. Соблюдение мер конфиденциальности

3.5.1. Сотрудники, принимающие участие в процессе отбора проб для характеристики действия наноматериалов у лабораторных животных, обязаны соблюдать конфиденциальность в отношении любых данных, полученных в ходе процедуры отбора проб, в соответствии с законодательством Российской Федерации.

3.5.2. Организация, проводящая пробоотбор, должна обеспечить конфиденциальность полученных в ходе проботобора данных о воздействии наноматериалов на животных в рамках принятых ею обязательств и в соответствии с законодательством Российской Федерации.

3.6. Защита проб от несанкционированных внешних воздействий

3.6.1. Организация, производящая отбор проб, должна обеспечить их защиту от несанкционированных внешних воздействий.

3.6.2. Контейнер с пробой необходимо запечатать либо упаковать в сейф-пакет, опломбировать или опечатать его таким способом, чтобы не допустить несанкционированного вскрытия пробы или чтобы несанкционированное вскрытие легко определялось.

3.7. Ответственность организации, производящей отбор проб

3.7.1. Ответственность за качественный отбор проб, репрезентативность отобранной пробы, оформление документов на пробы и их сохранность, а также за соблюдение правил техники безопасности несет организация, осуществляющая отбор проб.

IV. Технология пробоотбора

4.1. Меры по обеспечению репрезентативности

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 %, т. е. уровень значимости – $p \le 0{,}05$.

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

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

В этом случае вероятность нахождения истинного значения исследуемого параметра X_0 в интервале $\left(\overline{X} - t_{0.025,N-1}\cdot\frac{S}{\sqrt{N}}; \overline{X} + t_{0.025,N-1}\cdot\frac{S}{\sqrt{N}}\right)$ 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.

4.2. Контрольные пробы

4.2.1. В случае проведения исследований в целях арбитража контрольные (референтные, арбитражные) пробы выделяются на месте в процессе отбора проб. Контрольная проба выделяется от лабораторной пробы и составляет половину её объёма. Отбор контрольных проб биологических материалов, не допускающих длительного хранения без изменения определяемых характеристик, не производится.

4.2.2. Контрольная проба хранится при регламентированных для данного вида проб режимах в сейф-пакетах или в опломбированной (опечатанной) таре. Длительность хранения контрольных проб определяют так же, как и для опытных проб, в соответствии с п. 5.5.

4.3. Протоколирование отбора проб

4.3.1. Процедура отбора проб должна быть запротоколирована по окончании процесса. В протоколе (акте) отбора проб указывают:

- название организации, производившей отбор проб;
- фамилии сотрудников, проводивших отбор проб;
- наименование исследуемого биологического материала;
- цель исследования;
- наименование вводимого животным наноматериала;
- даты введения животным наноматериала (год, месяц, число);
- размер пробы (объём или масса), единицы измерения;
- метод отбора пробы;
- способ консервации пробы;
- число повторов (реплик) отобранных образцов биологического материала, в т. ч. контрольных проб;
- дату (год, месяц число) и время суток, когда произведён отбор пробы;
- порядок маркировки (нумерации) проб;
- сведения об опечатывании (опломбировании) проб;
- наименование организации, в которую направлены пробы;
- наименование показателей для определения в пробах;
- опись дополнительных документов, прилагаемых к пробам (при необходимости);
- дату и время суток отправки проб;
- способ отправки (транспортирования) проб;
- отметку о месте хранения контрольной пробы;
- подписи сотрудников, осуществивших отбор проб (с расшифровкой подписей).

4.3.2. Протокол (акт) отбора проб составляется в двух экземплярах, один из которых остается в организации, производившей пробоотбор, а другой передается организации, осуществляющей проведение лабораторных исследований.

4.4. Методы гуманной эвтаназии животных

4.4.1. При проведении эвтаназии животных должны соблюдаться требования приказа МЗ СССР от 12 августа 1977 г. № 755 «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных». Исполнителем должен быть обеспечен контроль за соблюдением правовых и этических норм обращения с лабораторными животными при проведении забоя и отбора проб.

4.4.2. Оптимальным и универсальным методом эвтаназии животных является 3-кратная передозировка наркоза. Допускается умерщвление мелких животных с помощью ингаляционного наркоза (хлороформ или эфир) без предварительного введения других видов анестетиков.

4.4.3. Умерщвление и вскрытие животных проводят в отдельном специально оборудованном помещении (секционной) в пределах клиники лабораторных животных (вивария). Манипуляции с животными должны исключать возможность продолжительных стрессорных воздействий. Следует производить манипуляции с животными таким образом, чтобы этого не могли наблюдать остальные животные.

4.5. Методы препарирования биологического материала

4.5.1. Цельную кровь собирают асептически с использованием одноразовых инструментов у мелких лабораторных животных (мышей, крыс, морских свинок) из кончика хвоста или из сердца (в случае умерщвления и вскрытия животных) в стерильную пробирку (1,5—2,0 $см^3$), куда предварительно внесен раствор гепарина (10 ед./$см^3$).

