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

Государственная система
санитарно-эпидемиологического
нормирования Российской Федерации

ISSN 2219-5262

БЮЛЛЕТЕНЬ

НОРМАТИВНЫХ И МЕТОДИЧЕСКИХ ДОКУМЕНТОВ

ГОССАНЭПИДНАДЗОРА

ИЗДАНИЕ ОФИЦИАЛЬНОЕ

МОСКВА — 2011

Год издания 11-й

Март Выпуск 1 (43)

gost.e-ecolog.ru

УЧРЕДИТЕЛИ

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

Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Главный редактор Г. Г. Онищенко

Е. Н. Беляев,
А. И. Верещагин,
Л. П. Гульченко,
С. И. Иванов,
Г. Ф. Лазикова,
С. С. Перель,
Г. С. Перминова,
М. П. Шевырева,
Н. В. Шестопалов

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

А. Х. Агиров (Майкоп),
Г. В. Айдинов (Ростов-на-Дону),
В. А. Алешкин (Москва),
А. А. Баранов (Москва),
Н. Н. Верещагин (Оренбург),
А. Л. Гинцбург (Москва),
В. В. Губернаторова (Иваново),
В. И. Евдокимов (Белгород),
Н. А. Забродин (Ижевск),
А. И. Заиченко (Москва),
Н. Ф. Измеров (Москва),
О. Л. Гавриленко (Московская область),
И. В. Корабельников (Сыктывкар),
С. В. Куркатов (Красноярск),
Г. И. Куценко (Москва),
В. Р. Кучма (Москва),
Б. В. Лимин (Вологда),
Г. Д. Минин (Уфа),
Б. И. Никонов (Екатеринбург),
В. И. Покровский (Москва),
А. И. Потапов (Москва),
Ю. А. Рахманин (Москва),
С. И. Савельев (Липецк),
И. П. Салдан (Барнаул),
В. Р. Саухат (Магадан),
В. П. Сергиев (Москва),
В. А. Тутельян (Москва),
Н. Н. Филатов (Москва),
В. П. Чащин (Санкт-Петербург),
М. И. Чубирко (Воронеж),
М. Г. Шандала (Москва)

Подписка на *Бюллетень нормативных и методических документов госсанэпиднадзора* принимается во всех почтовых отделениях России.
Подписной индекс в каталоге агентства «Роспечать» *«Газеты. Журналы»* — **79682**

Адрес редакции:

117105, Москва, Варшавское ш., 19а
Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора

БЮЛЛЕТЕНЬ
НОРМАТИВНЫХ И МЕТОДИЧЕСКИХ ДОКУМЕНТОВ ГОССАНЭПИДНАДЗОРА

Выпуск 1 (43), март 2011
Издается с 2000 г.

НОРМАТИВНЫЕ ПРАВОВЫЕ АКТЫ

МЕТОДИЧЕСКИЕ ДОКУМЕНТЫ

Зарегистрирован Министерством Российской Федерации по делам печати, телерадиовещания и средств массовых коммуникаций

Номер регистрационного свидетельства 77—1525

Подписано в печать 11.03.11

Формат 60×88/8, печ. л. 18,0, заказ **4457** , тираж 1000 экз.

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
127994, Москва, Вадковский пер., д. 18, стр. 5, 7

Оригинал-макет подготовлен к печати
отделом издательского обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а

Отделение реализации, тел./факс 952-5089
E-mail: gost.e-ecolog.ru

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

СОДЕРЖАНИЕ

НОРМАТИВНЫЕ ПРАВОВЫЕ АКТЫ

Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, содержанию и организации режима работы в дошкольных организациях: СанПиН 2.4.1.2660—10 3

Гигиенические требования к одежде для детей, подростков и взрослых. Доп. и изм. 1 к СанПиН 2.4.7/1.1.1286—03: СанПиН 2.4.7/1.1.2651—10 73

МЕТОДИЧЕСКИЕ ДОКУМЕНТЫ

Порядок отбора проб для выявления и идентификации наноматериалов в лабораторных животных: МУ 1.2.2741—10 113

1.2. ГИГИЕНА, ТОКСИКОЛОГИЯ, САНИТАРИЯ

Порядок отбора проб для выявления и идентификации наноматериалов в лабораторных животных

Методические указания
МУ 1.2.2741—10

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, О. Н. Тананова, В. В. Смирнова, 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, О. В. Самсонова); 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); ООО «Интерлаб» (А. Н. Веденин, Г. В. Казыдуб). Разработаны в рамках Федеральной целевой программы «Развитие инфраструктуры наноиндустрии в Российской Федерации на 2008—2010 гг.».

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.

Содержание

I. Область применения ... 116
II. Нормативные ссылки ... 116
III. Общие положения ... 119
3.1. Цель и назначение пробоотбора ... 119
3.2. Требования к организации, осуществляющей отбор проб ... 119
3.3. Перечень объектов и материалов, подлежащих пробоотбору ... 119
3.4. Соблюдение правил надлежащей лабораторной практики ... 120
3.5. Соблюдение мер конфиденциальности ... 121
3.6. Организация защиты проб от несанкционированных внешних воздействий ... 121
3.7. Ответственность организации, производящей отбор проб ... 121
IV. Технология (процедура) пробоотбора ... 121
4.1. Составление плана (схемы) отбора проб ... 121
4.2. Протоколирование отбора проб ... 122
4.3. Меры по обеспечению репрезентативности пробоотбора ... 122
4.4. Методы гуманной эвтаназии животных ... 123
4.5. Методы препарирования биологического материала для определения биогенных наноматериалов (рекомбинантные вирусы, рекомбинантные вирусные белки, псевдовирусные частицы) ... 123
4.6. Методы препарирования биологического материала для определения наночастиц неорганического происхождения ... 126
4.7. Фиксация (консервация) биологических проб для определения наноматериалов ... 130
4.8. Количество отбираемых проб биологического материала ... 131
4.9. Порядок отбора точечной, объединённой, средней, лабораторной, контрольной проб биологического материала ... 132
4.10. Меры предосторожности при введении наноматериалов в животных, эвтаназии, препарировании биоматериала, отборе и консервации проб ... 132
4.11. Возможные нештатные ситуации в ходе отбора проб биологических материалов и меры по их устранению ... 134
V. Транспортирование и хранение биологических образцов ... 135
5.1. Требования к таре для транспортирования ... 135
5.2. Требования к транспортным средствам ... 136
5.3. Требования к хранилищу (банку) биологических образцов ... 136
5.4. Температурный режим, допустимая длительность транспортирования ... 137
5.5. Допустимые сроки хранения биологических образцов ... 138
5.6. Признаки, свидетельствующие о порче (непригодности) биологических образцов ... 139
Приложение 1. Типовой акт отбора проб для выявления и идентификации наноматериалов в лабораторных животных ... 140
Приложение 2. Термины и определения ... 142
Приложение 3. Обозначения и сокращения ... 144

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 и идентификации наноматериалов в лабораторных животных

Методические указания
МУ 1.2.2741—10

I. Область применения

1.1. Настоящие методические указания устанавливают требования к методам отбора от лабораторных животных проб биологических материалов, предназначенных для определения абиогенных (техногенных) и биогенных наночастиц и наноматериалов искусственного происхождения с учётом данных о путях поступления наноматериалов в организм и предполагаемых органах, в которых может происходить их накопление.

