2.3.2. ПИЩЕВЫЕ ПРОДУКТЫ И ПИЩЕВЫЕ ДОБАВКИ

Микробиологическая и молекулярно-генетическая оценка пищевой продукции, полученной с использованием генетически модифицированных микроорганизмов

Методические указания
МУ 2.3.2.1830—04

gost.e-ecolog.ru

ББК 51.23
М59

М59 **Микробиологическая** и молекулярно-генетическая оценка пищевой продукции, полученной с использованием генетически модифицированных микроорганизмов: Методические указания.—М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004.—56 с.

ISBN 5—7508—0476—3

1. Разработаны: ГУ Научно-исследовательским институтом эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи РАМН: А. Л. Гинцбург – руководитель, Н. А. Зигангирова, Б. С. Народицкий, Л. Н. Нестеренко, И. А. Шагинян, М. Ю. Чернуха, Ю. В. Ананьина; Министерством здравоохранения РФ, Департаментом госсанэпиднадзора МЗ РФ: Г. Г. Онищенко, А. И. Петухов; Институтом питания РАМН: В. А. Тутельян, С. А. Шевелева; Институтом вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова РАМН: Б. Ф. Семенов; Московским государственным университетом прикладной биотехнологии Министерства общего и профессионального образования Российской Федерации: И. А. Рогов, А. Ф. Валихов, В. И. Ганина.

2. Утверждены 9 января 2004 г., введены в действие Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации с 1 февраля 2004 г.

3. Введены впервые.

ББК 51.23

Редакторы Кучурова Л. С., Максакова Е. И.
Технический редактор Ломанова Е. В.
Подписано в печать 12.03.04

Формат 60x88/16 Печ. л. 3,5
Тираж 3000 экз. Заказ 24

Министерство здравоохранения Российской Федерации
101431, Москва, Рахмановский пер., д. 3

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован Издательским отделом Федерального центра госсанэпиднадзора Минздрава РФ
125167, Москва, проезд Аэропорта, 11
Отделение реализации, тел. 198-61-01

© Минздрав России, 2004
© Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004

Содержание

1. Общие положения и область применения 4
2. Нормативные ссылки 5
3. Порядок санитарно-эпидемиологической экспертизы и выдачи санитарно-эпидемиологического заключения пищевой продукции, полученной с использованием ГММ 6
4. Микробиологическая оценка ГММ, используемых для производства пищевой продукции 9
5. Молекулярно-генетическая оценка ГММ, используемых для производства пищевой продукции 33
Приложение. Термины и определения 53
Библиографические данные 55

УТВЕРЖДАЮ
Главный государственный санитарный врач Российской Федерации,
Первый заместитель Министра здравоохранения Российской Федерации

Г. Г. Онищенко
9 января 2004 г.
Дата введения: 1 февраля 2004 г.

2.3.2. ПИЩЕВЫЕ ПРОДУКТЫ И ПИЩЕВЫЕ ДОБАВКИ

Микробиологическая и молекулярно-генетическая оценка пищевой продукции, полученной с использованием генетически модифицированных микроорганизмов

Методические указания МУ 2.3.2.1830—04

1. Общие положения и область применения

1.1. Методические указания устанавливают требования к проведению микробиологической и молекулярно-генетической оценки пищевой продукции, полученной с использованием генетически модифицированных микроорганизмов (далее – *ГММ*).

1.2. Методические указания предназначены для учреждений санитарно-эпидемиологической службы Российской Федерации, осуществляющих государственный санитарно-эпидемиологический надзор, а также для других учреждений, аккредитованных на проведение работ в этой области в установленном порядке.

1.3. Требования, изложенные в настоящих методических указаниях в отношении пищевой продукции, полученной с использованием ГММ, применяются на этапах постановки на производство, санитарно-эпидемиологической экспертизы, выдачи заключения по санитарно-эпидемиологической экспертизе, закупки, ввоза в страну и реализации.

1.4. Методические указания разработаны с целью обеспечения единого, научно обоснованного подхода к оценке качества и безопасности пищевой продукции, полученной с использованием ГММ, на этапах разработки, экспертизы и выдачи санитарно-эпидемиологического заключения для этой продукции.

1.5. Производитель пищевой продукции, полученной с использованием ГММ, предназначенной для реализации на территории Российской Федерации, при маркировке должен вносить информацию на этикетку об использовании ГММ в соответствии с установленным порядком.

2. Нормативные ссылки

2.1. Федеральный закон «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» № 52-ФЗ от 30.03.99.

2.2. Федеральный закон «О внесении изменений и дополнений в Закон Российской Федерации «О защите прав потребителей» № 2-ФЗ и Кодекс РСФСР об административных правонарушениях» от 9 января 1996 г. (ред. от 30.12.01).

2.3. Федеральный закон «О качестве и безопасности пищевых продуктов» № 29-ФЗ от 02.01.00.

2.4. Федеральный закон «О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности» № 86-ФЗ от 05.06.96 (ред. от 12.07.00).

2.5. Федеральный закон «О внесении изменений и дополнений в Федеральный закон о государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности» № 96-ФЗ от 21.06.00.

2.6. «Основы законодательства Российской Федерации об охране здоровья граждан» от 22 июля 1993 г. № 5487-1 (ред. от 30.06.03).

2.7. Положение о государственном санитарно-эпидемиологическом нормировании, утвержденное постановлением Правительства Российской Федерации № 554 от 24.07.00.

2.8. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации «О порядке гигиенической оценки и регистрации пищевой продукции, полученной из генетически модифицированных источников» № 7 от 6.04.99.

2.9. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации «О проведении микробиологической и молекулярно-генетической экспертизы генетически модифицированных микроорганизмов, используемых в производстве пищевых продуктов» № 149 от 16.09.03.

2.10. Гигиенические требования к безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. СанПиН 2.3.2.1078—01.

2.11. Приказ Минздрава РФ «О санитарно-эпидемиологической экспертизе продукции» № 325 от 15.08.01 (ред. от 18.03.02) (зарегистрированный в МЮ РФ 19.10.01 № 2978).

3. Порядок санитарно-эпидемиологической экспертизы и выдачи санитарно-эпидемиологического заключения пищевой продукции, полученной с использованием ГММ

3.1. Вся пищевая продукция, полученная с использованием жизнеспособных микроорганизмов, проходит санитарно-эпидемиологическую экспертизу в установленном порядке. Заявитель должен декларировать наличие генных модификаций у штаммов, используемых для производства продуктов питания.

3.2. Проведение санитарно-эпидемиологической экспертизы и выдачи заключения по санитарно-эпидемиологической экспертизе пищевой продукции, полученной с использованием ГММ, осуществляется в соответствии с порядком, установленным:

- Постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации «О порядке гигиенической оценки и регистрации пищевой продукции, полученной из генетически модифицированных источников» № 7 от 06.04.99;
- Постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации «О проведении микробиологической и молекулярно-генетической экспертизы генетически модифицированных микроорганизмов, используемых в производстве пищевых продуктов» № 149 от 16.09.03;
- Приказом Минздрава РФ «О санитарно-эпидемиологической экспертизе продукции» № 325 от 15.08.01 (ред. от 18.03.02) (зарегистрированным в МЮ РФ 19.10.01 № 2978).

3.3. Юридические лица и индивидуальные предприниматели представляют в центр санитарно-эпидемиологического нормирования, гигиенической сертификации и экспертизы Министерства здравоохранения Российской Федерации комплект документов и материалов, включающий:

- заявку (письмо) на проведение гигиенической оценки и санитарно-эпидемиологической экспертизы пищевой продукции, полученной с использованием ГММ;
- материалы, отражающие медико-генетическую оценку пищевой продукции, полученной с использованием ГММ;
- материалы, отражающие технологические свойства пищевой продукции, полученной с использованием ГММ;
- материалы, отражающие медико-биологическую оценку пищевой продукции, полученной с использованием ГММ;

• материалы, отражающие молекулярно-биологические и микробиологические характеристики ГММ:

1) документацию, подтверждающую таксономическую принадлежность штамма, установленную по фенотипическим и генотипическим свойствам (паспорт штамма);

2) название штамма, соответствующее кодам Международной номенклатуры;

3) свидетельство о депонировании штамма;

4) документацию, содержащую сведения о фенотипических и генотипических характеристиках штамма, включая информацию о наличии плазмид;

5) документацию, подтверждающую происхождение и подлинность микроорганизма-реципиента, включая документацию о всех известных генетических модификациях его, индуцированных как генноинженерными, так и традиционными методами;

6) источник и нуклеотидную последовательность целевого гена и его регуляторных элементов;

7) цель генной модификации;

8) происхождение и таксономическое положение штамма-донора, установленные методами молекулярной геносистематики;

9) характеристику средств доставки целевого гена в клетки реципиента (физическую карту вектора, наличие полилинкеров и селективных маркеров);

10) стабильность интеграции чужеродной ДНК в хромосому или плазмиду ГММ;

11) использование транспозонов при конструировании штаммов ГММ;

12) фенотипические, биологические, патогенные свойства ГММ, взаимодействие с резидентной флорой кишечника человека;

13) стабильность генотипических и фенотипических характеристик ГММ;

14) способность к передаче генетического материала от ГММ в резидентную флору кишечника человека и в клетки макроорганизма.