4.5.2. Мышь размещают на пластине для манипуляций (материал пластины – пробка или пенопласт) кверху брюшком, растянув лапки в разные стороны и пришпилив их булавками, брюшко обрабатывают 96 % этиловым спиртом. Крысу или морскую свинку размещают на хирургическом столике кверху брюхом, растянув лапки в разные стороны и привязав их веревками или шнурами к крючкам по сторонам столика, брюхо обрабатывают 96 %-м этиловым спиртом.

4.5.3. Осуществляют три разреза кожи брюшка мыши (не затрагивая брюшную стенку): первый разрез от мочевого отверстия до подбородка, второй и третий от мочевого отверстия к коленам задних конечностей. Кожу отводят в сторону и фиксируют булавками. Осуществляют четыре разреза кожи брюха крысы или морской свинки (не затрагивая

брюшную стенку): первый разрез от мочевого отверстия до подбородка, второй и третий от мочевого отверстия к коленам задних конечностей и четвертый перпендикулярно первому по границе брюха и груди. Кожу отводят в сторону и фиксируют булавками.

4.5.4. Производят разрез брюшной стенки и вынимают кишечник. Отрезают толстый отдел кишечника, его содержимое забирают пастеровской пипеткой в стерильную одноразовую посуду.

4.5.5. Внутренние органы у мышей, крыс и морских свинок отбирают в следующей последовательности: органы пищеварительной системы (в первую очередь кишечник во избежание контаминации его содержимым других проб), селезенка, почки, семенники, бедренные кости, затем вскрывают грудную клетку и отбирают сердце, аорту, легкие, трахею, после этого отделяют голову, вскрывают черепную коробку и отбирают головной мозг. В зависимости от целей исследования возможен отбор образца остающегося костно-мышечного каркаса. Немедленно после выделения органов их взвешивают на технических весах с точностью ± 0,01 г, результаты взвешивания фиксируют в протоколе. При отборе на исследование части органа (например, доли печени) отдельно определяется и регистрируется её масса.

4.5.6. Необходимость отбора проб каждого из органов определяют по предположительной локализации или действию, которое исследуемые наноматериалы могут оказать на организм лабораторных животных, согласно литературным данным.

4.5.7. Пробы органов и тканей отбирают отдельно для каждой из особей лабораторных животных. Отбор проб производят случайно с использованием метода последовательных номеров. Животным из опытной группы, получившим наноматериал, как и животным из контрольной группы, получившим плацебо, присваивают номер, являющийся случайным числом из таблицы случайных чисел или полученным с помощью генератора случайных чисел. Затем эти номера ранжируются в порядке возрастания и в соответствии с выбранным правилом определяют порядок отбора проб каждого животного случайно вне зависимости от его принадлежности к контрольной или опытной группе.

4.5.8. Для исключения влияний со стороны циркадных и более длительных биоритмов организмов животных на результаты проботбора, его следует проводить одновременно в опытной и контрольной группе в одно и то же время суток на протяжении не более 2—3 ч (предпочтительно между 9 и 12 ч). При большом числе групп (или животных в каждой группе), что не позволяет провести забой в указанный интервал времени, животные опытных и контрольных групп должны умерщ-

вляться равными порциями на протяжении не более 1—3 дней строго в одно и то же время суток.

4.5.9. В зависимости от целей пробоотбора и используемых методов характеристики действия наноматериалов пробы непосредственно после взятия от животных, определения массы и выделения (в случаях, предусмотренных п. 4.2) контрольной пробы анализируют с помощью соответствующих методов или сразу же консервируют или замораживают и сохраняют до анализа в соответствии с п. 5.4.

4.6. Применяемое оборудование и реактивы

4.6.1. Оборудование:

Ламинарный шкаф биологической безопасности класс II с вертикальным восходящим потоком воздуха БОВ-001-АМС («Миасский завод медицинского оборудования», Россия) или аналогичный	
Облучатель бактерицидный настенный ОБН-150	ТУ 16-535—84
Холодильник бытовой электрический	ГОСТ 26678—85
Морозильная камера, обеспечивающая температуру 20 °С или ниже (фирмы «*Vestfrost*», Дания или аналогичная)	
Льдогенератор (SD18 фирмы «*Simag*», Италия или аналогичный)	
Центрифуга со скоростью вращения ротора до 12 000 об./мин и охлаждением для пробирок вместимостью 1,5 и 0,5 $см^3$ (5 415 R фирмы «*Eppendorf*» ФРГ или аналогичная)	
Встряхиватель вибрационный типа «Вортекс» со скоростью вращения до 3 000 об./мин (V3 фирмы «*Elmi Ltd*» Латвия или аналогичный)	
Весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности с погрешностью взвешивания не более 0,001 г	ГОСТ 24104—2001
Пластина для манипуляций с мелкими грызунами (мышами) (из пробки или пенопласта)	
Хирургический столик для мелких животных (крысы, морские свинки)	
Булавки или иглы для фиксации мышей на пластине для манипуляций	