1.2. Требования, изложенные в настоящих методических указаниях, применяются в ходе проведения исследований по оценке безопасности наночастиц и наноматериалов искусственного происхождения 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 02 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 содержащей 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 1.2.036—95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I—IV групп патогенности».

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

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

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

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

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

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 ректифицированный 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 общего назначения и образцовые. Общие технические условия».

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. ОСТ 11-029.003—80 «Изделия электронной техники. Вода, применяемая в производстве. Марки, технические требования, методы очистки и контроля».

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

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

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

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

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

2.47. ГОСТ 1625—89 «Формалин технический. Технические условия».

2.48. ГОСТ 4517—87 «Методы приготовления вспомогательных реактивов и растворов, применяемых при анализе».

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

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

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

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, введенные лабораторным животным, в составе их органов и тканей, а также в выделениях (экскретах) в ходе проведения исследований по токсикологогигиенической характеристике наночастиц или наноматериалов.

3.1.2. Назначение процедуры отбора проб заключается в отборе для заданной цели тех органов, тканей и иных биологических материалов, которые наиболее пригодны для анализа и в которых с наибольшей вероятностью можно выявить и идентифицировать исследуемые наноматериалы.

3.1.3. Биологические образцы, полученные от животных, которым по условиям эксперимента были введены наночастицы (наноматериалы), могут содержать эти наночастицы (наноматериалы) 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 организации, осуществляющей отбор проб

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

3.2.2. Организации, осуществляющие 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.

Персонал, проводящий отбор проб для выявления и идентификации наноматериалов в лабораторных животных, должен иметь профессиональную подготовку в области работы с лабораторными животными и пройти инструктаж по вопросам техники безопасности и методам преодоления последствий возможных нештатных ситуаций.

3.3. Перечень объектов и материалов, подлежащих пробоотбору

3.3.1. Для выявления и идентификации биогенных наноматериалов в лабораторных животных проводят отбор следующих биологических материалов:

- соскобы со слизистых оболочек, отделяемое эрозивно-язвенных элементов, соскобы с конъюнктивы и т. д.;
- мазки, смывы (из носоглотки, зева и т. д.);
- мокрота, бронхо-альвеолярный лаваж;
- кровь, плазма, сыворотка крови;
- моча, различные биологические жидкости (лимфа, слюна, желчь, слезная жидкость, молоко);
- фекалии;
- биоптаты (кусочки тканей и органов).

Перечень биологических материалов, отбираемых с целью определения наночастиц и наноматериалов, может изменяться по указанию организации, проводящей анализ наноматериалов в образцах, в зависимости от предполагаемой локализации исследуемого наноматериала в организме и используемых методов анализа.

3.3.2. Общими требованиями к биологическому материалу являются максимальная концентрация исследуемого наноматериала в образце, а также отсутствие нежелательных примесей, которые могут вызвать искажение результатов проводимых анализов.

3.3.3. Методы, применяемые при отборе проб биологических материалов, их консервации, транспортировании и хранении, должны исключать или сводить к минимуму возможные изменения физико-химического состояния наночастиц и наноматериалов, присутствующих в образцах.

3.3.4. Для исследований методом ПЦР кровь должна быть нативной (не свернувшейся), в связи с чем ее собирают в пробирки с антикоагулянтом ЭДТА.

Важно: гепарин в качестве антикоагулянта использовать нельзя, т. к. он является ингибитором ПЦР!

3.4. Соблюдение правил надлежащей лабораторной практики

3.4.1. В процессе отбора проб для характеристики действия наноматериалов в 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:

- надлежащее качество процедуры пробоотбора;
- документальное сопровождение всех этапов пробоотбора;
- совместимость различных методов пробоотбора между собой и отсутствие неконтролируемых влияний процедур пробоотбора на количество и физико-химическое состояние определяемых наноматериалов;
- 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 свойств анализируемых наноматериалов;
- 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, которым были введены различные наноматериалы; 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 выявления наноматериалов в 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, уполномоченная на проведение пробоотбора для выявления и идентификации наноматериалов в лабораторных животных, должна обеспечить конфиденциальность полученных в ходе пробоотбора данных и результатов 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, уполномоченная на проведение пробоотбора для выявления и идентификации наноматериалов в лабораторных животных, 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 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, осуществляющие перевозку проб.

IV. Технология (процедура) пробоотбора

4.1. Составление плана (схемы) отбора проб

4.1.1. План (схема) отбора проб составляется перед началом исследований и должен включать следующие данные:

• наименование выявляемого наноматериала, оценка его потенциальной опасности согласно МР 1.2.2522—09, свойства наноматериала (согласно данным производителя (поставщика) продукции и (или) литературным данным);

• вид отбираемых проб (исследуемого материала);

• методику отбора проб;

- количество отбираемых проб;
- инструкции по разделению отобранной пробы на части (выделению контрольной пробы при необходимости);
- тип и характеристики тары для отбора проб;
- расшифровку маркировки тары для отбора проб;
- специальные меры предосторожности при работе с наноматериалами, соблюдение стерильности;
- условия хранения и транспортирования проб;
- инструкции по очистке и хранению оборудования для отбора проб, инактивации биоматериалов.

4.2. Протоколирование отбора проб

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

- название организации, производившей отбор проб;
- фамилии сотрудников, проводящих отбор проб;
- цель отбора пробы;
- номер пробы;
- наименование отбираемого биологического материала;
- размер образца, единица измерения (объём или масса);
- наименование введённого наноматериала;
- дату введения наноматериала;
- метод отбора пробы;
- метод консервации пробы;
- количество отобранных образцов (реплик пробы), в т. ч. лабораторных, контрольных;
- дату и время отбора проб;
- сведения о нумерации, опломбировании, опечатывании проб;
- наименование лаборатории-получателя пробы;
- перечень анализируемых компонентов в составе проб;
- отметки о дополнительных сопроводительных документах (при необходимости);
- способ отправки проб;
- отметку о месте хранения контрольной пробы (при необходимости);
- подписи сотрудников, осуществляющих отбор проб и их доставку в лабораторию, проводящую анализ наноматериалов.

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

4.2.3. При отборе однородных серийных проб возможно составление единого протокола (акта) 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 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 – $p \leq 0,05$.

В случае если тест проведен на N животных, для каждого из которых определено значение исследуемого фактора X_n (содержания наноматериала в образце), принимают гипотезу о нормальном распределении фактора X. Далее рассчитывают среднее по выборке $\overline{X} = \sum_{i=1}^{n} X_i$ и несмещенную выборочную дисперсию $S^2 = \frac{1}{N-1}\sum_{i=1}^{n}(X_i - \overline{X})^2$.

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_n, 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 в случае если $d > 0{,}1X$, численность обследуемой группы животных увеличивают.

4.3.2. Количество животных, используемых в эксперименте, должно быть минимальным, однако достаточным для получения статистически достоверных результатов. Численность экспериментальной группы животных определяется в соответствии с п. 4.5.1. Для снижения числа животных в группе следует добиваться минимальной дисперсии определяемого показателя, для чего использовать животных высокого качества, свободных от специфических патогенов (*SPF*) и (применительно к мелким лабораторным животным) принадлежащих к определённой генетической линии.

4.4. Методы гуманной эвтаназии животных

4.4.1. Эвтаназию лабораторных животных проводят в соответствии с приказом Министерства здравоохранения 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 использования лабораторных животных при проведении забоя животных и отбора проб.

