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

1.2. ГИГИЕНА, ТОКСИКОЛОГИЯ, САНИТАРИЯ

Порядок отбора проб для выявления, идентификации и характеристики действия наноматериалов в рыбах

Методические указания
МУ 1.2.2744—10

gost.e-ecolog.ru

ББК 51.2
П59

П59 **Порядок** отбора проб для выявления, идентификации и характеристики действия наноматериалов в рыбах: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010.—23 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); Учреждение Российской академии наук Институт проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова РАН (Д. С. Павлов, Ю. Ю. Дгебуадзе, Е. Ю. Крысанов, Т. Б. Демидова, А. В. Купцов); Федеральное государственное унитарное предприятие «Всероссийский научно-исследовательский институт метрологической службы» (ФГУП ВНИИМС) (С. А Кононогов, С. С. Голубев); Учреждение Российской академии наук Центр «Биоинженерия» РАН (К. Г. Скрябин, О. А. Зейналов, Н. В. Равин, С. П. Комбарова); 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); 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 5
III. Общие положения 7
3.1. Цель и назначение пробоотбора 7
3.2. Требования к организации, проводящей отбор проб 8
3.3. Перечень объектов и материалов, подлежащих пробоотбору 8
3.4. Соблюдение правил надлежащей лабораторной практики 9
3.5. Соблюдение мер конфиденциальности 10
3.6. Организация защиты проб от несанкционированных внешних воздействий 10
3.7. Ответственность организации, производящей отбор проб 10
IV. Процедура отбора проб 11
4.1. Составление плана отбора проб 11
4.2. Протоколирование отбора проб 11
4.3. Меры по обеспечению репрезентативности пробоотбора 12
4.4. Порядок отбора точечной, объединённой, средней, лабораторной, контрольной проб биологического материала 13
4.5. Методы гуманной эвтаназии рыб 14
4.6. Методы препарирования рыб для определения наноматериалов 14
4.7. Меры предосторожности при введении наноматериалов в рыб, эвтаназии, препарировании биоматериала, отборе и консервации проб 15
4.8. Меры по устранению возможных нештатных ситуаций 17
V. Транспортирование и хранение биологических образцов 17
5.1. Тара для транспортирования биологических образцов, упаковка и маркировка 17
5.2. Температурный режим, допустимая длительность транспортирования 18
5.3. Требования к транспортным средствам 18
5.4. Требования к хранилищу (банку) биологических образцов 19
5.5. Признаки, свидетельствующие о порче (непригодности) биологических образцов 20
Приложение 1. Типовой акт отбора проб для выявления и идентификации наноматериалов в рыбах 21
Приложение 2. Термины и определения 23

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 выявления, идентификации и характеристики действия наноматериалов в рыбах

Методические указания МУ 1.2.2744—10

I. Область применения

1.1. Настоящие методические указания устанавливают требования к методам отбора проб органов и тканей рыб, предназначенных для выявления и идентификации наноматериалов в рыбах и характеристики действия наноматериалов на рыб 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 исследований по оценке безопасности наноматериалов в целях принятия решений по оценке рисков, связанных с воздействием наночастиц и наноматериалов на организм человека и объекты окружающей среды.

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, аквакультуры, рыб садкового содержания, 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 профи-

ля, 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 02 февраля 2006 г. № 60 «Об утверждении Положения о проведении социально-гигиенического мониторинга».

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 содержащей наноматериалы».

2.13. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 31 октября 2007 г. № 79 «Об утверждении Кон-

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2.35. ГОСТ 4234—77 «Реактивы. Калий хлористый. Технические условия».

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

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

III. Общие положения

3.1. Цель и назначение пробоотбора

3.1.1. Целью отбора проб является получение представительной и усреднённой пробы, которая наиболее полно позволит выявить и идентифицировать исследуемые наноматериалы в рыбах и охарактеризовать воздействие на них наночастиц и наноматериалов в ходе проведения исследований по токсиколого-гигиенической характеристике наночастиц и наноматериалов и оценке их воздействия на состояние объектов окружающей среды, в т. ч. с учётом использования соответствующих контрольных образцов.

3.1.2. Назначение процедуры отбора проб заключается в отборе для заданной цели тех образцов органов и тканей рыб, в которых с наибольшей вероятностью можно выявить и идентифицировать исследуемые наноматериалы и которые с наибольшей вероятностью являются мишенями воздействия наноматериалов.