Сосуд Дьюара	ТУ 26-04-622—88
охлаждающие элементы для транспортировки проб	
Термоконтейнеры или сумки-холодильники	
Мембранные установки для получения деионизованной воды или аналогичные	ОСТ 1-029.003—80
Пинцет медицинский	ГОСТ 21241—89
Ножницы медицинские	ГОСТ 21239—93
Скальпель (возможно использование скальпеля со съёмными лезвиями)	ГОСТ 30393—95
Резиновые груши для пипетирования биологического материала	
Дозаторы с переменным объёмом дозирования фирмы «*Gilson*» США:	
0,2—2,0 мм^3 с шагом 0,01 мм^3, с точностью ± 1,2 %	
2—20 мм^3 с шагом 0,01 мм^3, с точностью ± 0,8 %	
1—10 см^3 с шагом 0,1 см^3, с точностью ± 0,5 %;	
дозаторы «Ленпипет»	ТУ 9452-002-33189998—2007
0,5—10,0 мм^3 с шагом 0,01 мм^3, с точностью ± 0,8 %	
20—200 мм^3 с шагом 0,1 мм^3, с точностью ± 0,6 %	
100—1 000 мм^3 с шагом 1 мм^3, с точностью ± 3 %.	

Примечание: для вскрытия желательно использовать два набора инструментов – для разрезания кожи и для взятия кусочков органов.

4.6.2. Реактивы и расходуемые материалы:

Хлороформ	ГОСТ 20015—88
Диэтиловый эфир (эфир для наркоза стабилизированный)	ТУ 2600-001-43852015—05
Спирт этиловый ректифицированный	ГОСТ Р 51652—2000
Пробирки для микропроб однократного применения типа «Эппендорф» вместимостью 0,5, 1,5 и 2,0 см^3	ТУ 64-2-300—80
Криопробирки вместимостью 2,0 см^3	
Штативы для пробирок	

Наконечники пластиковые объемом 1—200 мм^3 и 200—1 000 мм^3 с фильтром и без фильтра	
Бакпечатки однократного применения	ТУ 64-2-279—79
Пастеровские пипетки, воронки стеклянные	ГОСТ 25336—82
Цилиндры стеклянные мерные лабораторные Разной вместимости, колбы конические разной вместимости	ГОСТ 1770—74
Азот жидкий	ГОСТ 9293—74
Углекислота твёрдая	
Изотонический раствор натрия хлорида (0,9 г/л хлористого натрия)	ГОСТ 4233—77
Дистиллированная вода	ОСТ 11-029.003—80
Транспортная среда для биологических тканей (0,218 М сахароза	ГОСТ 5833—75
0,0038 М калий фосфорно-кислый однозамещенный	ГОСТ 4198—75
0,0072 М калий фосфорно-кислый двух-Замещенный	ГОСТ 2493—75
1 % БСА)	ТУ 6-09-10-342—90
Транспортные системы (свабы) (фирмы «*HiMedia Laboratories*», Индия или аналогичные)	
Транспортная среда Кэрри-Блер (фирмы «*HiMedia Laboratories*», Индия или аналогичная);	
Глицериновая смесь (2 л изотонического раствора, 1 л глицерина	ГОСТ 6259—75
и 20 %-й раствор фосфорно-кислого натрия двухзамещенного	ГОСТ 4172—76
pH довести до 7,8—8,0). Стерилизуют при давлении 0,5 атмосфер в течение 15—30 мин, после стерилизации pH должен быть 7,8	
Боратно-буферный раствор: на 100 см^3 дистиллированной воды берут	
2 г смеси (57 г кристаллической буры	ГОСТ 4199—76
84 г борной кислоты	ГОСТ 9656—75
99 г хлористого натрия)	ГОСТ 4233—77
Фосфатная буферная смесь: на 1 л дистиллированной воды берут 0,45 г калия фосфорно-кислого однозамещенного	ГОСТ 4198—75

и 5,34 г калия фосфорно-кислого двухзамещенного, стерилизуют при давлении 1 атм. в течение 30 мин	ГОСТ 2493—75
Термоконтейнеры различной вместимости или медицинская сумка-холодильник	
Перчатки хирургические резиновые	ГОСТ 3—88
Сейф-пакеты одноразовые для хранения и транспортирования проб	

4.7. Количество отбираемых проб

4.7.1. Объём отбираемой пробы фекальных масс из содержимого толстого кишечника должен составлять не менее ½ объема микробиологической бакпечатки, а масса не менее 1 г.

4.7.2. Селезёнку у мышей отбирают целиком, при необходимости разделяя на несколько образцов.

4.7.3. Внутренние органы (почки, селезенку, сердце и др.) отбирают у мышей и крыс целиком; печень у мышей – целиком; у крыс возможен отбор доли печени с регистрацией массы органа и массы отобранной доли.

4.7.4. Бедренные вены у крыс отбирают, вырезая их с обеих сторон таким образом, чтобы отрезок вены был не менее 1 см длиной.

4.7.5. Бедренные кости у крыс и мышей отбирают отсепарировав их предварительно от окружающих тканей.

4.7.6. При невозможности отбора требуемого количества пробы для исследований используется тот объем образца, который удалось отобрать.

4.8. Фиксация (консервация) проб

4.8.1. Пробы фекальных масс желательно не консервировать, а посев на диагностические среды для бактериологического исследования проводить немедленно, т. к. существует возможность размножения присоединившейся микробной флоры в ущерб микроорганизмам, которые подлежат выявлению. Время до начала исследования не должно превышать 2—3 ч.