4.4.2. Оптимальным и универсальным методом эвтаназии животных является 3-кратная передозировка наркоза. Допускается эвтаназия 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 для определения биогенных наноматериалов (рекомбинантные вирусы, рекомбинантные вирусные белки, псевдовирусные частицы)

4.5.1. При отборе проб следует использовать следующее основное и вспомогательное лабораторное 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 по ТУ 16-535—84;
- холодильник бытовой электрический по 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 (*V*3 фирмы «*Elmi Ltd*», Латвия или аналогичный);
- весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности с погрешностью взвешивания не более 0,001 г по ГОСТ 24104—2001;
- твердотельный термостат для пробирок объёмом 1,5 см^3 с диапазоном рабочих температур 25—100 °С (Термит, «ДНК-Технология», Россия или аналогичный);
- пластина для манипуляций с мелкими грызунами (мышами) (из пробки или пенопласта);
- хирургический столик для мелких животных (крысы, морские свинки);
- булавки или иглы для фиксации животных на препаровальном столике;
- пинцет медицинский ГОСТ 21241—89;
- ножницы медицинские по ГОСТ 21239—93;
- скальпель по ГОСТ 30393—95 (возможно использование скальпеля со съёмными лезвиями);
- резиновые груши для пипетирования биологического матариала;
- 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» по 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 %;
- цилиндры стеклянные мерные лабораторные разной вместимости, колбы конические разной вместимости по ГОСТ 1770—74Е;
- сосуды Дьюара по ГОСТ 12.2.003—91, ГОСТ 12.2.052—81, ГОСТ 12.1.004—91, ТУ 26-04-622—88.

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

4.5.2. При отборе проб следует применять следующие реактивы и расходуемые материалы:

- хлороформ по ГОСТ 20015—88;
- диэтиловый эфир (эфир для наркоза стабилизированный) по ТУ 2600-001-43852015—05;
- спирт этиловый ректификованный медицинский по ГОСТ Р 51652—2000;
- азот жидкий по ГОСТ 9293—74;
- изотонический раствор натрия хлорида (0,9 г/л хлористого натрия по ГОСТ 4233—77);
- дистиллированная вода по ОСТ 11-029.003—80;
- транспортная среда для биологических тканей (0,218 М сахароза по ГОСТ 5833—75, 0,0038 М калий фосфорно-кислый однозамещенный по ГОСТ 4198—75,

0,0072 М калий фосфорно-кислый двухзамещенный по ГОСТ 2493—75, 1 % БСА по ТУ 6-09-10-342—90);

• глицериновая смесь (2 л изотонического раствора, 1 л глицерина по ГОСТ 6259—75 и 20 % раствор фосфорно-кислого натрия двухзамещенного по 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);

• фосфатная буферная смесь: на 1 л дистиллированной воды берут 0,45 г калия фосфорно-кислого однозамещенного по ГОСТ 4198—75 и 5,34 г калия фосфорно-кислого двухзамещенного по ГОСТ 2493—75. Стерилизуют при давлении 1 атмосфера в течение 30 мин;

• транспортная среда ESP, содержащая: саркозил 1 % (фирма «*Amresco*», США или аналогичный); ЭДТА 0,05 М (фирма «*Sigma*», США или аналогичная); свободная от нуклеаз проназа Е 1 мг/см^3 (фирма «*Sigma*», США или аналогичная);

• пробирки для микропроб однократного применения типа «Эппендорф» вместимостью 0,5, 1,5 и 2,0 см^3 по 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;

• бакпечатки однократного применения по ТУ 64-2-279—79;

• пастеровские пипетки, воронки стеклянные по ГОСТ 25336—82;

• перчатки хирургические резиновые по ГОСТ 3—88;

• термоконтейнеры различной вместимости или медицинская сумка-холодильник;

• сейф-пакеты одноразовые для хранения и транспортирования проб.

4.5.3. Кровь собирают асептически с использованием одноразовых инструментов, у крупных животных (кроликов, собак, птиц и т. д.) путем венопункции, у мелких животных (мышей, крыс) – из кончика хвоста или из сердца, в случае вскрытия животных, в стерильную пробирку (1,5—2 см^3) с антикоагулянтом ЭДТА (***гепарин в качестве антикоагулянта использовать нельзя!***). Плазму получают центрифугированием цельной крови в течение 20 мин при 3 000 об./мин.

Для выявления и идентификации наноматериалов в крови лабораторных животных методом ИФА приготавливают пробы сывороток: кровь отстаивают 0,5—1 ч в термостате при температуре 37 °С для формирования фибринового сгустка (не превратившийся в фибрин фибриноген может стать источником ложнопозитивных результатов), затем центрифугируют 10 мин при 1 200 g. Образовавшуюся прозрачную, без признаков гемолиза, сыворотку отбирают с помощью пипетки в отдельные чистые пробирки (1,5—2,0 см^3).

Клетки крови (лейкоцитарную фракцию цельной крови, лейкоцитарную пленку) для выявления лейкотропных псевдовирусных наночастиц следует отбирать после центрифугирования цельной крови и удаления плазмы. Лейкоцитарную массу собирают с поверхности осадка клеток и переносят в стерильную пробирку объемом 1,5—2,0 см^3.

4.5.4. Другие жидкости организма (лимфа, спинномозговая жидкость, желчь) отбирают при помощи пункции стерильными иглами, либо пастеровскими пипетками в стерильные одноразовые пробирки объемом 1,5—2,0 см^3.

4.5.5. Соскобы осуществляют с помощью специальных стерильных одноразовых инструментов – зондов, цитощеток или тампонов, после чего рабочую часть зонда помещают в транспортную среду производителя набора для выделения нуклеиновых кислот. Согласно рекомендациям производителя рабочую часть зонда удаляют из пробирки либо обламывают и оставляют в транспортной среде, плотно закрыв крышку пробирки.

4.5.6. Смывы из носоглотки приготавливают путем введения с помощью одноразового шприца или зонда теплого стерильного изотонического раствора натрия хлорида в носовые ходы. Промывную жидкость собирают в стерильную пробирку.

4.5.7. Мазки берут сухими стерильными ватными тампонами на пластиковой основе вращательными движениями. После взятия материала тампон (рабочую часть зонда) помещают в стерильную одноразовую пробирку со специальной транспортной средой и аккуратно обламывают, пробирку плотно закрывают крышкой.

4.5.8. Пробу фекалий отбирают отдельным наконечником с фильтром или одноразовыми лопатками, переносят в специальный стерильный флакон или бакпечатку. У мелких животных пробы фекалий отбирают при вскрытии в аспептических условиях из толстого отдела кишечника. Из твердых фекалий готовят фекальную суспензию, смешивая 0,8 $см^3$ фосфатного буфера (или стерильного изотонического раствора натрия хлорида) с 0,1 г (0,1 $см^3$) фекалий и тщательно ресуспендируя на вортексе до образования гомогенной суспензии. Для длительного хранения к суспензии добавляют глицерин до конечной концентрации 10—15 %.

Для выделения ДНК или РНК используют осветленный экстракт фекалий, который приготавливают из фекалий водянистой консистенции, свежей суспензии фекалий или суспензии, подвергавшейся замораживанию с глицерином. Взвесь фекалий интенсивно гомогенизируют на вортексе, осветляют путем центрифугирования при 10 000 g в течение 5 мин. В стерильную пробирку отбирают супернатант.