Кроме вышеперечисленного, заявитель должен предоставить сведения об официальном разрешении на применение в пищевой промышленности и/или в свободной продаже населению, и о разрешении на экспорт из страны продукта с данным ГММ (оригиналы или заверенные копии документов установленного образца).

3.4. Объем и программа проведения работ по оценке качества и безопасности пищевой продукции, полученной с использованием ГММ, определяется экспертами ГУ НИИ питания РАМН и Центра по экспер-

тизе ГУ НИИЭМ им. Гамалеи РАМН по результатам экспертизы представленных материалов, а также в зависимости от ее принадлежности к пищевым продуктам на основе:

• новых штаммов, не имеющих разрешения на применение в производстве пищевых продуктов;

• штаммов, проходивших ранее экспертизу в установленном порядке, и допущенных в качестве заквасочных, стартовых, пробиотических, дрожжевых культур и штаммов-продуцентов пищевых веществ и пищевых добавок и используемых в пищевой промышленности.

Кроме того, при этом учитывается группа продукции по признаку наличия ГММ в жизнеспособном состоянии на момент потребления:

1) пищевые продукты, содержащие ГММ в живом состоянии – кисломолочные, пробиотические продукты, напитки брожения и пиво непастеризованные, *закваски и стартовые культуры*, готовые мясные продукты, изготовленные с использованием стартовых культур;

2) пищевые продукты, изготовленные при помощи ГММ, и в которых в процессе технологии они были инактивированы (напитки брожения и пиво пастеризованные, термизированные кисломолочные продукты и др.);

3) пищевые продукты, изготовленные при помощи ГММ, и которые в дальнейшем освобождены от них в процессе производства (ферментные препараты, белки).

Для концентрации внимания экспертизы на продукции, представляющей наибольший риск, последняя группа подразделяется на «негативный» и «позитивный» листы, при этом в негативный лист включаются полученные при использовании ГММ продукты, не содержащие белка и ДНК (пищевые кислоты, витамины, жирные кислоты) и *ферменты для спиртовой промышленности.*

Работа по экспертизе продукции, включенной в негативный лист, должна предусматривать первоочередный анализ документальных материалов, и в случае необходимости – анализ при помощи лабораторных методов.

3.5. Для проведения работ по оценке качества и безопасности пищевой продукции, полученной с использованием ГММ, фирма-изготовитель поставляет образцы продукции и используемые культуры штаммов ГММ, в количестве необходимом для проведения полного объема исследований.

3.6. На основании экспертизы представленных документов и материалов, и результатов проведенных молекулярно-генетических, микробиологических и технологических исследований продукции центр сани-

тарно-эпидемиологического нормирования, гигиенический сертификации и экспертизы Минздрава России оформляет бланк санитарно-эпидемиологического заключения (или мотивированное заключение об отказе) и передает его на подпись в Департамент госсанэпиднадзора Минздрава России. Санитарно-эпидемиологическое заключение подписывается Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации, а в его отсутствие – начальником Департамента госсанэпиднадзора, заместителем Главного государственного санитарного врача Российской Федерации.

4. Микробиологическая оценка ГММ, используемых для производства пищевой продукции

Необходимость проведения тех или иных исследований по данному разделу и для каждого конкретного вида пищевой продукции, полученной с использованием ГММ, определяется экспертом центра по экспертизе ГУ НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи РАМН.

4.1. Сравнительный анализ фенотипических свойств ГММ, штамма-реципиента или референтного штамма

4.1.1. Сущность метода

Сравнительный анализ фенотипических свойств основан на идентификации основных фенотипических свойств исследуемого ГММ, штамма-реципиента или референтного штамма того же вида для определения стабильности фенотипических признаков.

Оптимальными методами исследования фенотипических свойств являются методы идентификации микроорганизмов с помощью диагностических панелей, выпускаемых отечественными и зарубежными производителями и разрешенными к использованию в установленном порядке. Данные системы одноразового пользования предназначены для определения биохимической активности и последующей идентификации в течение 18—24 часов. Дополнительными методами исследования фенотипических свойств являются чувствительность к антибиотикам, к бактериофагам (для некоторых видов ГММ).

4.1.2. Аппаратура, материалы, лабораторная посуда, реактивы и питательные среды

4.1.2.1. Аппаратура и инструментарий

	НД (ГОСТ, ТУ)
Анализатор потенциометрический, погрешность измерений pH ± 0,01	ГОСТ 19881—74

Шкаф сушильный стерилизационный ШСС-80П или других марок, позволяющий поддерживать температуру (160 ± 5) °С	ТУ 64-1-28-70—76
Термостат, позволяющий поддерживать рабочую температуру 28—37 °С с отклонением от заданной ± 1 °С	ТУ 64-1-1382—72
Баня водяная с подогревом	ГОСТ 12026—76
Весы лабораторные общего назначения, 2 и 4 класса точности, с наибольшим пределом взвешивания 200 г	ГОСТ 24104—88
Микроскоп биологический МБИ-2, МБИ-3, МБР-3	ГОСТ 8284—78
Стерилизаторы паровые медицинские или аналогичные	ГОСТ 19569—89Е
Дистиллятор, обеспечивающий качество дистиллированной воды	ГОСТ 6709—72
Облучатель бактерицидный настенный ОБН-150 или других видов	ТУ 16-535—84
Холодильник бытовой электрический	
Пинцет медицинский	ГОСТ 21241—89
Ножницы медицинские	ГОСТ 21239—89
Скальпель хирургический, 15 см	ГОСТ 21240—89
Штативы для пробирок	
Часы механические сигнальные	ГОСТ 3145—84
Микроволновая печь	

4.1.2.2. Лабораторная посуда и материалы

Бумага фильтровальная лабораторная	ГОСТ 12026—76
Бутыли стеклянные для химических реактивов	
Кастрюли эмалированные	ГОСТ 24778—81
Марля медицинская	ГОСТ 9412—77
Колбы плоскодонные конические или круглые разной вместимости	ГОСТ 1770—74
Воронки стеклянные	ГОСТ 25336—82
Вата медицинская гигроскопическая	ГОСТ 5556—81
Полистироловые планшеты U-образные	
Пробирки типов П1, П2	ГОСТ 25336—82
Стекла предметные для микропрепаратов	ГОСТ 6672—75
Ступка фарфоровая с пестиком	ГОСТ 9147—80

Термометр ртутный с диапазоном измерения от 0 до 100 °С (цена деления шкалы 1 °С)	ГОСТ 13646—68
Чашки биологические (Петри)	ГОСТ 23932—90
Книга-каталог кодов для идентификации	
Бланки для регистрации результатов	
Микробиологические петли	
Фломастеры-маркеры	

4.1.2.3. Реактивы и питательные среды

	НД (ФС, ТУ)
Агар микробиологический	ГОСТ 17206—84
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709—72
D-глюкоза, ч	ГОСТ 6038—79
D-лактоза, 1- водная	ТУ 6-09-22-98—79
Натрий фосфорно-кислый однозамещенный, ч	ГОСТ 4198—75
Натрий фосфорно-кислый двухзамещенный, хч	ГОСТ 2493—75
Кислота соляная, хч	ГОСТ 3118—77
Натрий хлористый, хч	ГОСТ 4328—77
Масло иммерсионное для микроскопии	ГОСТ 31739—78
Набор реактивов для окраски по Граму	
Спирт этиловый ректификованный технический	ГОСТ 18300—87
Спирт этиловый ректификованный	ГОСТ 5962—67
Экстракт дрожжевой*	
Триптон*	
Антибиотики разных групп*	
Диски с антибиотиками*	

Питательные среды:

Для определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов	ТУ 9229-083-00419785—97
Питательный бульон	ТУ 10-02-02-789-176—94
Сухая питательная среда типа АГВ для определения чувствительности к антибиотикам	ТУ 9229-083-00419785—97
Питательная среда Мюллер-Хинтона разных фирм для определения чувствительности к антибиотикам	

* Реактивы производства разных фирм, прошедшие государственную регистрацию и разрешенные для использования в установленном порядке.