4.8.2. При необходимости транспортирования пробы фекальных масс собирают в стерильную одноразовую посуду (бакпечатки) с консервантом или используют специальные транспортные системы, содержащие консерванты (транспортные среды). В качестве консервантов (транспортных сред) используют глицериновую смесь, боратно-буферный раствор, фосфатную буферную смесь. Наиболее универсальным консервантом является транспортная среда Кэри-Блер.

4.8.3. При отборе тканей внутренних органов и костно-мышечного каркаса пробы немедленно после отбора помещают в физиологический раствор или в специальную транспортную среду (0,218 М сахароза, 0,0038 М KH_2PO_4, 0,0072 М K_2HPO_4, 1 % БСА) либо подвергают глубокому замораживанию в жидком азоте (–180 °С).

4.9. Меры предосторожности

4.9.1. Перед проведением исследований воздействия каждого отдельного наноматериала и содержащей его продукции наноиндустрии на лабораторных животных должна быть выполнена предварительная оценка уровня их потенциальной опасности для здоровья человека согласно МР 1.2.2522—09.

4.9.2. Биологические образцы, предположительно содержащие наночастицы и наноматериалы, следует рассматривать как потенциально опасные и соблюдать в обращении с ними соответствующие меры предосторожности для потенциально опасного биологического материала согласно стандартным операционным процедурам (СОП), установленным в лаборатории, проводящей исследование.

4.9.3. Работы с биологическими материалами и жидкостями, содержащими наночастицы, следует проводить в резиновых перчатках. Работы с отобранными биологическими пробами, предположительно содержащими наноматериалы, выполняются в ламинаре или в отдельных боксовых помещениях, снабжённых системой вентиляции. Отбор проб следует производить в одноразовую посуду.

4.9.4. Проанализированные биологические материалы инактивируются автоклавированием в течение 1 ч при давлении в 1,5 атм. или кипячением при 100 °С в течение 30 мин. После этого биологические материалы, предположительно содержащие наночастицы, сдают в специализированные организации, осуществляющие утилизацию потенциально опасных биологических отходов. ***Запрещается***: утилизация биологических материалов с бытовым мусором, слив жидких биологических образцов в канализацию.

4.9.5. В процессе выполнения работ с наноматериалами обязательным является ношение персоналом рабочей/защитной одежды (халат, шапочка, спецобувь, перчатки). При выполнении работ, при которых возможно образование аэрозолей наноматериалов, дополнительно используются средства индивидуальной защиты (защитные очки, респиратор). На рабочих местах запрещается принимать еду, пить, курить, употреблять жевательную резинку, наносить косметику, а также хранить продукты питания, напитки, табачные изделия, выращивать комнатные

растения. После завершения работ с наноматериалами проводят влажную уборку на рабочем месте и в помещении.

4.9.6. Для предохранения от инфицирования персонала при отборе проб биоматериалов и их транспортировании необходимо:

- не загрязнять наружную поверхность посуды при отборе проб;
- не загрязнять сопроводительные документы;
- избегать контакта пробы биоматериала с не защищёнными перчатками руками сотрудников, проводящих сбор и транспортирование проб;
- транспортировать пробы в переносках или укладках с раздельными гнездами.

После вскрытия животных инструменты, пластины для манипуляций, хирургические столики, банки, бачки, садки из-под животных, подстилочный материал и так далее должны обеззараживаться путем замачивания в дезинфицирующем растворе с последующим автоклавированием. Для дезинфекции допускается использование только дезинфицирующих средств, разрешенных в установленном порядке к применению в Российской Федерации. Методы и средства обеззараживания определяются в каждом отдельном случае в зависимости от характера исследуемого наноматериала (биогенного или абиогенного происхождения), характера обеззараживаемого материала и целевого назначения средства.

Для дезинфекции применяют средства, содержащие в качестве действующих веществ активный кислород (перекисные соединения и другое), катионные поверхностно-активные вещества, хлорактивные соединения, альдегиды, спирты (этанол, пропанол и др.), чаще всего в виде многокомпонентных рецептур, содержащих одно или несколько действующих веществ и функциональные добавки (антикоррозионные, дезодорирующие, моющие и др.). Режимы дезинфекции различных объектов дезинфицирующими средствами приведены в инструкциях по их применению.

Согласно СП 1.3.2322—08 для обработки поверхностей в помещениях, приборов и оборудования используют дезинфицирующие средства с моющим эффектом. Для дезинфекции выделений (фекалий и др.) и посуды из-под выделений используют хлорактивные средства. Для дезинфекции спецодежды используют средства, не содержащие альдегидов и спиртов. Для дезинфекции хирургических инструментов и лабораторной посуды применяются средства на основе альдегидов, катионных поверхностно-активных веществ, перекиси водорода, хлорсодержащие средства. Для дезинфекции банок, бачков, садков из-под животных используют дезинфицирующие средства на основе альдегидов, катионных поверхностно-активных веществ, перекиси водорода, спиртов, хлорсодержащие средства.