4.5.9. Аутопсию лабораторных животных производят в специально оборудованном помещении, которое полностью соответствует санитарно-гигиеническим требованиям к помещениям данного назначения. Все инструменты должны пройти антисептическую обработку в соответствии с правилами надлежащей лабораторной практики. Стеклянную посуду, соприкасающуюся с пробами, предварительно тщательно моют и стерилизуют одним из следующих способов: насыщенным паром в автоклаве в течение 30 мин при 120 °С; горячим воздухом в стерилизаторе (сухожаровом шкафу) 30 мин при 100 °С. Допускается стерилизация инструментов погружением в этиловый спирт. Для обеззараживания рук и рабочих поверхностей необходимо использовать латексные перчатки и 70 % этиловый спирт-ректификат. Одноразовая пластиковая стерильная посуда в неповрежденной упаковке дополнительной стерилизации не требует.

Кусочки тканей или органов отбирают методом биопсии либо при вскрытии животных стерильными инструментами. Предпочтительно использование одноразовых инструментов; многоразовые хирургические инструменты освобождают от загрязнения следами нуклеиновых кислот путём обеззараживания автоклавированием (/132 ± 2/ °С, 0,2 МПа, 60 мин) или кипячением (100 °С, 30 мин). Необходимость отбора проб каждого из органов определяют по предположительной локализации исследуемого наноматериала.

Отобранные образцы тканей и органов помещают в стерильные пробирки или флаконы с транспортной средой согласно рекомендациям фирм-изготовителей наборов для определения нуклеиновых кислот. Возможно также использование охлажденного изотонического раствора хлорида натрия либо замораживание проб в жидком азоте.

Отбор проб необходимо производить начиная с контрольной группы животных, во избежание контаминации проб исследуемой ДНК (РНК) от опытной группы животных.

4.6. Методы препарирования биологического материала для определения наночастиц неорганического происхождения

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

- холодильник бытовой электрический по ГОСТ 26678—85;
- морозильная камера, обеспечивающая температуру –200 °С или ниже (фирма «*Vestfrost*», Дания или аналогичная);

• льдогенератор (SD18 фирма «*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* фирма «*Eppendorf*», ФРГ или аналогичная);

• встряхиватель вибрационный типа «Вортекс» со скоростью вращения до 3 000 об./мин (*V3* фирма «*Elmi Ltd*», Латвия или аналогичный);

• весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности с погрешностью взвешивания не более 0,001 г по ГОСТ 24104—2001;

• твердотельный термостат для пробирок объёмом 1,5 см^3 с диапазоном рабочих температур 25—100 °С (Термит, «ДНК-Технология», Россия или аналогичный);

• pH-метр по ГОСТ 27987—88 или аналогичный;

• пластина для манипуляций с мелкими грызунами (мышами) (из пробки или пенопласта);

• хирургический столик для мелких животных (крысы, морские свинки);

• пинцет медицинский ГОСТ 21241—89;

• ножницы медицинские по ГОСТ 21239—93;

• ножницы глазные по ГОСТ 21239—89;

• скальпель по ГОСТ 30393—95 (возможно использование скальпеля со съёмными лезвиями);

• резиновые груши для пипетирования биологического матариала;

• сосуды Дьюара по ГОСТ 12.2.003—91, ГОСТ 12.2.052—81, ГОСТ 12.1.004—91, ТУ 26-04-622—88;

• термоконтейнеры различной вместимости или медицинская сумка-холодильник по ГОСТ Р 50444—92, ГОСТ Р 51350—99;

• ультразвуковая ванна с выходной мощностью не менее 60 Вт и рабочей частотой не ниже 40 кГц.

4.6.2. При отборе проб следует применять следующие расходуемые материалы:

• булавки или иглы для фиксации животных на препаровальном столике;

• дозаторы с переменным объёмом дозирования фирмы «*Gilson*», США:

  о 0,2—2,0 мм^3 с шагом 0,01 мм^3, с точностью ± 1,2 %;

  о 2—20 мм^3 с шагом 0,01 мм^3, с точностью ± 0,8 %;

  о 1—10 см^3 с шагом 0,1 см^3, с точностью ± 0,5 %;

• или дозаторы «Ленпипет» по ТУ 9452-002-33189998—2007:

  о 0,5—10,0 мм^3 с шагом 0,01 мм^3, с точностью ± 0,8 %;

  о 20—200 мм^3 с шагом 0,1 мм^3, с точностью ± 0,6 %;

  о 100—1 000 мм^3 с шагом 1 мм^3, с точностью ± 3 %;

• пробирки для микропроб однократного применения типа «Эппендорф» вместимостью 0,5, 1,5 и 2,0 см^3 по ТУ 64-2-30—80;

• криопробирки вместимостью 2,0 см^3;

• штативы для пробирок;

• наконечники пластиковые объемом 1—200 мм^3 и 200—1 000 мм^3;

• цилиндры стеклянные мерные лабораторные разной вместимости, колбы конические разной вместимости по ГОСТ 1770—74Е; колбы плоскодонные конические на 250 см^3 с НШ 29, тип КнКШ 250-29/32 по ГОСТ 10394—74; колбы мерные вместимостью 100, 500, 1 000 см^3 тип 2-100-2, 2-500-2 по ГОСТ 1770—74; воронки лабораторные по ГОСТ 25336, иная посуда мерная лабораторная по ГОСТ 1770—74 и посуда лабораторная стеклянная по ГОСТ 25336—82;

• перчатки хирургические резиновые по ГОСТ 3—88;

• бритва фирмы «Ted Pella, Inc.» (США), кат. № 121-1 или аналогичная;

• чашки Петри по ГОСТ 25336—82;

• флаконы стеклянные завинчивающиеся из темного стекла (вайл) объемом 10 $см^3$;

• термоконтейнеры различной вместимости или медицинские сумки-холодильники;

• сейф-пакеты одноразовые для хранения и транспортирования проб.

4.6.3. При отборе проб следует применять следующие реактивы:

• хлороформ по ГОСТ 20015—88;

• диэтиловый эфир (эфир для наркоза стабилизированный) по ТУ 2600-001-43852015—05;

• спирт этиловый ректифицированный, 96 % по ГОСТ 51652—2000;

• азот жидкий по ГОСТ 9293—74;

• деионизованная вода по ГОСТ 6709—79;

• изотонический раствор натрия хлорида (0,9 г/л хлористого натрия по ГОСТ 4233—77);

• глутаровый альдегид по ТУ 6-02-1273—89;

• нейтральный формалин по ГОСТ 1625—75 или приготовленный в соответствии с ГОСТ 4517—87, п. 2.15;

• раствор фосфорно-солевого буфера 0,04 М KH_2PO_4, 0,16 М K_2HPO_4, pH 7,2 – 7,4, 1,76 % KCl. Для приготовления раствора на лабораторных весах готовят навески 6,2 г $KH_2PO_4 \times H_2O$ (х.ч. по ГОСТ 4198—75), 33,65 г $K_2HPO_4 \times 3H_2O$ (х.ч. по ГОСТ 2493—75) и 17,4 г KCl (х.ч., ГОСТ 4568—95) и вносят их в мерную колбу объемом 1 000 $см^3$, содержащую 500 $см^3$ дистиллированной воды. Соли растворяют при перемешивании, объем раствора доводят до 1 000 $см^3$;

• раствор для фиксации: 2,5 %-й раствор глутарового альдегида, 2 %-й раствор формалина на фосфатно-солевом буфере. Для приготовления 100 $см^3$ раствора в мерную колбу вносят 50 $см^3$ двухкратного раствора фосфатно-солевого буфера, 10 $см^3$ коммерческого препарата глутарового альдегида (25 % водный раствор) и 5 $см^3$ коммерческого препарата формалина (40 % водный раствор). На pH-метре доводят pH буфера до 6,9 добавлением 1М *HCl*, далее объем раствора доводят до 100 $см^3$.