Сухая питательная среда для определения чувствительности к антибиотикам диффузионным методом	ГОСТ Р 51600—00
Питательные среды для определения энтеробактерий	ТУ 9229-072-00419785—97 ГОСТ 29184—91
Среды для определения дрожжей и микроскопических грибов (агар Сабуро, сывороточный и др.)	ТУ 9229-083-00419785—97 ГОСТ 10444.12—88
Среды для определения S. aureus (типа Байд-Паркера, солевой агар)	ГОСТ 10444.1, п. 5.1, п. 5.4
Среды для выращивания бифидобактерий, молочнокислых и пропионово-кислых бактерий (ГМС, М17, MRS)	ТУ 10-02-02-789-192—95
Планшеты для идентификации культур, выпускаемых отечественными и зарубежными производителями и разрешенными к использованию в установленном порядке	
Реактивы для ряда тестов в зависимости от идентифицируемого вида ГММ	
Дезинфицирующий раствор	
Микробиологические петли, скальпель	
Стандарт мутности по McFarland	

Допускается использование других коммерческих питательных сред и диагностических тест-систем аналогичного назначения для проведения исследований фенотипических свойств в соответствии с данным документом. При их применении необходимо руководствоваться рекомендациями изготовителя.

Питательные среды и биологические препараты импортного производства должны иметь сертификат качества ИСО 9000 или EN 29 000.

Питательные среды и препараты отечественного производства должны соответствовать нормативной документации, утвержденной в установленном порядке.

4.1.3. Методика проведения исследования

4.1.3.1. Выделение ГММ, штамма-реципиента или контрольного (референтного) штамма

Чистую культуру ГММ, штамма-реципиента или контрольного (референтного) штамма выделяют, пользуясь общепринятыми в микробиологии методами на рекомендованной для данного вида ГММ и штамма-реципиента питательной среде. Например, выделение чистой

культуры ГММ вида термофильных стрептококков должно осуществляться со среды типа М17 по ГОСТ 51331—99, а лактобактерий – со среды MRS по ГОСТ 51339—99.

4.1.3.2. Постановка реакции биохимической идентификации ГММ, штамма-реципиента или контрольного (референтного) штамма

Из чистой 18—24 часовой культуры готовят суспензию в стерильной дистиллированной воде. Суспензию тщательно гомогенизируют. Суспензию доводят до определенной мутности по шкале McFarland в зависимости от исследуемого вида ГММ и штамма-реципиента. Неправильно приготовленная суспензия (слишком густая или очень жидкая) может привести к получению ложных результатов.

Параллельно суспензию ГММ, штамма-реципиента или контрольного штамма высевают на питательные среды для проверки чистоты культуры, ее ростовых свойств и/или постановки дополнительных тестов.

Планшет для идентификации извлекают из полиэтиленовой упаковки и на прилагаемом к планшету бланке регистрируют номер ГММ, штамма-реципиента и контрольного штамма.

Суспензию бактерий тщательно встряхивают и в каждую лунку инокулируют определенный объем суспензии (0,1—0,2 $см^3$) в зависимости от фирмы-изготовителя и вида исследуемого ГММ и штамма-реципиента.

После инокуляции в ряд лунок может добавляться стерильное вазелиновое масло полностью закрывающее внесенную суспензию клеток для создания анаэробных условий.

После инокуляции планшет накрывают крышкой и инкубируют 5—24 часа при оптимальной температуре для исследуемого вида ГММ (например, 25—28 °С дрожжи, 42 °С – лактобациллы).

По окончании инкубации проверяют рост и чистоту культуры методом посевов на селективные жидкие или плотные питательные среды.

В некоторые лунки (например, ферментация индола) могут быть добавлены реактивы. Учет результатов на бета-галактозидазу проводят дважды: через 3—5 часов и через 18—24 часов. Результаты учитывают визуально с помощью таблицы «Интерпретация реакций» и заносят в бланки.

Идентификацию проводят с помощью таблиц и книг-каталогов кодов соответствующих фирм.

Стабильность фенотипических свойств ГММ и штамма-реципиента проверяют методом пассирования ГММ и штамма-реципиента на жидких и плотных питательных средах и дальнейшим через 3—5 пассажей трехкратным тестированием биохимических свойств ГММ и

штамма-реципиента. Трехкратное совпадение всех исследованных биохимических реакций, выявленное при неоднократном пассировании культур (не менее 10 пассажей) будет свидетельствовать о стабильности фенотипических признаков ГММ и штамма-реципиента. Вариабельность результатов по 1—2 реакциям будет являться свидетельством необходимости постановки дополнительных тестов на стабильность фено- и генотипических признаков у ГММ и штамма-реципиента. Вариабельность результатов по большему числу реакций будет служить свидетельством нестабильности фенотипических признаков у ГММ.

4.1.3.3. Определение чувствительности к антимикробным препаратам ГММ, штамма-реципиента и контрольного штамма

Чувствительность к антимикробным препаратам может быть в ряде случаев хорошим маркером фенотипических свойств ГММ и штамма-реципиента. В определенных случаях, а именно, тестирования пробиотиков, определение чувствительности к антимикробным препаратам является обязательным тестом в микробиологической и молекулярно-генетической оценке ГММ.

Основой для выбора антибактериальных препаратов, подлежащих включению в исследование, являются данные о природной устойчивости или чувствительности отдельных видов ГММ или их групп, о распространении среди них приобретенной резистентности, а также о клинической эффективности антибиотиков.

Современные стандартизованные методы оценки антибиотикорезистентности подразделяются на методы серийных разведений и диффузионные. В зависимости от вида ГММ и штамма-реципиента, предназначения ГММ тестирование будет выполняться как методом серийных разведений, так и диффузионным методом.

4.1.3.3.1. Подготовка к анализу

А. Метод серийных разведений

Постановка метода серийных разведений для оценки антибиотикорезистентности включает следующие этапы:

а) приготовление растворов антибиотиков;

б) приготовление питательных сред с растворами антибиотиков;

в) приготовление суспензии исследуемого ГММ, штамма-реципиента и контрольного штамма, стандартизация суспензии и инокуляция;

г) инкубация;

д) интерпретация результатов исследования.

Общими и очень важными этапами в методе серийных разведений являются: приготовление растворов антибиотиков, питательных сред, смешивание растворов антибиотиков и питательных сред.

4.1.3.3.2. Приготовление растворов антибиотиков

Используют основные растворы антибиотиков (пригодные для хранения) и рабочие, используемые «ex tempore» для приготовления питательных сред.

Основные растворы антибиотиков готовят в концентрации 1 000 мкг/мл и выше. Навески антибиотиков для приготовления основных растворов готовят с учетом их активности. Расчет навески антибиотика для приготовления основного раствора проводят по формуле:

$$Вес\ (мг) = \frac{Объем\ растворителя\ (мл) \times Необходимая\ концентрация\ (мкг/мл)}{Активность\ субстанции\ (содержание\ антибиотика\ в\ мкг/мл)}$$

Из основных растворов готовят рабочие двукратные концентрации антибиотиков. Для приготовления рабочих растворов используется стерильная дистиллированная вода. Расчет навески антибиотика для приготовления основного раствора в случае, если активность антибиотика измеряется в ЕД, производится аналогично.

4.1.3.3.3. Приготовление сред, содержащих антибиотики для серийных разведений

Различают два основных варианта метода серийных разведений в бульоне: макрометод (в пробирках) и микрометод (в планшетах). Рабочие растворы антибиотиков для обоих методов готовят по одинаковой схеме. Отличием является то, что серийные разведения антибиотика делают не в дистиллированной воде, а в жидкой питательной среде. Жидкая питательная среда, прошедшая контроль качества, готовится в соответствии с инструкцией изготовителя.

При постановке методов серийных разведений проводят контроль роста культуры на среде без антибиотика, а качество среды и антибиотиков контролируют с использованием референтных штаммов данного вида. Контролируется также чистота суспензии ГММ, использованного для инокуляции, путем высева на неселективные среды.

4.1.3.3.4. Учет результатов

Учет результатов при постановке макро- и микрометодов проводят визуально по появлению видимой мутности или спектрофотометрически. За МПК принимают концентрацию, обеспечивающую полное подавление видимого роста.

Б. Дискодиффузионный метод

Постановка дискодиффузионного метода оценки антибиотикорезистентности включает следующие этапы:

- приготовление питательных сред;
- приготовление суспензии микроорганизма и инокуляция;
- наложение дисков;
- инкубация;
- учет результатов.

Для получения правильных результатов необходимо жестко соблюдать правила хранения и использования коммерческих дисков.

4.1.3.3.5. Приготовление питательных сред

Приготовление чашек Петри с плотной питательной средой связано с некоторыми особенностями. Плотную питательную среду готовят в соответствии с инструкцией изготовителя. Перед заполнением чашки Петри расплавленной питательной средой ее устанавливают на строго горизонтальную поверхность, выверенную по уровню. Толщина агарового слоя должна быть 4,0 мм, что достигается при внесении в чашку Петри диаметром 100 мм 25—30 мл агаровой среды. Соблюдение указанных требований связано с тем, что размер и форма зоны ингибиции роста зависят от глубины и равномерности агарового слоя.

После заполнения чашки оставляют при комнатной температуре для застывания. Перед инокуляцией суспензии чашки с плотной питательной средой контролируют на отсутствие конденсата жидкости на внутренней поверхности крышек.