4.9.7. Твердые обеззараженные отходы и тушки животных сдают в специализированные организации, осуществляющие утилизацию потенциально опасных биологических отходов. Допускается промежуточное хранение до утилизации трупного материала в упакованном виде в специально выделенной для этих целей и размещённой в отдельном помещении морозильной камере, при температуре не выше –18 °С. ***Запрещается:*** хранение трупного материала в бытовых и предназначенных для хранения химических реактивов холодильниках. Хранение и утилизация трупного материала и биологических отходов, получаемых в экспериментах с применением наночастиц, должны осуществляться отдельно от аналогичных материалов, получаемых в исследованиях, где наночастицы и наноматериалы не используются. На упаковочную тару для биологических отходов, предположительно содержащих наночастицы и наноматериалы, наносят предупредительные надписи («наноопасность», «содержит наночастицы/наноматариалы» и т. д.).

4.9.8. Все рабочие подразделения должны быть обеспечены аварийными аптечками. В состав аварийной аптечки входит: спирт этиловый 70° (два флакона по 100 $см^3$), 2—3 навески перманганата калия для приготовления 0,05 %-го раствора (12,5 мг перманганата калия + 25 $см^3$ воды), вода для инъекций, одноразовые шприцы, глазные пипетки, 5 %-я настойка йода, 3 %-й раствор перекиси водорода, ножницы с закругленными браншами, перевязочные средства (вата, бинты и пр.), жгут и нашатырный спирт.

При работе с микроорганизмами, вирусами и наноматериалами, содержащими ДНК, РНК (псевдовирусными наночастицами), в аптечке также должен быть 1 %-й раствор борной кислоты или навески для приготовления раствора (0,25 г борной кислоты + 25 $см^3$ воды), специфические сыворотки, иммуноглобулины на 2—4 человека, интерферон или индуктор интерферона, антибиотики широкого спектра действия из тетрациклиновой группы (хлортетрациклин, окситетрациклин, тетрациклин или др.) и из группы аминогликозидов (стрептомицин, канамицин, мономицин или др.) по 1 флакону для приготовления растворов.

4.9.9. При пипетировании необходимо пользоваться только резиновыми грушами или автоматическими устройствами. Жидкость из пипетки должна стекать по внутренней стенке сосуда. Не допускается переливание жидких образцов через край, продувание через них воздуха из пипеток.

4.9.10. По окончании работы биологические образцы должны переноситься в хранилища (сейфы, холодильники, термостаты и т. д.). Не допускается оставлять после окончания работы на открытых местах или

в неопечатанных хранилищах биологические образцы, посуду с посевами микроорганизмов и вводимые животным наноматериалы.

4.10. Возможные нештатные ситуации и меры по их устранению

4.10.1. Различают следующие виды аварий и внештатных ситуаций:

- с разбрызгиванием образца, т. е. с образованием аэрозоля (бой пробирок, флаконов или колб с жидкими образцами; разбрызгивание тканевой или клеточной суспензии из пипетки или шприца; разбрызгивание тканевой жидкости при вскрытии трупов животных, а также другие аварии, ведущие к загрязнению воздуха или окружающих предметов аэрозолем, предположительно содержащим наноматериалы);
- без разбрызгивания образца (разлив, утечка биологического материала через трещины в лабораторной посуде, пробирках для центрифугирования, падение капель жидкости и фрагментов тканей на лабораторные столы, пол лаборатории и т. д.);
- нарушение целостности кожных покровов сотрудников, проводящих отбор проб, вследствие травмы, нанесённой хирургическими инструментами, осколками лабораторной посуды и т. д.

4.10.2. При аварии с разбрызгиванием все находящиеся в помещении лица должны немедленно прекратить работу и принять меры по обезвреживанию зараженных участков, используя средства обезвреживания, установленные в СОП.

4.10.3. Забрызганная защитная одежда должна быть обильно смочена дезинфицирующим раствором (п. 4.9.6) и помещена в бикс (бак) для последующего автоклавирования. Сотрудники должны надеть чистую рабочую одежду.

4.10.4. При попадании жидких образцов в ротовую полость или на слизистые оболочки следует обильно промыть их водой, рот и горло прополоскать этиловым спиртом. Руки обрабатывают дезинфицирующим раствором или спиртом.

4.10.5. Осколки разбитой посуды собирают тампонами с дезинфицирующим раствором (п. 4.9.6), лабораторную посуду, находившуюся в момент аварии на рабочих поверхностях, обтирают салфеткой, смоченной дезинфицирующим раствором. По окончании дезинфекции для обеззараживания воздуха и поверхностей помещения используют бактерицидные лампы. Вытяжная вентиляция во время дезинфекции и последующей экспозиции должна оставаться включенной.

4.10.6. При аварии без разбрызгивания накладывают тампон с дезинфицирующим раствором на место контаминации, затем протирают дезинфицирующим раствором рабочую поверхность. Руки обрабатывают дезинфицирующим раствором или 70°-м спиртом.

4.10.7. При аварии, связанной с нарушением целостности кожных покровов: прекращают работу, руки обрабатывают дезинфицирующим раствором. Снимают перчатку и выдавливают из ранки кровь в дезинфицирующий раствор, на место ранения ставят компресс с дезинфицирующим раствором или 70° этиловым спиртом, затем обрабатывают 5 %-м раствором йода.