3.1.3. Биологические образцы, полученные от рыб, подвергшихся в условиях эксперимента (биологического тестирования) или в естественной среде обитания воздействию наночастиц и наноматериалов, могут содержать их остаточные количества и поэтому должны рассматриваться как объекты, обладающие потенциальной биологической опасностью. Особенности процедур отбора проб должны обеспечивать снижение риска воздействия наночастиц и наноматериалов 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 организации, проводящей отбор проб

3.2.1. Организации, проводящие отбор проб, должны быть уполномочены в установленном порядке на право проведения санитарно-эпидемиологических экспертиз и исследований.

3.2.2. Организации, проводящие отбор проб, должны быть оснащены необходимым оборудованием, в т. ч. средствами измерений, прошедшими поверку (калибровку) в установленном порядке.

3.2.3. Эксплуатация оборудования проводится в соответствии с техническим паспортом и инструкцией по применению. 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 водными организмами и пройти инструктаж по технике безопасности и методам преодоления последствий нештатных ситуаций, возникающих в процессе работы.

3.3. Перечень объектов и материалов, подлежащих пробоотбору

3.3.1. Перечень биологических материалов (тканей, органов, целых организмов рыб), являющихся предметом пробоотбора, определяется целями и задачами проводимых исследований, способом введения наноматериалов рыбам в эксперименте, физико-химическими характеристиками наноматериалов (размер частиц, химический и фазовый состав), а также имеющимися в распоряжении лаборатории, проводящей исследование, данными о местах накопления в организмах рыб наноматериалов и органах-мишенях их воздействия.

3.3.2. Общими требованиями к биологическому материалу являются максимальная концентрация исследуемого наноматериала в образце, а также отсутствие нежелательных примесей, которые могли бы исказить результаты, получаемые с помощью применяемых для анализа методик.

3.3.3. В качестве лабораторных объектов для изучения действия наноматериалов на рыб рекомендуется использовать следующие виды рыб аквариумного разведения: *Nothobranchius rachovi, Danio rerio, Poecillia reticulata, Oryzias latipes.*

3.3.4. При отборе проб в природных условиях следует ориентироваться на доминирующие в численном отношении в данной акватории виды пелагических или донных рыб.

3.3.5. Возраст отбираемых на исследование экземпляров рыб определяется в зависимости от цели и задач исследования. При использова-

нии лабораторных видов предпочтительно использование рыб в возрасте 1—3 месяцев.

3.4. Соблюдение правил надлежащей лабораторной практики

3.4.1. В процессе отбора проб для выявления, идентификации и характеристики действия наноматериалов в рыбах 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 пробоотбора;
- документальное сопровождение всех этапов пробоотбора;
- отсутствие неконтролируемых влияний процедур пробоотбора на результаты анализа наноматериалов и их биологического тестирования;
- репрезентативность отбираемых проб;
- гуманное обращение с используемыми животными.

3.4.3. Соблюдение правил надлежащей лабораторной практики применительно к процедурам отбора проб от рыб 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 наноматериалов и вспомогательных реактивов; 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 содержания гидробионтов (аквариальной), обеспечивающего раздельное содержание различных видов рыб и рыб одного вида, используемых в исследованиях биологического действия различных наноматериалов, соответствующего санитарно-эпидемиологическим и ветеринарным требованиям;

• наличие отдельных помещений, инвентаря и оборудования 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 биологических проб от рыб, обязаны соблюдать конфиденциальность в отношении любых данных (результатов наблюдений), полученных в ходе процедуры отбора проб в соответствии с законодательством Российской Федерации.

3.5.2. Организация, осуществляющая пробоотбор для выявления и идентификации наноматериалов в рыбах, должна обеспечить конфиденциальность полученных в ходе пробоотбора данных (результатов наблюдений) о воздействии наноматериалов на водных беспозвоночных в рамках принятых ею обязательств и в соответствии с законодательством Российской Федерации.

3.6. Организация защиты проб от несанкционированных внешних воздействий

3.6.1. Организация, осуществляющая отбор проб для выявления и идентификации наноматериалов в рыбах и характеристики действия наноматериалов на рыб, должна обеспечить защиту отбираемых проб 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 в процессе отбора проб несут организации, осуществляющие пробоотбор.