4.1.3.3.6. Приготовление суспензии и инокуляция

Для приготовления инокулята используют 18—20 часовую агаровую или 5—6 часовую бульонную культуру исследуемого ГММ. Суспензию доводят до мутности стандарта McFarland 0,5 (конечная концентрация около $1—2 \times 10^7$ КОЕ/см^3).

Приготовленный инокулят в количестве 1—2 мл вносят на поверхность чашки Петри, равномерно по поверхности агара распределяют покачиванием. Избыток суспензии удаляют пипеткой. Приоткрытые чашки подсушивают при комнатной температуре в течение 10—15 минут.

4.1.3.3.7. Наложение дисков

Через 15—20 минут после инокуляции на поверхность питательной среды вносят диски с антибиотиками. Диски наносят с помощью автоматического распределителя дисков или стерильным пинцетом. На одну чашку диаметром 100 мм следует помещать не более 6 дисков с расстоянием между краем чашки и диска, а также между дисками 15—20

мм. Диски должны равномерно контактировать с поверхностью агара, для чего их следует аккуратно прижать пинцетом.

4.1.3.3.8. Инкубация и учет результатов

Чашки после наложения дисков помещают в термостат и инкубируют, перевернув их вверх дном, 18—20 часов при оптимальной температуре для исследуемого ГММ.

После окончания инкубации проводят учет результатов, измеряя диаметр зоны задержки роста с точностью до 1 мм. Для этого пользуются штангенциркулем или кронциркулем, раздвигая их концы до видимой зоны задержки роста и затем, измеряя зону задержки в мм с помощью линейки.

4.2. Определение патогенных свойств ГММ, штамма-реципиента и референтного (контрольного) штамма

При выявлении четко выраженной гемолитической и адгезивной активности ГММ и штамма-реципиента обязательными тестами на патогенные свойства ГММ и штамма-реципиента являются определение вирулентных свойств ГММ и штамма-реципиента с использованием тканевых культур (HeLa, Hep-2, CHO), определением LD_{50} на модели беспородных мышей, интраназальной легочной модели, инвазивных свойств на тканевых культурах и в кератоконъюктивальном тесте по Sereny. В зависимости от принадлежности ГММ и штамма-реципиента к определенному виду микроорганизмов выбираются наиболее адекватные методы определения вирулентных и инвазивных свойств ГММ. Ниже приведены методы, которые могут быть использованы в микробиологической и молекулярно-генетической оценке ГММ при приведенных выше условиях.

4.2.1. Определение гемолитической активности ГММ и штамма-реципиента

Определенные виды микроорганизмов продуцируют гемолизины, считающиеся факторами патогенности у бактерий, в связи с чем продукция гемолизина во многих случаях является маркером вирулентности. Определение гемолитической активности проводится в 2 этапа. На 1-м этапе на 5 %-ный кровяной агар высевают исследуемый ГММ и штамм-реципиент. При продукции гемолизина через 18—24 часа при культивировании чашек Петри при оптимальной температуре развития гемолиза исследуемым ГММ вокруг колоний образуется видимая зона гемолиза и тем большая, чем больше гемолизина продуцирует ГММ и штамм-реципиент. При выявлении продукции гемолизина ГММ и

штаммом-реципиентом проводят 2-й этап исследования, определяя титр гемолитической активности супернатантов ГММ и штамма-реципиента.

4.2.2. Аппаратура, материалы, лабораторная посуда, реактивы и питательные среды, используемые для определения патогенных свойств ГММ, штамма-реципиента и контрольного штамма вида, к которому относится ГММ

4.2.2.1. Аппаратура и инструментарий

	НД (ГОСТ, ТУ)
Анализатор потенциометрический, погрешность измерений РН ± 0,01	ГОСТ 19881—74
Шкаф сушильный стерилизационный ШСС-80П или других марок, позволяющий поддерживать температуру (160 ± 5) °С	ТУ 64-1-28-70—76
Термостат, позволяющий поддерживать рабочую температуру 28—37 °С с отклонением от заданной ± 1 °С	ТУ 64-1-1382—72
Баня водяная с подогревом	ГОСТ 12026—76
Весы лабораторные общего назначения, 2 и 4 класса точности, с наибольшим пределом взвешивания 200 г	ГОСТ 24104—88
Стерилизаторы паровые медицинские или аналогичные	ГОСТ 19569—89Е
Дистиллятор, обеспечивающий качество дистиллированной воды	ГОСТ 6709—72
Холодильник бытовой электрический	
Микроцентрифуга типа «Эппендорф»	
Пинцет медицинский	ГОСТ 21241—89
Ножницы медицинские	ГОСТ 21239—89
Скальпель хирургический, 15 см	ГОСТ 21240—89
Штативы для пробирок	

4.2.2.2. Лабораторная посуда и материалы

Бумага фильтровальная лабораторная	ГОСТ 12026—76
Бутыли стеклянные для химических реактивов	
Марля медицинская	ГОСТ 9412—77
Колбы плоскодонные конические или круглые разной вместимости	ГОСТ 1770—74
Воронки стеклянные	ГОСТ 25336—82
Вата медицинская гигроскопическая	ГОСТ 5556—81
Полистироловые планшеты U-образные	

Пробирки типов П1, П2	ГОСТ 25336—82
Ступка фарфоровая с пестиком	ГОСТ 9147—80
Чашки биологические (Петри)	ГОСТ 23932—90
Микробиологические петли	
Фломастеры-маркеры	

4.2.2.3. Реактивы и питательные среды

	НД (ФС, ТУ)
Агар микробиологический	ГОСТ 17206—84
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709—72
D-глюкоза, ч	ГОСТ 6038—79
D-манноза хч	ТУ 6-09-22-98—79
Натрий фосфорно-кислый однозамещенный, ч	ГОСТ 4198—75
Натрий фосфорно-кислый двухзамещенный, хч	ГОСТ 2493—75
Кислота соляная, хч	ГОСТ 3118—77
Натрий хлористый, хч	ГОСТ 4328—77
Спирт этиловый ректификованный технический	ГОСТ 18300—87
Спирт этиловый ректификованный	ГОСТ 5962—67
Экстракт дрожжевой	
Триптон	
Селективные питательные среды для конкретного ГММ, штамма-реципиента и контрольного штамма: мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов;	ТУ 9229-083-00419785—97
для определения энтеробактерий;	ТУ 9229-072-00419785—97
для определения дрожжей и микроскопических грибов (агар Сабуро, сывороточный и др.);	ТУ 9229-083-00419785—97
для определения S. aureus (типа Байд-Паркера, солевой агар);	ГОСТ 10444.12—88
для выращивания бифидобактерий, молочнокислых и пропионово-кислых бактерий (ГМС, М17, MRS)	ГОСТ 10444.1, п. 5.1, п. 5.
Дезинфицирующий раствор	ТУ 10-02-02-789-192—95
Микробиологические петли стандарт мутности по McFarland 5 %-ная взвесь эритроцитов человека, барана, кролика, морской свинки	

Питательные среды и биологические препараты импортного производства должны иметь сертификат качества ИСО 9000 или EN 29 000.

Питательные среды и препараты отечественного производства должны соответствовать нормативной документации, утвержденной в установленном порядке.

4.2.2.4. Проведение анализа

Взвесь эритроцитов человека, барана или другого вида млекопитающего добавляют к охлажденной до 50—55 °С плотной питательной среде с таким расчетом, чтобы взвесь эритроцитов составляла в агаре 5 %. Смесь аккуратно перемешивают и разливают в чашки Петри. После застывания агара и подсушивания чашек на поверхность 5 %-ного кровяного агара высевают в разведениях культуру ГММ или штамма-реципиента для формирования отдельных колоний. После посева чашки инкубируют в зависимости от вида микроорганизма в течение 24—48 часов при оптимальной для него температуре развития. Затем чашки Петри вынимают из термостата и осуществляют учет результатов. При продукции ГММ и штаммом-реципиентом гемолизина вокруг колоний формируются зоны гемолиза и тем большие, чем больше гемолизина продуцируют ГММ и штамм-реципиент.

При выявлении феномена продукции гемолизина ГММ и штаммом-реципиентом с колонии петлей осуществляют взятие материала, который высевают в пробирку с 3 мл обогащенной жидкой питательной среды (например, содержащую триптон, дрожжевой экстракт, аминокислоты). Пробирки инкубируют в течение 24—48 часов при оптимальной для ГММ температуре, после чего выращенные бактериальные клетки центрифугируют в центрифуге при 6 000 об./мин в течение 15 минут. Супернатант аккуратно отбирают наконечником микропипетки и переносят в чистую пробирку. Затем готовят 1 %-ную взвесь эритроцитов барана или человека и разливают в пробирки по 1 $см^3$ (макрометод) или в U-лунки планшет по 0,1 $см^3$ (микрометод). Добавляют равный объем супернатанта исследуемого ГММ и штамма-реципиента. Инкубируют в течение 1 часа при 35—37 °С и производят предварительный учет результатов. Окончательный учет результатов осуществляют через 18—24 часа инкубации смеси эритроцитов и супернатанта при температуре 18—20 °С.