V. Транспортирование и хранение биологических образцов

5.1. Тара для транспортирования биологических образцов, упаковка и маркировка

5.1.1. Подлежащие транспортирование биологические образцы от животных, подвергнутых воздействию наноматериалов, следует собирать в одноразовые стерильные контейнеры (флаконы, пробирки) с завинчивающейся крышкой (материал – стекло, полиэтилен, полипропилен, полистирол), позволяющие осуществлять глубокую заморозку проб. Контейнеры, применяемые для транспортирования образцов, материала должны обеспечивать герметичность, стерильность и целость образцов, а также исключать при открытии возможность образования аэрозоля.

5.1.2. Пробы, предназначенные для определения лабильных биохимических показателей (активности ферментов, уровней гормонов, цитокинов, простагландинов и др.), следует замораживать немедленно после отбора и транспортировать в замороженном виде в дюарах с жидким азотом (–180 °С). В этих условиях время транспортирования проб не ограничивается.

Пробы тканей и сыворотки (плазмы) крови, в которых предполагается определение прочих биохимических показателей (уровни метаболитов, продуктов перекисного окисления липидов, неорганических ионов, минеральных веществ, витаминов, ДНК, РНК, белковых антигенов и др.), следует замораживать после отбора при температуре не выше –20 °С и транспортировать в сумках-холодильниках, в условиях «холодовой цепи» при температуре не выше –5 °С. Охлаждение сумок-холодильников осуществляется с помощью охлаждающих элементов промышленного изготовления, заполненных солевым раствором, предварительно термически уравновешенных в морозильной камере при температуре не выше –20 °С или с помощью кусков твёрдой углекислоты. Время транспортирования не должно превышать 7 суток.

Для транспортирования образцов, предназначенных для определения ДНК и РНК, используют стеклянную и пластиковую посуду с мар-

кировкой «*RNase-, DNase-free*» либо обработанную ингибиторами РНКаз.

Образцы цельной крови, клеточных фракций (включая эритроцитарную массу) при транспортировании не замораживают; транспортирование осуществляют в сумках-холодильниках, охлаждаемых пакетами или грелками, заполненными колотым льдом, при температуре 2—8 °С. Время транспортирования образцов – не более 3 суток.

Образцы тканей для морфологических исследований в соответствующих задачам исследования фиксирующих растворах (формальдегид, параформ и др.) транспортируют в сумках-холодильниках при температуре не ниже 0 и не выше 20 °С. Замораживание проб не допускается. Время транспортирования проб не ограничивается.

Образцы фекальных масс для анализа состава микробиоценоза, как правило, не подлежат хранению и транспортированию, анализ (посев содержимого на питательные среды) следует проводить немедленно после отбора проб. В исключительных случаях для транспортирования проб возможно использование специальных транспортных систем (свабов) с транспортными средами (Кэри-Блер, Амиеса, Стюарта) и без них, разрешенных к применению на территории Российской Федерации. Транспортирование проб в этих условиях проводится при температуре 2—8 °С в течение не более 2—3 ч.

5.1.3. Контейнеры с пробой необходимо поместить в тару (предпочтительно – сейф-пакет промышленного изготовления), которая опломбируется или опечатывается. Аналогично при необходимости производится опечатывание контрольных (арбитражных) проб, закладываемых на хранение. Данные, позволяющие идентифицировать опечатанные (опломбированные) пробы, вносятся в протокол отбора проб.

5.1.4. Отобранный биологический материал должен быть промаркирован таким образом, чтобы надпись не стиралась. На контейнере (пробирке или флаконе) указывают только номер пробы. Остальная информация указывается в протоколе отбора проб, заполняемом в соответствии с п. 4.3.2 и прилож. 1 к настоящим методическим указаниям. При необходимости в протоколе может указываться дополнительная информация, не предусмотренная прилож. 1 к настоящим методическим указаниям. ***Запрещается*** наносить номера и иные идентифицирующие надписи на пробки (крышки) контейнеров для проб и иные элементы тары, удаляемые до начала исследования образцов.

5.1.5. При транспортировании серии однородных проб (от группы животных) допускается составление на них единого протокола отбора

проб, в котором, в дополнение к п. 5.1.4, должно быть указано общее число проб и порядок их нумерации.

5.2. Требования к транспортным средствам

5.2.1. Для перевозки биологического материала должны использоваться специально оборудованные автотранспортные средства, оборудование которых обеспечивает поддержание постоянства состояния, состава и качества проб, а также безопасность окружающей среды, требования асептики и антисептики, отсутствие резкого перепада температур и влажности, предохранение образцов от вредного воздействия окружающей среды и погодных условий, защиту контейнеров с образцами от разрушения в случае аварии транспортного средства.

5.2.2. При транспортировании проб на значительные расстояния допускается использование авиационного или железнодорожного транспорта при условии выделения для сумок (укладок), содержащих контейнеры с образцами биологического материала, отдельного багажного места.

5.2.3. Не допускается транспортирование образцов общественным городским и пригородным транспортом, а также необорудованным личным автотранспортом.