4.6.4. Кровь собирают асептически с использованием одноразовых инструментов, у крупных животных (крупного рогатого скота, овец, свиней, кроликов, собак, птиц и т. д.) путем венопункции, у мелких животных (мышей, крыс) – из кончика хвоста или из сердца, в случае вскрытия животных, в стерильную пробирку (1,5—2 $см^3$), куда предварительно внесен раствор гепарина (10 ед./см) (для электронной микроскопии оптимально иметь не менее 30 $мм^3$ сыворотки крови). После забора крови пробирки закрывают крышками и центрифугируют на небольшой скорости (до 2 000 g) в течение 10 с – 1 мин, чтобы сбросить капельки крови, осевшие на стенки пробирок, не дав им высохнуть.

4.6.5. Процедуру отбора сыворотки следует начинать не позднее чем через 1,5 ч после отбора крови, чтобы избежать гемолиза. Для получения сыворотки кровь помещают в термостат (37 °С) на 30 мин, после чего центрифугируют в течение 10 мин на скорости 2 000 g. Отбирают сыворотку, не задевая тромба, в отдельную новую пробирку, которую маркируют соответствующим образом (с добавлением буквы «С» – сыворотка). Маркированные пробирки замораживают и хранят при температуре –20 °С.

4.6.6. Процедуру отбора плазмы следует начинать непосредственно после отбора крови, чтобы избежать ее свертывания. Для получения плазмы в отобранную кровь добавляют гепарин (10 ед./$см^3$). Пробирки с гепаринизированной кровью центрифугируют в течение 10 мин при скорости 2 000 g. Отбирают плазму, не задевая клеточный осадок, в отдельную пробирку, которую маркируют соответствующим образом (с добавлением буквы «П» – плазма). На пробирки с осадком клеток крови наносят марки-

ровку «КК» – клетки крови. Маркированные пробирки замораживают и хранят при температуре –20 °С.

4.6.7. Другие жидкости организма (лимфа, спинномозговая жидкость, желчь и др.) отбирают при помощи пункции одноразовыми шприцами в одноразовые пробирки объемом 1,5—2,0 $см^3$. Пробирки маркируют, замораживают и хранят при температуре –20 °С.

4.6.8. Соскобы осуществляют с помощью специальных одноразовых инструментов – зондов, цитощеток или тампонов, после чего рабочую часть зонда аккуратно обламывают и помещают в криопробирки с фосфатно-солевым буфером pH 7,2—7,4, плотно закрыв крышку. Каждая проба маркируется отдельно путем погружения в среду этикетки (надпись выполняется карандашом).

4.6.9. Смывы из носоглотки приготавливают путем введения с помощью одноразового шприца или зонда теплого стерильного изотонического раствора натрия хлорида в носовые ходы. Промывную жидкость собирают в отдельную пробирку. Пробирки маркируют, замораживают и хранят при температуре –20 °С.

4.6.10. Мазки берут сухими стерильными ватными тампонами на пластиковой основе вращательными движениями. После взятия материала тампон (рабочую часть зонда) помещают в криопробирки с фосфатно-солевым буфером pH 7,2—7,4, плотно закрыв крышку. Каждая проба маркируется отдельно путем погружения в среду этикетки (надпись выполняется карандашом).

4.6.11. Пробу фекалий отбирают отдельным наконечником или одноразовыми лопатками, переносят в специальный флакон. У мелких животных пробы фекалий отбирают при вскрытии в аспептических условиях из толстого отдела кишечника. Из твердых фекалий готовят фекальную суспензию, смешивая при помощи вибрационного встряхивателя 0,8 $см^3$ фосфатно-солевого буфера (или стерильного изотонического раствора натрия хлорида) с 0,1 г (0,1 $см^3$) фекалий до образования гомогенной взвеси. Для длительного хранения к суспензии добавляют глицерин до конечной концентрации 10—15 %.

4.6.12. Аутопсию лабораторных животных производят в специально оборудованном помещении, которое полностью соответствует санитарно-гигиеническим требованиям к помещениям данного назначения. Все инструменты должны пройти антисептическую обработку в соответствии с правилами надлежащей лабораторной практики. Стеклянную посуду, соприкасающуюся с пробами, предварительно тщательно моют и стерилизуют одним из следующих способов: насыщенным паром в автоклаве в течение 30 мин при 120 °С; горячим воздухом в стерилизаторе (сухожаровом шкафу) 30 мин при 100 °С. Допускается стерилизация инструментов погружением в этиловый спирт. Для обеззараживания рук и рабочих поверхностей необходимо использовать латексные перчатки и 70 % этиловый спирт-ректификат. Одноразовая пластиковая стерильная посуда в неповрежденной упаковке дополнительной стерилизации не требует. Инструменты (скальпель, ножницы и пинцет), применяемые при вскрытии, и посуду многоразового использования, предназначенную для фиксации и хранения проб, дополнительно обрабатывают в ультразвуковой ванне с целью исключить вероятность перекрестного загрязнения образцов наночастицами.

Кусочки тканей или органов отбирают методом биопсии либо при вскрытии животных с использованием хирургических инструментов. При вскрытии животных в первую очередь отбирают кровь, поступающую к сердцу через нижнюю полую вену, чтобы избежать излияния крови в полости тела и исключить загрязнение тканей наночастицами в случае высокой их концентрации в крови. Затем последовательно выделяют тонкий и толстый кишечник, желудок, почки, печень, селезенку, легкие, сердце, аорту, брыжеечные, подмышечные и другие лимфатические узлы, после вскрытия че-

репной коробки животного – головной мозг. Необходимость отбора проб каждого из органов определяют по предположительной локализации исследуемого наноматериала.

Выделенный орган с помощью пинцета немедленно помещают в чашку Петри с фосфатно-солевым буфером pH 7,2—7,4 и промывают от крови. Желудок и кишечник освобождают от содержимого и тщательно промывают водой, а затем фосфатно-солевым буфером pH 7,2—7,4. В зависимости от цели исследования органы переносят в соответствующие фиксирующие жидкости или замораживают в жидком азоте или с помощью сухого льда.

4.6.13. Для приготовления срезов тканей для электронной микроскопии орган разрезают острой бритвой на куски размером 1 × 1 × 1 мм (6 кусков от одного органа одного животного). Куски пинцетом переносят в пенициллиновые флаконы с фиксатором (2,5 % глутаровый альдегид на 0,1 М фосфатно-солевом буфере pH 7,2—7,4 с добавлением 2 % нейтрального формалина) из расчета 4 $см^3$ на один флакон. Из разных отделов желудка и кишечника вырезают кусочки площадью 1 $мм^2$ (объемом не более 1 $мм^3$), переносят в пенициллиновые флаконы с фиксатором. Органы желудочно-кишечного тракта и кожи требуют ориентации при фиксации. Для этого поперечные срезы кожи и определенных отделов желудочно-кишечного тракта прикладывают на небольшие кусочки бумаги и в таком виде помещают в фиксатор. Отношение объема фиксатора к фиксируемой ткани должно быть не менее 10 : 1. Пробы из одного органа от одного животного помещают в один флакон. Каждый флакон маркируют специальным химически стойким маркером или восковым карандашом либо приклеивают бумажную этикетку, запись на которой делают карандашом. На этикетке необходимо указывать номер животного и название органа, а также вид анализа, для которого подготовлена проба. Возможно длительное (до 2 месяцев) хранение образцов в фиксаторе при температуре 4 °С. Нельзя допускать замораживание образцов, т. к. образующиеся кристаллы льда разрушают ткани.