При положительном результате наблюдается гемолиз эритроцитов, представляющий визуально окрашенный прозрачный бульон. Последняя пробирка или лунка, в которой наблюдается гемолиз отражает титр (количество) гемолизина, продуцируемого ГММ или штаммом-реципиентом. При отрицательном результате на дне пробирки или лунки формируется «пуговка» эритроцитов без изменения цвета бульона. Контроли: отрицательный – вместо супернатанта добавляется равный

объем стерильного бульона, в котором проводилось выращивание культур; положительный – штамм гемолизпродуцирующей кишечной палочки, выращиваемый в тех же условиях, что и ГММ и штамм-реципиент.

4.3. Определение адгезивности ГММ и штамма-реципиента

Для пробиотиков определение адгезивности ГММ и штамма-реципиента является обязательным методом в микробиологической и молекулярно-генетической оценке ГММ, используемых в производстве пищевых продуктов. Для остальных видов ГММ определение адгезивности осуществляется на основании предварительного анализа справочных и нормативных документов, поступающих на экспертизу вместе с ГММ и штаммами-реципиентами.

Адгезивные свойства ГММ могут быть исследованы на ряде биологических моделей (развивающиеся куриные эмбрионы, энтерально зараженные мыши-сосунки, перевязанная петля тонкого кишечника кроликов) и методом гемагглютинации эритроцитов человека или животных. Наиболее простым и универсальным методом определения адгезивных свойств бактерий является выявление способности микроорганизмов вызывать гемагглютинацию эритроцитов человека и животных. В связи с этим адгезивность ГММ и штамма-реципиента первоначально будет определяться методом гемагглютинации. При выявлении способности ГММ и штамма-реципиента агглютинировать эритроциты человека и животных далее, в зависимости от вида ГММ, будет использоваться одна из биологических моделей на животных.

4.3.1. Определение адгезивности ГММ, штамма-реципиента и референтного штамма в отсутствии D-маннозы

Адгезивные свойства ГММ, штамма-реципиента и контрольного штамма первоначально определяются методом гемагглютинации эритроцитов человека или животных (мыши, крысы, кролика, барана и др.) в отсутствии D-маннозы (маннозо-чувствительная адгезия). При этом метод может выполняться в макро- (пробирках) и микровариантах (планшетах).

Выполнение метода включает следующие этапы:

- приготовление взвеси эритроцитов;
- приготовление суспензии микроорганизма;
- внесение в пробирки или в лунки планшет взвеси эритроцитов;
- внесение в пробирки или в лунки планшет суспензии культуры ГММ;
- аккуратное перемешивание смеси эритроцитов и суспензии культур;

• инкубация в термостате при 37 °С в течение 1 часа;

• предварительный учет результатов;

• инкубация смеси эритроцитов и суспензии микроорганизма при комнатной температуре в течение 18 часов;

• окончательный учет результатов.

Постановка реакции гемагглютинации с эритроцитами человека или животных включает следующие этапы.

Приготовление взвеси эритроцитов. Из тщательно отмытых эритроцитов готовят 1 %-ную взвесь в стерильном физиологическом растворе. С этой целью к 1 $см^3$ эритроцитов, помещенных в 200 $см^3$ колбу добавляют 99 $см^3$ стерильного физиологического раствора. Взвесь аккуратно перемешивают до образования однородной суспензии.

Приготовление суспензии ГММ. ГММ, выращенный на плотной питательной среде, смывают стерильным физиологическим раствором и готовят суспензию клеток в концентрации 1×10^9 КОЕ/$см^3$, используя стандарты мутности, выпускаемые *ГИСК* им. Тарасевича или стандарт McFarlane (N1-7).

Приготовленную 1 %-ную взвесь эритроцитов вносят по 1 $см^3$ в пробирки или по 0,1 $см^3$ в лунки планшет с U-дном. Далее в тех же количествах вносят суспензию ГММ и взвесь аккуратно перемешивают. Пробирки закрывают пробками, планшет крышкой и помещают в термостат при температуре оптимальной для исследуемого вида ГММ на 1 час. После инкубации пробирок или планшета в термостате их вынимают и проводят предварительный учет результатов. При наличии адгезивных свойств у ГММ эритроциты распределяются равномерно по всей поверхности дна. При отрицательном результате все эритроциты собираются в виде точки в середине дна пробирки или лунки планшета. Окончательные результаты исследования учитывают через 18 часов после инкубации пробирок или планшета при комнатной температуре.

4.3.2. Определение адгезивности ГММ, штамма-реципиента и референтного штамма в присутствии D-маннозы

При выявлении выраженной гемагглютинационной активности ГММ или штамма-реципиента ту же реакцию проводят с использованием d-маннозы для определения маннозо-чувствительной или маннозорезистентной адгезии. Постановка метода в данном варианте проводится аналогично пункту 4.3.1, к которому добавляется ряд пробирок или лунок, в которые внесена 1 % D-манноза. В случае маннозо-чувствительной гемагглютинации (адгезии) наблюдается оседание эритроцитов в виде точки в середине дна пробирки или лунки. Маннозо-устойчивая

гемагглютинация наблюдается и при добавлении d-маннозы в реакционную взвесь.

При выявлении гемолитической и адгезивной активности у ГММ и штамма-реципиента в экспериментах in vitro необходимы исследования на экспериментальных моделях in vivo.

4.4. Определение вирулентности ГММ, штамма-реципиента и референтного (контрольного) штамма

4.4.1. Аппаратура, материалы и инструментарий

4.4.1.1. Аппаратура и инструментарий

	НД (ГОСТ, ТУ)
Термостат, позволяющий поддерживать рабочую температуру 28—37 °С с отклонением от заданной ± 1 °С	ТУ 64-1-1382—72
Весы лабораторные общего назначения, 2 и 4 класса точности, с наибольшим пределом взвешивания 200 г	ГОСТ 24104—88
Микроскоп биологический МБИ-2, МБИ-3, МБР-3	ГОСТ 8284—78
Дистиллятор, обеспечивающий качество дистиллированной воды	ГОСТ 6709—72
Облучатель бактерицидный настенный ОБН-150 или других видов	ТУ 16-535—84
Холодильник бытовой электрический	
Пинцет медицинский	ГОСТ 21241—89
Ножницы медицинские	ГОСТ 21239—89
Шприцы медицинские 1 или 0,1 $см^3$	
Штативы для пробирок	

4.4.1.2. Лабораторная посуда и материалы

Бумага фильтровальная лабораторная	ГОСТ 12026—76
Марля медицинская	ГОСТ 9412—77
Полистироловые планшеты U-образные	
Пробирки типов П1, П2	ГОСТ 25336—82
Стекла предметные для микропрепаратов	ГОСТ 6672—75
Чашки биологические (Петри)	ГОСТ 23932—90
Микробиологические петли	

4.4.1.3. Реактивы и питательные среды

	НД (ФС, ТУ)
Агар микробиологический	ГОСТ 17206—84
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709—72

D-глюкоза, ч	ГОСТ 6038—79
D-лактоза, 1- водная	ТУ 6-09-22-98—79
Натрий фосфорно-кислый однозамещенный, ч	ГОСТ 4198—75
Натрий фосфорно-кислый двухзамещенный, хч	ГОСТ 2493—75
Кислота соляная, хч	ГОСТ 3118—77
Натрий хлористый, хч	ГОСТ 4328—77
Спирт этиловый ректификованный технический	ГОСТ 18300—87
Спирт этиловый ректификованный	ГОСТ 5962—67
Питательный бульон	ТУ 10-02-02-789-176—94
Сухая питательная среда для определения чувствительности к антибиотикам диффузионным методом	ГОСТ 51600—2000
Питательные среды для определения энтеробактерий	ТУ 9229-072-00419785—97 ГОСТ 29184—91
Среды для определения дрожжей и *микроскопических грибов (агар Сабуро,* сывороточный и *др.*)	ТУ 9229-083-00419785—97 ГОСТ 10444.12—88
Среды для определения S. aureus (типа Байд-Паркера, солевой агар)	ГОСТ 10444.1, п. 5.1, п. 5.4
Среды для выращивания бифидобактерий молочнокислых и пропионово-кислых бактерий (ГМС, М17, MRS)	ТУ 10-02-02-789-192—95
Дезинфицирующий раствор	
Микробиологические петли, скальпель	

4.4.2. Описание метода

Группам мышей, по 10 животных каждая, вводят внутрибрюшинно по 0,1 $см^3$ живой культуры ГММ, штамма-реципиента или контрольного штамма в концентрации 1×10^9, 1×10^7, 1×10^5 и 1×10^3 КОЕ/$см^3$. Каждую группу животных помещают в отдельную клетку и далее наблюдают в течение 10 дней за гибелью животных.