5.2.4. Сумки (укладки), содержащие контейнеры с образцами, должны быть в обязательном порядке маркированы с нанесением предупредительных надписей «биоопасность», «наноопасность», «содержит наноматериалы/наночастицы» и т. д.

5.3. Требования к хранилищу (банку) биологических образцов

5.3.1. Хранение биологических образцов, полученных от животных, подвергнутых воздействию наноматериалов, должно осуществляться в отдельных, хорошо вентилируемых помещениях, оборудованных раковиной с подводкой воды, в морозильных камерах. Не допускается хранение образцов в помещениях общего пользования, в холодильниках или морозильных камерах, используемых для хранения пищевых продуктов, кормов, химических реактивов и т. д.

5.3.2. Стены, пол и мебель помещений для хранения биологических образцов должны быть покрыты материалами, выдерживающими влажную уборку и дезинфекцию.

5.3.3. Помещение для хранения образцов дополнительно оборудуется рабочим столом, контейнером для раздельного сбора мусора (упаковочной тары, тампонов с дезрастворами, бумаги, транспортных

наполнителей и т. д.), предположительно загрязненного наноматериалами, ёмкостью для приготовления дезраствора, источниками УФ-света (кварцевыми лампами) для проведения стерилизации помещения.

5.3.4. Контейнеры с образцами, полученными от животных одной (опытной или контрольной) группы, должны храниться в пластмассовых, металлических или стеклянных коробках или укладках с крышками, отдельно от образцов, полученных от животных других групп и животных, обработанных другими видами наноматериалов. Коробки (укладки) для хранения контейнеров с образцами должны быть маркированы (подписаны) для облегчения поиска необходимого образца. Содержание надписи должно включать:

- дату исследования;
- наименование эксперимента (исследуемого наноматериала);
- наименование или номер группы;
- предельный срок хранения;
- фамилию ответственного лица.

Запрещается наносить маркирующие надписи на крышки коробок (укладок) во избежание их случайной замены при извлечении образцов.

Категорически запрещается хранение неподписанных контейнеров, коробок, укладок с пробами биологического материала. При выявлении неподписанных контейнеров с пробами или таких контейнеров, подписи на которых невозможно прочитать, контейнеры (без их вскрытия) подлежат утилизации вместе с потенциально опасным биологическим материалом (п.п. 4.9.4, 4.9.7).

5.3.5. Помещение для хранения биологических образцов должно быть оборудовано кодовым замком либо аналогичным устройством и охранной сигнализацией для ограничения несанкционированного доступа.

5.4. Допустимые температурные режимы и сроки хранения биологических образцов

5.4.1. Биологические образцы фекальных масс хранят до анализа (посева на питательные среды) при 2—8 °С не более 2—3 ч;

5.4.2. Образцы для анализа содержания лабильных биологических показателей (гормонов, простагландинов, цитокинов, ферментов) хранят в дюарах с жидким азотом в течение неограниченного времени или при температуре –20 °С в течение не более 3 суток.

5.4.3. Образцы тканей, сыворотки (плазмы) крови для анализа прочих биохимических показателей (содержание метаболитов, неорганиче-

ских ионов, минеральных веществ, продуктов ПОЛ), а также для выделения РНК и ДНК хранят при температуре:

- от 2 до 8 °С – не более 6 ч;
- –20 °С – не более 14 суток (ДНК и РНК – 7 суток);
- жидкого азота – неограниченно долго.

5.4.4. Для всех замороженных образцов допускается только однократное размораживание. При необходимости проведения нескольких неодновременных исследований одной и той же пробы она должна замораживаться и храниться в соответствующем числе реплик (повторов).

5.4.5. Образцы цельной крови, клеточной (в т. ч. эритроцитарной) массы хранят до анализа при температуре от 2 до 8 °С не более 1 суток. Замораживание этих образцов не допускается.

5.4.6. Образцы органов и тканей для морфологического исследования хранят в соответствующем фиксаторе (раствор формальдегида, параформа и т. д.) при температуре 2 до 8 °С в темноте. Срок хранения образцов не ограничивается. Замораживание проб не допускается.

5.5. Признаки, свидетельствующие о порче (непригодности) биологических образцов

5.5.1. Для лабораторных исследований не берут образцы с нарушенной герметичностью и целостностью контейнеров, сорванными пломбами и печатями с упаковочной тары.

5.5.2. Непригодными для исследований считают образцы, которые доставлены в загрязненной посуде, со следами физического воздействия (трещинами, отколотыми краями и другими дефектами).

5.5.3. Забраковываются образцы биологических жидкостей и тканей с явно выраженными признаками порчи (резкий, неприятный гнилостный запах, изменения консистенции, цвета, наличие глубокого или значительного поражения плесенью, брожение, гниение, ослизнение, прокисание и др.).

5.5.4. Образцы для микробиологического исследования анализируются даже при наличии неприятных запахов, изменения цвета, консистенции и так далее, так как эти признаки могут свидетельствовать о действии, оказываемом исследуемым наноматериалом на показатели микрофлоры кишечника.