4.6.14. Для приготовления тканевых гомогенатов для электронной микроскопии из органов вырезаются фрагменты размером от 5 × 5 × 5 мм до 10 × 10 × 10 мм, фрагменты большего размера предпочтительнее, небольшие органы или органы мелких животных можно фиксировать целиком. Органы или их фрагменты помещают в криопробирки с фосфатно-солевым буфером pH 7,2—7,4, плотно закрыв крышку. Каждая проба маркируется отдельно путем погружения в среду этикетки (надпись выполняется карандашом).

4.6.15. Отобранные пробы соскобов, мазков, фекалий, кусочков органов и тканей замораживают погружением в жидкий азот, заключенный в морозоустойчивом теплоизолированном сосуде с широким горлом. Каждую пробу после замораживания быстро заворачивают в фольгу. Пробы от разных органов помещают раздельно и снабжают этикетками с названиями этих органов, пробы от одного животного помещают в общую упаковку и погружают в сосуд Дьюара или термос с жидким азотом для кратковременного хранения или транспортирования. Также можно использовать колотый сухой лед в морозоустойчивой термоизолирующей (например, пенопластовой) емкости.

Для длительного хранения препараты извлекают из жидкого азота и помещают в низкотемпературный холодильник с температурой не выше – 80 °С. В таких условиях пробы могут храниться в течение неограниченного времени.

4.7. Фиксация (консервация) биологических проб для определения наноматериалов

4.7.1. 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, фосфатно-солевой буфер.

4.7.2. Пробы тканей или органов помещаются в охлажденный изотонический раствор хлорида натрия 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).

4.7.3. Для фиксации (консервации) проб биологических тканей, органов и жидкостей, предназначенных для определения **биогенных наноматериалов** на основе нуклеиновых кислот, используют специальные транспортные среды, разработанные и рекомендованные производителями наборов реагентов для выделения ДНК (РНК). В случае необходимости длительного хранения и перевозки проб в отсутствии низкотемпературных холодильников следует использовать транспортную среду ESP.

4.7.4. В целях фиксации (консервации) пробы, предназначенные для определения **неорганических наноматериалов** методом электронной микроскопии в срезах органов и тканей животных, помещают в маркированные пенициллиновые флаконы с фиксатором (раствор 2,5 %-го глутарового альдегида в 0,1 М фосфатно-солевом буфере pH 7,2—7,4 с добавлением 2 % нейтрального формалина) из расчета 4 $см^3$ на один флакон. Отношение объема фиксатора к фиксируемой ткани должно составлять не менее 10 : 1. Возможно длительное (до 2 месяцев) хранение образцов в фиксаторе при температуре 4 °С.

Нельзя допускать замораживание образцов, т. к. образующиеся кристаллы льда разрушают ткани!

4.7.5. В целях фиксации (консервации) пробы, предназначенные для определения неорганических наноматериалов методом электронной микроскопии в соскобах, мазках, фекалиях, гомогенатах органов и тканей, помещают в маркированные криопробирки с фосфатно-солевым буфером pH 7,2—7,4. Пробы замораживают жидким азотом в морозоустойчивом теплоизолированном сосуде с широким горлом. Замороженные пробы каждую в отдельности быстро заворачивают в фольгу и погружают в сосуд Дьюара или термос с жидким азотом для долговременного хранения. Во избежание взрыва емкость с азотом не должна быть герметически закрыта. Можно также использовать колотый сухой лед в морозоустойчивой термоизолирующей (например, пенопластовой) емкости. В целях уменьшения теплообмена емкость с сухим льдом должна быть закрыта. Для длительного хранения препараты извлекают из жидкого азота и помещают в низкотемпературный холодильник с температурой не выше –80 °С. В таких условиях пробы могут храниться в течение длительного времени.

4.8. Количество отбираемых проб биологического материала

4.8.1. Объём (масса, количество) отбираемой пробы (проб) различных видов определяются в зависимости от выявляемых наночастиц (абиогенных и биогенных) и применяемых методов выявления (ПЭМ, АСМ, элементный анализ, хроматография, ПЦР, ИФА).

4.8.2. Количество отбираемых образцов должно быть достаточным для выделения контрольной и лабораторной проб, размерами, допускающими проведение всех предусмотренных планом исследования анализов.

4.8.3. Количество отобранного биологического материала не должно быть избыточным. Избыток отделяемого, слизь и гной отрицательно влияют на качество проводимых анализов.

Для выделения ДНК (РНК) для одного анализа методом ПЦР (ОТ-ПЦР) достаточно 200 $мм^3$ плазмы крови, 100 мкг образцов тканей или органов, фекалий.

Для одного анализа сывороток крови методом ИФА объем образца может составлять 5—1 000 $мм^3$, в зависимости от рекомендаций фирмы-изготовителя тест-систем.

Для одного анализа методами ПЭМ и АСМ достаточно 30 мм^3 плазмы крови, 200 мкг образцов тканей или органов, фекалий.

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

4.9.1. Для выявления и идентификации наноматериалов у лабораторных животных отбирают точечные пробы биологических жидкостей, тканей и органов, как было описано в п.п. 4.5 и 4.6. При исследовании органов, тканей и биологических жидкостей организма на содержание наноматериалов объединённую пробу не формируют. Каждый параметр характеризуется в пробах от индивидуальных животных, после чего полученный результат усредняется (статистически обрабатывается).

4.9.2. 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.

4.9.3. Контрольная проба выделяется при необходимости на месте в процессе отбора проб, ее масса должна быть не более массы лабораторной пробы. Как правило, контрольная проба выделяется от точечной пробы и составляет половину её массы (объёма).

4.9.4. Контрольная проба хранится в сейф-пакете или в опломбированном (опечатанном) виде в течение срока её годности при регламентированных температурных и влажностных режимах.

4.10. Меры предосторожности при введении наноматериалов в животных, эвтаназии, препарировании биоматериала, отборе и консервации проб

4.10.1. Перед проведением исследований содержания каждого отдельного наноматериала в лабораторных животных должна быть выполнена предварительная оценка уровня их потенциальной опасности для здоровья человека согласно МР 1.2.2522—09.

4.10.2. 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.

4.10.3. Работы с биологическими материалами и жидкостями, содержащими наночастицы, следует проводить в резиновых перчатках. Работы с отобранными биологическим пробами, предположительно содержащими наноматериалы, выполняются в ламинаре или в отдельных боксовых помещениях, снабжённых системой вентиляции. Отбор проб следует производить в одноразовую посуду. *Не допускается проведение работ в помещениях с неисправной системой вентиляции и воздуховодов!*

4.10.4. Проанализированные биологические материалы инактивируются автоклавированием в течение 1 ч при давлении в 1,5 атмосферы 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.

4.10.5. 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.

4.10.6. 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.

4.10.7. После вскрытия животных инструменты, пластины для манипуляций, хирургические столики, банки, бачки, садки из-под животных, подстилочный материал и т. п. 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.