3.7.2. Ответственность за сохранность проб и документации на пробы при перевозке, соблюдение правил техники безопасности при перевозке несут организации, ответственные за перевозку проб.

IV. Процедура отбора проб

4.1. Составление плана отбора проб

План отбора проб составляется перед началом исследований и должен включать следующие данные:

4.1.1. Наименование выявляемого наноматериала, оценка его потенциальной опасности согласно МР 1.2.2522—09, свойства наноматериала (согласно данным производителя (поставщика) продукции и (или) литературным данным).

4.1.2. Видовая принадлежность рыб, от которых производится отбор проб, вид отбираемых проб (исследуемого биологического материала).

4.1.3. Методика отбора проб.

4.1.4. Перечень используемого для отбора проб оборудования и реактивов.

4.1.5. Число отбираемых проб и их размер (масса, число особей).

4.1.6. Инструкции по разделению отобранной пробы на части (выделению контрольной пробы при необходимости).

4.1.7. Тип и характеристики тары для отбора, транспортирования и хранения проб.

4.1.8. Способ нанесения маркировки на тару.

4.1.9. Специальные меры предосторожности при работе с наноматериалами, соблюдение стерильности.

4.1.10. Условия хранения и транспортирования проб.

4.1.11. Инструкции по очистке и хранению оборудования для отбора проб, инактивации био- и наноматериалов.

4.2. Протоколирование отбора проб

4.2.1. Процедура отбора проб должна быть запротоколирована по окончании процесса. В протоколе отбора проб указывают:

- название организации, производившей отбор проб;
- фамилии сотрудников, проводивших отбор проб;
- место отбора проб (при отлове рыб из естественных водоёмов);
- наименование исследуемого биологического материала (несокращённое родовое и видовое название рыбы согласно действующей биологической номенклатуре в русской и латинской транскрипции), для крупных рыб – наименование отбираемой ткани (органа);
- цель исследования (медико-биологическое тестирование в целях экспертизы безопасности продукции наноиндустрии; плановый контроль и надзор и др.);
- размер пробы (число особей или масса), единицы измерения;

• метод отбора пробы;

• способ консервации пробы (при наличии);

• 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 и транспортировку проб (с расшифровкой подписей).

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

4.2.3. При отборе однородных серийных проб биоматериала возможно составление единого протокола на серию проб (образцов) с обязательным указанием порядка нумерации и общей численности индивидуальных проб.

4.3. Меры по обеспечению репрезентативности пробоотбора

4.3.1. Для исследований следует отбирать здоровых рыб установленной видовой принадлежности и определённого задачами исследования возраста, ограничиваясь тем минимальным их количеством, которое требуется для получения научно достоверных результатов. Следует избегать отбора животных с видимыми аномалиями развития, уродствами, поражением гельминтами и эктопаразитами, если иное не диктуется задачами исследований.

4.3.2. Число особей, отбираемых для исследования, должно быть минимальным, однако достаточным для получения статистически достоверных результатов. При исследованиях на биологических объектах удовлетворительная погрешность определения (доверительный интервал) исследуемого показателя принимается равным 10 % при уровне

значимости $p < 0,05$. В этом случае число обследуемых особей должно быть установлено на основе соотношения:

$$\delta = \frac{\sqrt{S^2}}{\sqrt{N}} \cdot t_{0,025;\,N-1}, \text{ где}$$

δ – абсолютная погрешность определения;

N – численность группы (подбирается экспериментально);

t – значение критерия Стьюдента для уровня значимости $p = 0,025$ и числа степеней свободы $N–1$;

S^2 – квадрат выборочной дисперсии, определяемой по формуле:

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

X_i – определённые в опыте значения показателя (концентрации наночастиц);

$\overline{X}$ – их арифметическое среднее.

В большинстве случаев для обеспечения репрезентативности исследования каждая из исследуемых групп должна содержать не менее 10 экземпляров рыб.

4.3.3. При необходимости в зависимости от целей исследований отбираются образцы от здоровых особей той же видовой принадлежности, не подвергшихся воздействию наноматериалов. Порядок отбора, консервации и хранения этих образцов должен быть идентичен пробам, отобранным от рыб, подвергшихся воздействию наноматериалов.