В качестве контролей используют группы животных (по 10 шт.), которым внутрибрюшинно вводят: а) стерильный физиологический раствор и б) вирулентный штамм определенного вида с установленной ранее дозой LD_{50}.

4.4.3. Учет результатов

По завершении срока наблюдения подсчитывают гибель животных в каждой группе.

LD_{50} рассчитывают по формуле:

$$\lg LD_{50} = \lg D_N - \delta (\Sigma L_i - 0{,}5), \text{ где}$$

N – общее число испытанных доз;

n – число животных, которым введена каждая доза;

δ – логарифм отношения каждой последующей дозы к предыдущей, т. е. логарифм кратности испытанных разведений;

L_i – отношение числа животных, погибших от введения данной дозы, к общему числу животных, которым эта доза введена, индекс i соответствует номеру дозы, если считать наименьшую из испытанных доз первой;

ΣL_i – сумма значений L_i, найденных для всех испытанных доз;

D_i – величина дозы (номер i);

D_N – максимальная,

D_1 – минимальная из испытанных доз.

ГММ и штамм-реципиент считаются авирулентными, если LD_{50} равна 5×10^8 КОЕ/см^3 и более.

При идентичных показателях LD_{50} у ГММ и штамма-реципиента можно считать, что осуществленная генетическая модификация не повлияла на вирулентные свойства ГММ.

4.5. Определение адгезивности ГММ и штамма-реципиента in vivo

При подтверждении гемагглютинационной активности ГММ или штамма-реципиента с использованием d-маннозы возможно количественное определение адгезии in vivo при использовании биологических моделей (развивающиеся куриные эмбрионы, энтерально зараженные мыши-сосунки, перевязанная петля тонкого кишечника кроликов). Ниже приведено описание модели для исследования адгезивной активности штаммов микроорганизмов на модели перевязанной петли тонкого кишечника 12—14-дневных крольчат.

4.5.1. Материалы и инструментарий

4.5.1.1. Аппаратура и инструментарий

	НД (ГОСТ, ТУ)
Термостат, позволяющий поддерживать рабочую температуру 28—37 °С с отклонением от заданной ± 1 °С	ТУ 64-1-1382—72
Микроскоп биологический МБИ-2, МБИ-3, МБР-3	ГОСТ 8284—78
Облучатель бактерицидный настенный ОБН-150 или других видов	ТУ 16-535—84
Пинцет медицинский	ГОСТ 21241—89

Ножницы медицинские ГОСТ 21239—89
Скальпель медицинский, хирургический 15 см ГОСТ 21240—89
Шприцы медицинские 1 или 0,1 $см^3$
Штативы для пробирок

4.5.1.2. Животные и штаммы

12—14-дневные крольчата
Культура ГММ, штамма-реципиента или контрольного (референтного) штамма того же вида, что и ГММ

4.5.2. Сущность метода

В каждый опыт берут не менее 3 крольчат. Животных фиксируют на специальном столе и внутримышечно во внутреннюю область бедра вводят тиопентал натрия (0,1 мл 1 %-ного раствора на 50 г веса животного). Наркотический эффект наступает через 2—3 минуты. По средней линии живота крольчонка делают разрез брюшины по 1 см в обе стороны от пупка. Извлекают петли дистального отдела тонкого кишечника и в его просвет на расстоянии 3—5 см от уровня верхушки аппендикса, имеющего общую брыжейку с подвздошной кишкой, вводят с помощью иглы шприца (1,0 $см^3$) 0,1 мл микробной взвеси, содержащей 10^8 КОЕ/$см^3$. Одновременно делают 10-кратные разведения взвеси ГММ и из 3, 4 и 5-го разведений производят посевы по 0,5 мл на плотную питательную среду, делая параллельные высевы по 2 чашки Петри на каждое разведение.

Через 1,5 часа после заражения животных усыпляют хлороформом и вскрывают. Отступя 5—7 см от слепой кишки, извлекают участок подвздошной кишки длиной 20 см и переносят в чашку Петри. Чтобы предупредить элиминацию ГММ со слизистой кишечника исследуемый материал помещают на лед и дальнейшие процедуры проводят оперативно. Отрезки кишечника разрезают вдоль, трижды промывают в охлажденном при 4 °С растворе 0,9 %-ного хлористого натрия, растирают в ступке или специальном гомогенизаторе. К растертой ткани добавляют 1 мл 0,9 %-ного раствора хлористого натрия и полученные суспензии переносят в пробирки и делают 10-кратные разведения. Из 3, 4, 5-го разведений делают посевы по 0,5 мл на плотную питательную среду, делая параллельные высевы по 2 чашки Петри на каждое разведение. Через 18—24 часа после инкубации при температуре оптимальной для выращивания исследуемого вида ГММ подсчитывают число выросших колоний, изолированных со слизистой тонкого кишечника и высеянных непосредственно из пробирки до заражения кроликов. Таким образом,

определяется число ГММ, прикрепившихся к слизистой тонкого кишечника.

4.5.3. Учет и интерпретация результатов

Коэффициент адгезии для количественной оценки адгезивной активности ГММ, штамма-реципиента и контрольного штамма высчитывают по следующей формуле:

$$K = \frac{в}{а} \cdot 100\,\%\text{, где}$$

К – коэффициент адгезии – процент адгезивных ГММ в популяции исследуемого штамма;

а – число жизнеспособных ГММ, введенных в кишечник крольчат;

в – число ГММ, прикрепившихся к стенке кишечника.

По степени адгезивности ГММ они оцениваются следующим образом:

а) высокоадгезивные с коэффициентом адгезии 3,0 и выше, б) адгезивные – от 1 до 3 и в) слабоадгезивные – 0,001—0,9. Слабоадгезивные штаммы, как правило, авирулентны, а адгезивные и высокоадгезивные штаммы, обычно, обладают определенными вирулентными свойствами.

Оценка ГММ осуществляется по двум показателям: 1) он должен иметь коэффициент адгезии не более чем 0,9 и 2) коэффициент адгезии ГММ должен быть равен или быть меньше коэффициента адгезии штамма-реципиента. При показателях коэффициента адгезии выше 1,0 требуются молекулярно-генетические исследования на выявление генов адгезии у ГММ и штамма-реципиента.

4.6. Определение инвазивности ГММ и штамма-реципиента

Инвазивность грамотрицательных бактерий тестируют с помощью кератоконъюктивальной пробы. Сущность метода заключается в том, что возбудитель проникает в эпителиальные (инвазирует их) клетки конъюктивы, а затем в роговицу и размножается в них, вызывая, очаговое, а затем и сплошное разрушение ткани.

4.6.1. Материалы и инструментарий

	НД (ГОСТ, ТУ)
Термостат, позволяющий поддерживать рабочую температуру 28—37 °С с отклонением от заданной ± 1 °С	ТУ 64-1-1382—72
Пинцет медицинский	ГОСТ 21241—89
Ножницы медицинские	ГОСТ 21239—89
Скальпель медицинский, хирургический 15 см	ГОСТ 21240—89

Микропипетки типа «Ленпипет» переменного объема 0,5—10 мкл, 5—40 мкл, 40—200 мкл, 200—1 000 мкл ТУ 9452-002-33189998—02
Наконечники для микропипеток
Шприцы медицинские 1 см^3 или 0,1 см^3
Штативы для пробирок

4.6.1.1. Животные и штаммы

Морские свинки
Культура ГММ, штамма-реципиента или контрольного (референтного) штамма того же вида, что и ГММ.

Выращенные на селективной для данного вида микроорганизма плотной или жидкой питательной среде клетки ГММ и штамма-реципиента трижды отмывают в стерильной дистиллированной воде и готовят взвесь по стандарту McFarland или стандартам мутности ГИСК им. Тарасевича в концентрации 1×10^8 КОЕ/см^3. 0,1 см^3 приготовленной таким образом взвеси вносят в конъюнктиву глаза. Со второго дня после введения в течение 14 дней проводят визуальное исследование поражений конъюктивы и роговицы глаза. У штаммов, обладающих низкой вирулентностью поражения роговицы, носящие обратимый характер, наблюдаются в более поздние сроки.

Контроль: отрицательный – 0,1 мл в конъюктиву глаза стерильной дистиллированной воды; положительный – 0,1 мл в конъюктиву глаза вирулентной культуры возбудителя дизентерии – S. flexneri или S. sonei.

4.6.2. Учет результатов

ГММ, штамм-реципиент и контрольный (референтный) штамм того же вида, что и ГММ не должны вызывать поражения конъюктивы и роговицы. В случае выраженных инвазивных свойств выносится отрицательное заключение о возможности использования ГММ в производстве пищевых продуктов.