4.10.8. Для дезинфекции применяют средства, содержащие в качестве действующих веществ активный кислород (перекисные соединения и др.), 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.

4.10.9. 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.).

4.10.10. 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 человек, 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.

4.10.11. 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.

4.10.12. 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 не опечатанных хранилищах биологические образцы, посуду с посевами микроорганизмов и вводимые животным наноматериалы.

Не допускается оставлять биологические материалы и препараты, содержащие наноматериалы и наночастицы, после окончания работы на открытых местах или в не опечатанных хранилищах!

4.10.13. 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.

4.10.14. Комнаты, рабочие поверхности, штативы, оборудование, применяемые при работе с лабораторными животными, следует обеззараживать ежедневно ультрафиолетовым излучением в течение 1 ч. Полы ежедневно подвергают влажной уборке с применением дезинфицирующих средств, регламентированных санитарными правилами. Перед началом работы рабочую поверхность столов дополнительно обрабатывают 70 % этиловым спиртом. Ежемесячно проводят профилактическую обработку рабочей поверхности столов и штативов 1 N соляной кислотой.

4.11. Возможные нештатные ситуации в ходе отбора проб биологических материалов и меры по их устранению

4.11.1. 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.

4.11.2. 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.

4.11.3. Забрызганная защитная одежда должна быть обильно смочена дезинфицирующим раствором (п. 4.10.8) и помещена в бикс (бак) для последующего автоклавирования. Сотрудники должны надеть чистую рабочую одежду.

4.11.4. 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.

4.11.5. 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.

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

4.11.7. 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. Требования к таре для транспортирования

5.1.1. Подлежащие транспортированию биологические образцы от животных, которым были введены наноматериалы, 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 и материала, должны обеспечивать герметичность, стерильность и целостность образцов, а также исключать при открытии возможность образования аэрозоля.

5.1.2. Для транспортирования образцов, предназначенных для определения биогенных наноматериалов, содержащих ДНК и РНК, используют стеклянную и пластиковую посуду с маркировкой «*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 электронной микроскопии в соответствующих задачам исследования фиксирующих растворах (формальдегид, параформ и другое) транспортируют в сумках-холодильниках при температуре не ниже 0 °С и не выше 20 °С. Замораживание проб не допускается. Время транспортирования проб не ограничивается.

Для транспортирования образцов фекальных масс возможно использование специальных транспортных систем (свабов) с транспортными средами (Кэри-Блер, Амие-

са, 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 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. 4.2.1 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, должны быть указаны 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 условиях 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, которым были введены наноматериалы, 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 содержащего наноматериалы, 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. 4.10.4).

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. Температурный режим, допустимая длительность транспортирования

5.4.1. Перевозку и хранение биологических образцов, предположительно содержащих наноматериалы, необходимо осуществлять в условиях «холодовой цепи» с обеспечением необходимого контроля установленного температурного режима.

Контейнер помещают в сумку-холодильник, термос или термоконтейнер с обеспечивающими нужную температуру хладагентами.

5.4.2. При использовании специальных транспортных систем необходимо руководствоваться требованиями производителя транспортных систем, разрешенных к применению на территории Российской Федерации. В зависимости от используемой транспортной среды, вида исследуемого материала и температурного режима сроки перевозки и хранения материала могут варьировать в широком диапазоне. Общим требованием является доставка проб в лабораторию максимально быстро, с соблюдением мер против протекания, высушивания и повреждения проб.

5.4.3. Транспортирование проб для исследований методом ПЦР (ОТ-ПЦР) осуществляется при следующих параметрах:

Образцы нативной крови:	– при температуре от 2 до 8 °С в течение 12 ч.
Образцы плазмы и сыворотки крови:	– при температуре от 2 до 8 °С – в течение 5 с;
	– при температуре минус 20 °С – в течение 2 недель.
Образцы мочи, биологических жидкостей:	– при температуре от 2 до 8 °С – в течение 1 суток;
	– при температуре –20 °С – в течение 1 недели.
Образцы смывов, мазков:	– при температуре от 2 до 8 °С – в течение 6 ч;
	– при температуре –20 °С – в течение 1 недели.
Образцы нативных фекалий:	– при комнатной температуре – в течение 6 ч;
	– при температуре от 2 до 8 °С – в течение 3 суток.
Образцы фекальной суспензии с глицерином, фекального экстракта:	– при температуре –20 °С – в течение 1 недели.
Образцы органов и тканей:	– при комнатной температуре – в течение 6 ч;

– при температуре от 2 до 8 °С – в течение 3 суток;
– при температуре –20 °С – в течение 1 недели.

Допускается только однократное замораживание материала!

5.4.7. Транспортирование проб для исследований методом ПЭМ и АСМ осуществляется при следующих параметрах:

Образцы плазмы и сыворотки крови: – при температуре –20 °С – в течение 2 недель.
Образцы мочи, биологических жидкостей: – при температуре от 2 до 8 °С – в течение 1 суток;
– при температуре –20 °С – в течение 1 недели.
Образцы смывов, мазков: – при температуре от 2 до 8 °С – в течение 6 ч;
– при температуре –20 °С – в течение 1 недели.
Образцы нативных фекалий: – при комнатной температуре – в течение 6 ч;
– при температуре от 2 до 8 °С – в течение 3 суток;
– в жидком азоте (–180 °С) – в течение 2 недель и более.
Образцы фекальной суспензии с глицерином, фекального экстракта: – при температуре –20 °С – в течение 1 недели;
– в жидком азоте (–180 °С) – в течение 2 недель.
Образцы органов и тканей: – при комнатной температуре – в течение 6 ч;
– при температуре от 2 до 8 °С – в течение 3 суток;
– при температуре –20 °С – в течение 1 недели;
– в жидком азоте (–180 °С) – в течение 2 недель.

5.5. Допустимые сроки хранения биологических образцов

5.5.1. Хранение биологических образцов для исследований методом ПЦР (ОТ-ПЦР) осуществлять при следующих условиях:

Образцы нативной крови: – при температуре от 2 до 8 °С – в течение 12 ч.
Замораживать цельную кровь нельзя!
Образцы плазмы и сыворотки крови: – при температуре от 2 до 8 °С – в течение 5 суток;
– при температуре –20 °С – в течение года;
– при температуре –70 °С и ниже – неограниченно.
Образцы мочи, биологических жидкостей: – при температуре от 2 до 8 °С – в течение 1 суток;
– при температуре –20 °С – в течение 1 недели;
– при температуре –70 °С и ниже – неограниченно.
Образцы смывов, мазков: – при температуре от 2 до 8 °С – в течение 6 ч;
– при температуре –20 °С – в течение 1 недели;
– при температуре –70 °С и ниже – неограниченно.
Образцы нативных фекалий: – при комнатной температуре – в течение 6 ч;
– при температуре от 2 до 8 °С – в течение 3 суток.
Образцы фекальной суспензии с глицерином, фекального экстракта: – при температуре –20 °С – в течение 1 недели;
– при температуре –70 °С и ниже – длительно.
Образцы органов и тканей: – при комнатной температуре – в течение 6 ч;
– при температуре от 2 до 8 °С – в течение 3 суток;
– при температуре –20 °С – в течение 1 недели;
– при температуре –70 °С и ниже – неограниченно.

5.5.2. Хранение биологических образцов для исследований методом ИФА осуществлять при следующих условиях:

Образцы цельной крови: – при температуре от 2 до 8 °С – в течение 1 суток.
Образцы сыворотки крови: – при температуре от 2 до 8 °С – в течение 4 суток;
– при температуре –20 °С – в течение 2 недель.