4.4. Порядок отбора точечной, объединённой, средней, лабораторной, контрольной проб биологического материала

4.4.1. Для выявления и идентификации наноматериалов у рыб отбирают точечные пробы тканей и органов. При исследовании органов, тканей организма на содержание наноматериалов объединённую пробу не формируют. Каждый параметр характеризуется в пробах от индивидуальных рыб, после чего полученный результат усредняется (статистически обрабатывается).

4.4.2. Точечная проба, отобранная для выявления и идентификации определенного наноматериала в биологическом материале, является одновременно и средней пробой, из которой простым делением на две части формируют лабораторную и контрольную пробы. При необходимости контрольная проба выделяется в процессе отбора проб.

4.4.3. В случае проведения исследований в целях арбитража на месте в процессе отбора проб выделяют контрольные (референтные, арбитражные) пробы. Масса (размер) контрольной пробы должна быть не

более массы (размера) лабораторной пробы, но не менее пробы, необходимой для проведения анализов, определяемых целью исследования.

4.4.4. 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.

4.5. Методы гуманной эвтаназии рыб

Для крупных рыб допустимо умерщвление путем быстрого перерезания позвоночного столба на затылке. Мелкие экземпляры умерщвляют путём быстрого помещения в фиксирующий раствор или в жидкий азот. ***Запрещается***: умерщвление путём длительного изъятия из воды.

4.6. Методы препарирования рыб для определения наноматериалов

4.6.1. При отборе проб следует использовать следующее основное и вспомогательное лабораторное оборудование:

Холодильник бытовой электрический	ГОСТ 26678—85
Морозильная камера, обеспечивающая температуру –20 °С или ниже («*Vestfrost*», Дания или аналогичная)	
Весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности с погрешностью взвешивания не более 0,001 г	ГОСТ 24104—88
Столик для манипуляций (из пробки или пенопласта)	
Булавки или иглы для фиксации рыб на препаровальном столике	
Пинцет медицинский	ГОСТ 21241—89
Ножницы медицинские	ГОСТ 21239—93
Скальпель (допускается использование скальпелей со сменными одноразовыми лезвиями)	ГОСТ 30393—95
Термоконтейнеры различной вместимости или медицинская сумка-холодильник	ГОСТ Р 50444—92 и ГОСТ Р 51350—99

Сосуд Дьюара для жидкого азота.

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

4.6.2. При отборе проб следует применять следующие расходуемые материалы:

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;
Перчатки хирургические резиновые ГОСТ 3—88
Одноразовые сейф-пакеты промышленного изготовления.

4.6.3. Кусочки тканей или органов отбирают при вскрытии рыб стерильными инструментами. Необходимость отбора проб каждого из органов определяют по предположительной локализации исследуемого наноматериала согласно документации, предоставляемой производителем (поставщиком) продукции или на основании анализа данных литературы.

В отсутствие данных о локализации наноматериалов органы изымают в последовательности: жабры – пищеварительный тракт – печень – гонады – головной мозг – каркас.

4.6.4. Отобранные образцы тканей и органов делят на две части. Одну часть помещают в стерильные пробирки или флаконы и замораживают при температуре –70 °С. Другую часть для определения наноматериалов с использованием электронной микроскопии предварительно фиксируют в смеси 2,5 % глутарового альдегида на 0,1 М фосфатно-солевом буфере pH 7,2—7,4 с добавлением 2 % нейтрального формалина. Возможно длительное (до 2 месяцев) хранение образцов в фиксаторе при температуре 4 °С. Нельзя допускать замораживание образцов, т. к. образующиеся кристаллы льда разрушают ткани.

4.7. Меры предосторожности при введении наноматериалов в рыб, эвтаназии, препарировании биоматериала, отборе и консервации проб

4.7.1. Перед проведением отбора биологических проб от рыб на основании документации производителя (поставщика) продукции наноиндустрии и собственных данных организации, проводящей отбор проб, должна быть выполнена предварительная оценка уровня потенциальной опасности наноматериала для здоровья человека в соответствии с МР 1.2.2522—09 «Выявление наноматериалов, представляющих потенциальную опасность для здоровья человека».

4.7.2. 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.

4.7.3. 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.