5.5.5. На непригодные для исследования образцы составляется акт о списании, в котором указывают причину забраковки пробы. Акт передаётся в организацию, ответственную за отбор проб, в течение не более 24 ч с момента выявления порчи (дефекта) проб.

Приложение 1

Типовой протокол (акт) отбора проб для характеристики действия наноматериалов на лабораторных животных

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

_____

(наименование организации, осуществляющей отбор проб)

адрес:_____

телефон: _____ факс: _____ электронная почта: _____

АКТ

отбора проб биологического материала

№ _____ от «_____» _____ 20_____ г.

Город (район, населенный пункт) _____

Место отбора проб _____

_____

Мною (нами), _____,

в присутствии _____

проведен отбор проб _____

_____(указать вид отбираемого материала)

_____

Цель проведения лабораторных исследований _____

_____

Наименованное наноматериала, введенного животным (в случае контрольных групп – указать их наименование) _____

Дата (даты) введения животным наноматериала (контрольного материала)

_____

Количество образца, единицы измерения _____

Проба отобрана методом _____

Способ консервации пробы _____

Общее число отобранных повторов образцов:

из них контрольных _____

из них лабораторных _____

Пробы отобраны _____ (дата) в _____ ч _____ мин

в общем числе _____, пронумерованы и опломбированы (опечатаны)

_____

(приводится список номеров проб, номер пломбы, номер сейф-пакета)

направляются в _____

_____

(указать наименование лаборатории)

для _____

_____

(указать перечень показателей, по которым необходимо провести исследования)

_____

(отметка о порядке хранения образцов)

Отметки о дополнительных документах, направляемых с пробами:

_____

_____

(наименование, номер и дата сопроводительного документа)

Дата отправки проб _____, время: _____ ч _____ мин

Способ отправки (доставки) проб:

_____

Отметка о месте хранения контрольной пробы (проб) _____

_____

Настоящий акт составлен в двух экземплярах под одним номером и вручен (направлен):

– 1-й экземпляр предназначен для отправки в лабораторию;

– 2-й экземпляр хранится у специалиста (в организации) осуществлявшего отбор проб.

Подпись представителя(ей), осуществлявших отбор проб:

_____ _____

(подпись) (Ф., И., О.)

_____ _____

(подпись) (Ф., И., О.)

Представитель организации, осуществлявшей доставку проб в лабораторию:

_____ _____

(подпись) (Ф., И., О.)

Приложение 2

Термины и определения

Контейнер – элемент упаковки для размещения индивидуальной пробы (пробирка, флакон).

Контрольная проба – часть средней пробы, хранящаяся в организации (лаборатории), проводящей отбор проб, и предназначенная для повторного или арбитражного исследования в случае конфликта интересов сторон, принимающих участие в исследовании безопасности наноматериалов.

Лабораторная проба – часть средней пробы, предназначенная для формирования тестового образца (образцов), направляемого на исследования в организацию (лабораторию), изучающую характер действия наноматериалов на лабораторных животных.

Лабораторные животные – животные, специально выращиваемые в специализированных питомниках или проводящих исследования лабораториях, отвечающие установленным требованиям и используемые в лабораториях в целях научных исследований и экспертных оценок.

Надлежащая лабораторная практика (Стандарт *GLP*, «*Good Laboratory Practice*») – система норм, правил и указаний, направленных на обеспечение согласованности и достоверности результатов лабораторных исследований, в том числе репрезентативность отбора проб.

Наноматериалы – вид продукции наноиндустрии, вещества и композиции веществ, представляющие собой искусственно или естественно упорядоченную систему базовых элементов с нанометрическими характеристическими размерами и особым проявлением физического и (или) химического взаимодействий при кооперации наноразмерных элементов, обеспечивающих существенное улучшение или возникновение совокупности качественно новых (в том числе, ранее неизвестных) механических, химических, электрофизических, оптических, теплофизических и других свойств данных материалов, определяемых проявлением наномасштабных факторов.

Нормативные документы – государственные (национальные стандарты) (ГОСТ), методические указания (МУ), ветеринарные правила и нормы (ВетПиН) и санитарные правила и нормы (СанПиН), устанавливающие нормы, правила, методы, применяемые в ходе отбора, транспортирования и хранения проб.

Проба – одна или несколько единиц (объёмов) вещества, отобранных установленными способами из совокупности (лота, партии), позво-

ляющая получить информацию о заданной характеристике совокупности и являющаяся основой для принятия решения о совокупности, веществе или процессе их производства.

Репрезентативная проба – проба, сохраняющая характеристики лота, партии, из которого была выбрана. Её частным случаем является случай простой случайной пробы (точечная проба), когда у каждого элемента или части вещества есть равная вероятность попасть в пробу.

Стандартные операционные процедуры – документы, в которых детально изложено выполнение определенных лабораторных процедур, которые, как правило, не детализированы в методических руководствах и не приводятся в протоколах отбора проб.

Приложение 3

Обозначения и сокращения

РНК	Рибонуклеиновая кислота
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
БСА	Бычий сывороточный альбумин
RNase-, DNase-free	Свободный от РНКаз, ДНКаз
РНКаза (ДНКаза)	Рибонуклеаза (дезоксирибонуклеаза)

gost.e-ecolog.ru