5.5.3. Хранение биологических образцов для исследований методами ПЭМ и АСМ осуществлять при следующих условиях:

Образцы плазмы и сыворотки крови:	– при температуре –20 °С – в течение года; – при температуре –70 °С и в жидком азоте (–180 °С) – длительно.
Образцы мочи, биологических жидкостей:	– при температуре от 2 до 8 °С – в течение 1 суток; – при температуре –20 °С – в течение 1 недели; – при температуре –70 °С и в жидком азоте (–180 °С) – длительно.
Образцы смывов, мазков:	– при температуре от 2 до 8 °С – в течение 6 ч; – при температуре –20 °С – в течение 1 недели; – при температуре –70 °С и в жидком азоте (–180 °С) – длительно.
Образцы нативных фекалий:	– при комнатной температуре – в течение 6 ч; – при температуре от 2 до 8 °С – в течение 3 суток.
Образцы фекальной суспензии с глицерином, фекального экстракта:	– при температуре –20 °С – в течение 1 недели; – при температуре –70 °С и в жидком азоте (–180 °С) – длительно.
Нативные образцы органов и тканей:	– при температуре от 2 до 8 °С – в течение 3 ч;
Образцы органов и тканей в фиксаторах:	– при комнатной температуре – в течение 6 ч; – при температуре от 2 до 8 °С – неограниченно.

5.5.4. *При хранении жидких биологических образцов допускается только* однократное замораживание материала, поэтому предназначенные для нескольких неодновременных исследований образцы рекомендуется разделять на аликвоты по 50—100 мм^3.

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

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

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

5.6.3. 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.

5.6.4. Для исследований методом ИФА непригодной считается сыворотка крови, содержащая примесь эритроцитов, имеющая признаки бактериального пророста, хилёза (мутная), гемолиза.

5.6.5. Для исследования методами ПЭМ и АСМ непригодными считаются биологические образцы, подвергнутые повторному замораживанию-оттаиванию.

5.6.6. 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 лабораторных животных

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

_____

(штамп организации, осуществляющей отбор проб)

адрес: _____

телефон:_____ факс:_____ электронная почта: _____

АКТ

отбора биологических проб для определения наноматериалов

№ _____ от «_____» _____ 20____г.

Мною (нами), _____

в присутствии _____

проведен отбор проб _____

_____

_____

Цель проведения отбора проб _____

_____

Наименование отбираемого биологического материала _____

_____

Размер образца, единица измерения (объем, масса) _____

Наименованное введенного наноматериала _____

Дата введения наноматериала _____

Проба отобрана методом _____

Способ консервации пробы _____

Количество отобранных образцов _____

из них контрольных _____

из них лабораторных _____

Пробы отобраны в _____ ч _____ мин _____

в количестве _____, пронумерованы и опломбированы (опечатаны)

_____

(указать порядок нумерации проб, номер пломбы, номер сейф пакета)

направляются в _____

_____

(указать наименование лаборатории)

для _____

_____

(указать перечень наночастиц (наноматериалов) по которым необходимо провести исследования)

_____

(отметка о порядке хранения или обращения продукции)

Отметки о сопроводительных документах, направляемых с пробами:

_____

(учреждение-получатель проб, номер и дата сопроводительного документа)

Дата отправки проб _____, время: _____ ч _____ мин.

Способ отправки (доставки) проб:

_____

Отметка о месте хранения контрольной пробы _____

_____

Подпись сотрудников, осуществлявших отбор проб:

_____ _____
(подпись) (Ф.,И.,О.)

_____ _____
(подпись) (Ф.И.О.)

Представитель организации, осуществлявшей доставку проб в лабораторию:

_____ _____
(подпись) (Ф.,И.,О.)

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.

Приложение 2

Термины и определения

Инкремент – некоторое количество материала, отобранное одновременно из большого общего объёма для формирования пробы.

Контрольная проба – часть средней пробы, хранящаяся в лаборатории, проводящей исследования, или у владельца продукции и предназначенная для повторного или арбитражного исследования при классифицировании лота, партии как несоответствующих или возникновении споров по результатам проведённых исследований.

Лабораторная проба – (конечная проба или репрезентативная часть конечной пробы) часть средней пробы, предназначенная для формирования тестового образца (образцов), направляемого на исследования (доставленного в лабораторию), определённая нормативными документами, с целью подтверждения соответствия контролируемого объекта установленным требованиям.

Лабораторные животные – экспериментальные или подопытные животные, специально выращиваемые и используемые в лабораториях для научных и практических целей. Лабораторные животные должны быть здоровы и обладать рядом специфических особенностей.

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

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.

Нормативные документы – государственные (национальные стандарты) (ГОСТ), методические указания (МУ), ветеринарные правила и нормы (ВетПиН) и санитарные правила и нормы (СанПиН), устанавливающие нормы, правила, методы, в т. ч. по отбору, упаковке, доставке и хранению проб.

Объединенная проба – совокупность идентичных, отобранных от однородной продукции точечных проб, предназначенная для составления средней пробы. Объединённую (составную) пробу получают равномерным перемешиванием первичных проб (элементов) из лота расфасованных продуктов или смешивая первичные пробы (инкременты) из лота не расфасованных сыпучих, жидких продуктов.

Органотропность – свойство физического, химического или биологического фактора избирательно воздействовать на определенный орган.

Отбор проб – процедура по выделению или составлению пробы, включающая не основанный на статистике случайный – эмпирический или точечный – отбор проб, используемая для принятия решения о соответствии лота продукции установленным требованиям.

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

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.

Средняя проба – часть объединенной пробы, предназначенная для проведения исследований: формирования лабораторной (проба А) и контрольной (проба Б) проб.

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

Схема отбора проб – процедура отбора проб, включающая в себя «переключение» (переход) от одного плана выборочного контроля (например, стандартного) к другому (например, более жёсткому).

Точечная проба – некоторое минимальное количество вещества (продукции), отобранного из одного места за один прием от данной партии для составления объединенной пробы. В некоторых случаях отбора проб от однородной фасованной продукции, штучной продукции точечная проба может выступать в качестве репрезентативной контрольной, лабораторной пробы.

Характеристика – свойство, помогающее, позволяющее идентифицировать или различить элементы в лоте. Характеристика может быть количественной (измеряемое значение, описывается переменными) и качественной (описывается свойствами).

Холодовая цепь – это постоянно функционирующая система организационных и практических мероприятий, обеспечивающая оптимальный температурный режим хранения и транспортирования проб на всех этапах пути их следования.

Эвтаназия – гуманное быстрое и безболезненное умерщвление животного, не сопровождающееся у него чувством тревоги и страха.

Приложение 3

Обозначения и сокращения

АСМ	Атомно-силовая микроскопия
БСА	Бычий сывороточный альбумин
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
ИФА	Иммуноферментный анализ
ОТ-ПЦР	Обратная транскрипция – полимеразная цепная реакция
ПЦР	Полимеразная цепная реакция
ПЭМ	Просвечивающая электронная микроскопия
РНК	Рибонуклеиновая кислота
РНКаза (ДНКаза)	Рибонуклеаза (дезоксирибонуклеаза)
СП	Санитарные правила
ЭДТА	Этилендиаминтетрауксусная кислота
RNase-, DNase-free	Свободный от РНКаз, ДНКаз

gost.e-ecolog.ru