4.7.4. Работы с биологическими материалами, предположительно содержащими наночастицы и наноматериалы, способные к образованию аэрозоля, следует проводить в ламинаре или в отдельных боксовых помещениях, снабжённых системой вентиляции.

4.7.5. Возникающие в ходе пробоотбора отходы биологических материалов 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 отходов, содержащих наноматериалы, в канализацию.

Примечание: при смене воды в аквариумах (ёмкостях), куда были добавлены по условиям эксперимента наноматериалы, сливу воды в канализацию должна предшествовать её очистка от наноматериалов, состоящая (для абиогенных наноматериалов) в отстаивании, фильтрации (через ультрафильтрационные мембраны или толстый слой активированного угля), коагуляции путём добавления соответствующих химических реагентов (алюмокалиевые квасцы и т. д.). Метод очистки воды определяется химической природой применяемого наноматериала. Шлам после очистки воды запрещается утилизировать с бытовым мусором. Воду, содержащую наноматериалы биогенного происхождения, обезвреживают путём добавления перманганата калия или соединений, содержащих активный хлор, с последующим отстаиванием.

4.7.6. После препарирования отобранных проб инструменты, столики для манипуляций, банки, бачки, садки, должны обеззараживаться путем замачивания в дезинфицирующем растворе и последующего автоклавирования.

4.7.7. 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 % настойка йода, 3 %-й раствор перекиси водорода, ножницы с закруглен-

ными браншами, перевязочные средства (вата, бинты и пр.), жгут и нашатырный спирт.

4.7.8. По окончании работы отобранные пробы должны переноситься в хранилища (сейфы, холодильники, термостаты и т. д.). Не допускается оставлять биологические материалы и препараты, содержащие наноматериалы и наночастицы, после окончания работы на открытых местах или в неопечатанных хранилищах.

4.7.9. Поверхности стен, пола и потолка в лабораторных помещениях должны быть гладкими, без щелей, легко обрабатываемыми, устойчивыми к действию моющих и дезинфицирующих средств. Полы не должны быть скользкими. Лабораторная мебель должна иметь покрытие, устойчивое к действию моющих и дезинфицирующих средств, поверхность столов не должна иметь трещин и швов.

4.8. Меры по устранению возможных нештатных ситуаций

4.8.1. При аварии, сопровождающейся загрязнением воздуха, производственного помещения, спецодежды наноматериалами или предположительно содержащими их биологическим образцами, все находящиеся в помещении лица должны немедленно прекратить работу и принять меры по устранению загрязнения, установленные в СОП.

4.8.2. При аварии, связанной с попаданием наночастиц и содержащих их биологических образцов на кожу или слизистые покровы, следует промыть их немедленно большим количеством воды, обработать 70 %-м этиловым спиртом.

4.8.3. Сотрудники должны пройти инструктаж о поведении в случае аварии. В подразделениях должен быть разработан план ликвидации аварии, иметься запас дезинфицирующих средств.

V. Транспортирование и хранение биологических образцов

5.1. Тара для транспортирования биологических образцов, упаковка и маркировка

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

5.1.2. Для отбора пробы необходимо использовать контейнер такого объёма, чтобы не допустить его заполнения доверху и загрязнения крышки.

5.1.3. Контейнер с пробой необходимо запечатать либо упаковать в сейф-пакет, опломбировать или опечатать. Контейнеры для транспортирования материала должны обеспечивать герметичность, стерильность и целостность образцов, а также исключать возможность образования аэрозоля при открытии.

5.1.4. Каждый отобранный образец должен быть идентифицирован таким способом, чтобы исключить возможность изменения данных о пробе, промаркирован таким образом, чтобы надпись не стиралась. На пробирке или флаконе в обязательном порядке указывают номер пробы, соответствующий акту отбора проб или прилагаемой к нему описи. Акт отбора проб составляется на все отправляемые в лабораторию пробы в соответствии с п. 4.2.1.

Запрещается: указывать порядковые номера и иные сведения о пробах на крышках (пробках) пробирок или флаконов с пробами и других элементах тары, удаляемых при вскрытии проб.

5.1.5. При отборе серии однородных образцов от группы рыб допускается их совместная упаковка и опечатывание в сейф-пакете. При этом к акту отбора проб прилагается опись проб, содержащая сведения об общем количестве проб и порядке их нумерации.