4.7. Определение антагонистической или симбиотической активности ГММ и штамма-реципиента с представителями резидентной микрофлоры кишечника человека

Определение взаимодействия ГММ и штамма-реципиента с резидентной микрофлорой кишечника человека является обязательным для пробиотиков, а также микроорганизмов, входящих как компоненты пищевых продуктов (например, кисломолочная продукция). Для других представителей ГММ данное исследование выполняется по решению

экспертного Совета, выполняющего микробиологическую и молекулярно-генетическую оценку ГММ и штамма-реципиента.

4.7.1. Аппаратура, материалы, лабораторная посуда, реактивы и питательные среды

4.7.1.1. Аппаратура и инструментарий

	НД (ГОСТ, ТУ)
Анализатор потенциометрический, погрешность измерений pH ± 0,01	ГОСТ 19881—74
Шкаф сушильный стерилизационный ШСС-80П или других марок, позволяющий поддерживать температуру (160 ± 5) °С	ТУ 64-1-28-70—76
Термостат, позволяющий поддерживать рабочую температуру 28—37 °С с отклонением от заданной ± 1 °С	ТУ 64-1-1382—72
Баня водяная с подогревом	ГОСТ 12026—76
Весы лабораторные общего назначения, 2 и 4 класса точности, с наибольшим пределом взвешивания 200 г	ГОСТ 24104—88
Микроскоп биологический МБИ-2, МБИ-3, МБР-3	ГОСТ 8284—78
Стерилизаторы паровые медицинские или аналогичные	ГОСТ 19569—89Е
Дистиллятор, обеспечивающий качество дистиллированной воды	ГОСТ 6709—72
Облучатель бактерицидный настенный ОБН-150 или других видов	ТУ 16-535—84
Холодильник бытовой электрический	
Штативы для пробирок	
Микроволновая печь для быстрого плавления плотных питательных сред	

4.7.1.2. Лабораторная посуда и материалы

Бумага фильтровальная лабораторная	ГОСТ 12026—76
Бутыли стеклянные для химических реактивов	
Марля медицинская	ГОСТ 9412—77
Колбы плоскодонные конические или круглые разной вместимости	ГОСТ 1770—74
Воронки стеклянные	ГОСТ 25336—82
Вата медицинская гигроскопическая	ГОСТ 5556—81

Полистироловые планшеты U-образные	
Пробирки типов П1, П2	ГОСТ 25336—82
Стекла предметные для микропрепаратов	ГОСТ 6672—75
Термометр ртутный с диапазоном измерения от 0 до 100 °С (цена деления шкалы 1 °С)	ГОСТ 13646—68
Чашки биологические (Петри)	ГОСТ 23932—90
Микробиологические петли	

4.7.1.3. Реактивы и питательные среды

	НД (ФС, ТУ)
Агар микробиологический	ГОСТ 17206—84
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709—72
D-глюкоза, ч	ГОСТ 6038—79
D-лактоза, 1- водная	ТУ 6-09-22-98—79
Натрий фосфорно-кислый однозамещенный, ч	ГОСТ 4198—75
Натрий фосфорно-кислый двухзамещенный, хч	ГОСТ 2493—75
Кислота соляная, хч	ГОСТ 3118—77
Натрий хлористый, хч	ГОСТ 4328—77
Масло иммерсионное для микроскопии	ГОСТ 31739—78
Набор реактивов для окраски по Граму	
Спирт этиловый ректификованный технический	ГОСТ 18300—87
Спирт этиловый ректификованный	ГОСТ 5962—67
Экстракт дрожжевой*	
Триптон*	
Антибиотики разных групп*	
Диски с антибиотиками*	

Питательные среды:

Для определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов	ТУ 9229-083-00419785—97
Питательный бульон	ТУ 10-02-02-789-176—94
Питательные среды для определения энтеробактерий	ТУ 9229-072-00419785—97 ГОСТ 29184—91
Среды для определения дрожжей и микроскопических грибов (агар Сабуро, сывороточный и др.)	ТУ 9229-083-00419785—97 ГОСТ 10444.12—88
Среды для определения S. aureus	ГОСТ 10444.1, п. 5.1, п. 5.4

* Производства разных фирм, прошедшие государственную регистрацию и разрешенные к использованию.

(типа Байд-Паркера, солевой агар)
Среды для выращивания бифидобактерий молочнокислых и пропионово-кислых бактерий (ГМС, М17, MRS) ТУ 10-02-02-789-192—95
Планшеты для идентификации культур производства разных фирм, прошедшие государственную регистрацию в установленном порядке и разрешенные к использованию
Реактивы для ряда тестов в зависимости от идентифицируемого вида ГММ
Стандарт мутности по McFarland

4.7.1.4. Штаммы

ГММ, штамм-реципиент, контрольный (референтный) штамм того же вида, что и ГММ
Контрольные (референтные) штаммы, представляющие основные виды резидентной микрофлоры человека:
Грамположительные облигатно-анаэробные бактерии
Лактобактерии
Бифидобактерии
Пептострептококки
Грамотрицательные облигатно-анаэробные бактерии
Бактероиды
Факультативно-анаэробные микроорганизмы
Кишечная палочка
Стафилококки
Стрептококки
Дрожжеподобные грибы рода Candida

Контрольные штаммы, используемые в настоящем разделе, должны иметь паспортные данные и принадлежать к Американской типовой коллекции культур (АТСС) или получены из музея живых культур Государственного НИИ стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л. А. Тарасевича.

Допускается использование других разрешенных питательных сред и диагностических тест-систем аналогичного назначения для проведения исследований фенотипических свойств в соответствии с данным документом. При их применении необходимо руководствоваться рекомендациями изготовителя.

Питательные среды и биологические препараты импортного производства должны иметь сертификат качества ИСО 9 000 или EN 29 000.

Питательные среды и препараты отечественного производства должны соответствовать нормативной документации, утвержденной в установленном порядке.

4.7.2. Сущность метода

Из выращенных на плотных или жидких питательных средах контрольных штаммов и ГММ, штамма-реципиента и референтного штамма того же вида, что и ГММ готовят взвеси микроорганизмов с определенными концентрациями КОЕ/мл. Далее готовят ряды пробирок с жидкой питательной средой по 3 мл, на которой способны расти все исследуемые микроорганизмы (например, триптиказо-соевый или L-бульон) и вносят по 0,5 мл 10^1, 10^3 и 10^5 КОЕ/см^3 ГММ и такое же количество клеток контрольного штамма (например, Bifidobacterium). Одновременно осуществляют посевы на селективные питательные среды в разведениях для точного подсчета клеток каждого вида микроорганизма. Например, для точного подсчета количества клеток стафилококков посев осуществляется на желточно-солевой агар при дальнейшем культивировании при 37 °С в течение 48 часов в аэробных условиях, в то время как для определения количества клеток бифидобактерий взвесь микроорганизмов высевается на модифицированную среду Блоурока, а культивирование производят в анаэробных условиях при 37 °С в течение 48 часов.

Через 6 и 24 часов осуществляют посевы на селективные питательные среды и подсчитывают число клеток представителя резидентной микрофлоры и ГММ. Контролями служат посевы, в которых выращивается только представитель резидентной микрофлоры или ГММ. Вычисляется число клеток представителя резидентной микрофлоры, выращенного в присутствии ГММ и отдельно. При приблизительно одинаковом соотношении числа выросших клеток отдельно и в присутствии ГММ можно считать, что ГММ не обладает антагонистическим действием. При более высоких показателях числа выросших клеток обоих видов, чем при выращивании каждого из представителей в отдельности, можно констатировать, что оба вида характеризуются симбиотическим действием. При превышении количества клеток представителя резидентной микрофлоры в 5 и более раз, выращенного без ГММ, чем в смеси с ГММ, можно полагать антагонистическое действие ГММ на конкретного представителя нормальной микрофлоры кишечника. В случае, если такое антагонистическое действие ГММ проявляется ко

всем или большинству из исследованных представителей нормальной микрофлоры кишечника человека, делается заключение о невозможности его использования в производстве пищевых продуктов. При выявлении антагонистического действия ГММ к 1—2 представителям нормальной микрофлоры кишечника человека требуются дополнительные исследования, включающие исследование антагонистической активности ГММ и штамма-реципиента с представителями резидентной микрофлоры кишечника человека in vivo, молекулярно-генетические исследования по выявлению генов, детерминирующих данный феномен.

5. Молекулярно-генетическая оценка ГММ, используемых для производства пищевой продукции

Необходимость проведения тех или иных исследований по данному разделу и для каждого конкретного вида пищевой продукции, полученной с использованием ГММ, определяется экспертом центра по микробиологической и молекулярно-генетической экспертизе ГММ при ГУ НИИЭМ им. Гамалеи РАМН. Это обусловлено большим разнообразием последовательностей чужеродной ДНК, которые могут быть встроены в геном ГММ. Эксперт обязан проанализировать представленную заявителем документацию, соответствующие базы данных (в т.ч. и международные) и составить перечень необходимых исследований в зависимости: 1) от сложности конструкции ГММ; 2) характера и места использования ГММ в технологии получения пищевых продуктов; 3) вероятности попадания живых ГММ в организм человека.