5.2. Температурный режим, допустимая длительность транспортирования

Перевозка и хранение материала осуществляется в условиях «холодовой цепи» с обеспечением необходимого контроля установленного температурного и влажностного режима.

Контейнеры, содержащие образцы, помещают в сумку-холодильник или в термоконтейнер с хладагентами. При соблюдении противоэпидемического режима возможна перевозка материала для исследования в металлическом термосе с термопакетами, льдом или сухим льдом.

5.3. Требования к транспортным средствам

5.3.1. 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.

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

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

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

5.4. Требования к хранилищу (банку) биологических образцов

5.4.1. Хранение биологических образцов, полученных от рыб, должно осуществляться в отдельных, хорошо вентилируемых помещениях, оборудованных раковиной с подводкой воды, в холодильниках и 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.

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

5.4.3. 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 содержащего наноматериалы, ёмкостью для приготовления дезраствора, источниками УФ-света (кварцевыми лампами) для проведения стерилизации помещения.

5.4.4. Контейнеры с образцами, полученными от рыб одной (опытной или контрольной) группы должны храниться в пластмассовых, металлических или стеклянных коробках или укладках с крышками, отдельно от образцов, полученных от рыб других групп, и рыб, 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 отбора проб;
- 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. 4.7.5).

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

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

5.5.1. Для лабораторных исследований не принимаются образцы с нарушенной герметичностью и целостностью упаковки, сорванными пломбами и печатями.

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 биологические образцы с явно выраженными признаками порчи (резкий, неприятный гнилостный запах, изменение консистенции, цвета, наличие визуально различимого поражения плесенью, брожение, гниение, ослизнение, прокисание и др.).

5.5.4. Образцы для проведения электронномикроскопического исследования признаются непригодными в случае их замораживания-оттаивания.

5.5.5. На непригодные для исследования образцы составляется акт о списании, в котором указывают причину забраковки пробы. Забракованные пробы уничтожаются в установленном порядке.

Приложение 1

Типовой акт отбора проб для выявления и идентификации наноматериалов в рыбах

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

_____

(штамп организации, осуществляющей отбор проб)

адрес:_____

телефон: _____ факс: _____ электронная почта: _____

Акт
отбора проб

№ _____ от «____» _____ 20____ г.

Город (район, населенный пункт) _____

Место отбора проб _____

_____

(при отлове животных в естественном водоёме указать его местонахождение)

Мною (нами), _____,

(должность; Ф., И., О.)

в присутствии _____

(должность, Ф., И., О.)

проведен отбор проб _____

(указать вид животного, наименование проб)

Цель проведения лабораторных исследований продукции: _____

(экспертиза безопасности продукции наноиндустрии; плановый контроль и надзор, экологический мониторинг, выявление последствий техногенной аварии или нештатной ситуации)

Количество образца, единицы измерения _____

Проба отобрана методом _____

Способ консервации пробы _____

Общее число отобранных повторов образцов: _____

из них контрольных _____

из них лабораторных _____

направляются в _____

_____

(указать наименование лаборатории)

для _____

_____

(указать перечень биологических показателей и наночастиц (наноматериалов), по которым необходимо провести исследования)

Отметки о сопроводительных 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 _____

_____

Подпись представителя(ей), осуществлявших отбор проб

_____ _____

(подпись) (Ф., И., О.)

_____ _____

(подпись) (Ф., И., О.)

Представитель организации, осуществлявшей отправку, доставку проб в лабораторию:

_____ _____

(подпись) (Ф., И., О.)

Настоящий акт составлен в трёх 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.

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.

Надлежащая лабораторная практика (Стандарт *GLP*, «*Good Laboratory Practice*») – система норм, правил и указаний, направленных на обеспечение согласованности и достоверности результатов лабораторных исследований, в т. ч. 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 т. ч. ранее неизвестных) механических, химических, электрофизических, оптических, теплофизических и других свойств данных материалов, определяемых проявлением наномасштабных факторов.

Проба – одна или несколько единиц (объёмов) материала, отобранная установленным способом из совокупности (лота, партии), позволяющая получить информацию о заданной характеристике совокупности и являющаяся основой для принятия решения о совокупности, веществе или их характеристике.

Репрезентативная проба сохраняет 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 протоколах исследований и методических руководствах.

gost.e-ecolog.ru