Для точной идентификации таксономического положения и свойств ГММ (*при необходимости – штаммов-доноров и реципиентов*), фирма-заявитель должна представить паспорт штамма и/или справку о депонировании в национальных или иных международно признанных коллекциях культур микроорганизмов, в коллекциях научно-исследовательских организаций с указанием:

1) наименования штамма в соответствии с действующей международной номенклатурой (род, вид, номер штамма);

2) источника выделения;

3) сведений, подтверждающих безопасное использование данного штамма и /или продуктов, выработанных с его применением, в питании людей – Инвентарный перечень GRAS FDA, свидетельства о свободной продаже в стране-изготовителе); для штаммов-продуцентов ферментных препаратов и пищевых веществ – сведения о соответствии штамма СанПиН 2.3.2.1293—03 «Гигиенические требования к применению пи-

щевых добавок», Перечню Комиссии Кодекс Алиментариус, General Requirements, V. 1A;

4) сведений о непатогенности и нетоксигенности;

5) сведений о стабильности генома;

6) сведений о профиле антибиотико-резистентности;

7) сведений о резистентности к кислоте и желчи (для пробиотиков);

8) способности к симбиозу с резидентной микрофлорой ЖКТ (для пробиотиков);

9) способности к адгезии (для пробиотиков);

10) способности к продукции биологически активных субстанций;

11) способности к иммуностимулирующему эффекту (для пробиотиков).

Для подтверждения таксономического положения штамма заявитель должен представить информацию об уровне гомологии ГММ (в случае необходимости штаммов-донора и реципиента) с штаммами этого вида, допущенными для использования в пищевой промышленности при создании аналогичной продукции. Также должны быть предоставлены данные сравнения фенотипических свойств ГММ с характерными фенотипическими свойствами его вида, описанными в определителе Берги (Bergey's manual of systematic bacteriology. Eds. Sneaht P.N.D. et al. Baltimore; Williams and Wilkins. V. 2, 1986).

Заявитель (поставщик) должен представить информацию о нуклеотидной последовательности генной вставки, а также материалы, отражающие молекулярно-биологические характеристики ГММ (см. п. 3.3 настоящих МУК).

5.1. ПЦР-идентификация чужеродного генетического материала в штаммах ГММ

Согласно рекомендациям ФАО/ВОЗ стратегия выявления генетических модификаций у микроорганизмов, используемых в производстве пищевых продуктов, должна быть направлена на выявление максимального количества потенциальных рисков. Поэтому экспертные исследования штаммов ГММ должны включать, с одной стороны, подтверждение природы штамма-реципиента и целевой вставки чужеродной ДНК (согласно представленной заявителем документации), а с другой стороны, выявлять наличие возможных генетических модификаций, не указанных в документации. Рекомендуемые стратегии выявления генетических модификаций предлагают использовать для этих целей наиболее часто употребляемые векторные последовательности: селективные гены (гены антибиотико-резистентности, бактериоцинов или ауксотрофные

селективные маркеры), неэкспрессируемые последовательности (полилинкеры, промоторы или терминаторы), а также последовательности мигрирующих элементов. Обнаружение таких последовательностей будет свидетельствовать о возможных незадокументированных генетических модификациях, что потребует проведения дополнительных исследований штаммов ГММ. С точки зрения безопасности пищевые ГММ не должны содержать гены антибиотико-резистентности, встроенная ДНК не должна кодировать выработку потенциально опасных веществ, а векторы класса food-grade должны быть сконструированы таким образом, чтобы свести к минимуму вероятность передачи нового генетического материала другим микроорганизмам. Проведение дополнительных исследований может потребовать использования таких методов как различные виды гибридизационного и рестрикционного анализа, секвенирование, анализ функционирования вставки (ОТ-ПЦР и изучение продукции белка чужеродной ДНК). Однако основным скрининговым методом является полимеразная цепная реакция – ПЦР. Специально подобранные пары праймеров будут использованы как для проверки целевого гена, так и для последовательностей, свидетельствующих о возможных генетических модификациях.

В настоящее время методы молекулярной биологии, основанные на ПЦР-анализе, находят все более широкое применение в целях диагностики и экспресс-анализа разнообразного биологического материала. Преимущество подобных методик обусловлено высокой чувствительностью и специфичностью ПЦР, совместимостью ПЦР-анализа с дополнительными методами исследования (секвенирование, рестрикционный и гибридизационный анализы амплифицированных фрагментов, изучение информационных РНК (ОТ-ПЦР) и транслируемого ими белкового продукта). Достоинством ПЦР-анализа являются также высокая воспроизводимость результатов, технологичность проведения анализа в сочетании с доступностью и сравнительно невысокой стоимостью оборудования для организации ПЦР-лабораторий.

5.1.1. Метод идентификации целевых генов, неэкспрессируемых последовательностей и селективных маркеров, а также подтверждение видовой принадлежности штамма, при помощи ПЦР

5.1.1.1. Создание электронной базы данных

Для полной и надежной идентификации конкретного ГММ необходимо создать электронную базу данных о целевых, селективных и маркерных генах, мигрирующих элементах, неэкспрессируемых последовательностях и регуляторных элементах, а также векторных конст-

рукциях класса food-grade, которые используются при создании ГММ. В такую базу данных должна быть включена информация о видоспецифических генах, которые могут быть использованы для подтверждения таксономической принадлежности штамма. Также в базу данных должны быть включены сведения о наличии в коллекциях штаммов ГММ, принадлежащих к 1, 2 и 3 классу безопасности, в различных странах.

Особое внимание при создании электронной базы данных следует уделить информации о так называемых GRAS (generally recognized as safe) микроорганизмах, которые чаще всего используются как доноры генетической информации при конструировании ГММ.

5.1.1.2. Выбор праймеров

Для проведения экспертизы ГММ выбор праймеров должен проводиться по следующим позициям:

1) для идентификации таксономической принадлежности микроорганизма (гены 16S/23S рРНК или другие специфические последовательности);

2) для идентификации целевых генов генетической вставки (гены, кодирующие продукцию технологически важных ферментов, например, таких как химозин; гены устойчивости к бактериофагам; гены-регуляторы уровня кислотности; гены устойчивости к этанолу и другим стрессовым факторам);

3) для идентификации генов селективных маркеров (гены устойчивости к антибиотикам, бактериоцинам, ауксотрофным селективным маркерам);

4) для идентификации маркерных (screenable) векторных генов (гены E. coli, кодирующие β-галактозидазу или β-глюкоронидазу или гены бактериофага Т7, кодирующие РНК полимеразу);

5) для идентификации неэкспрессируемых последовательностей (полилинкеры, промоторы и терминаторы);

6) для идентификации мигрирующих элементов, используемых для создания транспозируемых векторов (например, Ту-элементы).

Выбор праймеров должен осуществляться в соответствии с правилами молекулярного дизайна. Для выбора праймеров должны быть использованы программы Primer, Oligo или другие аналогичные программы, позволяющие осуществлять многофакторный анализ выбранных последовательностей. Должен быть произведен сравнительный анализ выбранных олигонуклеотидов с помощью программы Blast для исключения наличия областей гомологии с ДНК родственных и неродственных видов.

Конкретный набор тех или иных праймеров для проведения экспертизы должен определяться таксономической принадлежностью штамма; информацией о его генетическом статусе и характере генетических модификаций, предоставленной заявителем; а также характера и места использования ГММ в технологии получения пищевых продуктов и вероятности попадания живых ГММ в организм человека (см. п. 3.4 настоящих МУ). Выбор, синтез и очистка праймеров производится в Центре по микробиологической и молекулярно-биологической экспертизе ГММ при ГУ НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи РАМН.

5.1.1.3. Выбор условий проведения ПЦР

Условия проведения реакции определяют степень точности и воспроизводимости результатов и их отработка должна производиться для каждой конкретной пары праймеров. Выбор условий проведения ПЦР включает подбор оптимального соотношения компонентов реакционной смеси, структуры программы амплификации (временных и температурных характеристик каждого этапа амплификации) и адекватного метода детекции результатов. Выбор оптимальных условий проведения ПЦР обеспечивает высокий уровень чувствительности и специфичности прохождения реакции, исключающий наличие перекрестных реакций с неспецифическими ДНК. Выбор оптимальных условий проведения ПЦР осуществляется сотрудниками Центра по микробиологической и молекулярно-биологической экспертизе ГММ при ГУ НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи РАМН.

5.1.1.4. Выделение ДНК из культур ГММ и проведение ПЦР

5.1.1.4.1. Аппаратура и инструментарий

	НД (ГОСТ, ТУ)
Программируемый термостат (ДНК-амплификатор) типа «Терцик МС2» или аналоги	
Термостат, поддерживающий температуру 45 °С, для пробирок объемом 1,5 мл	
Центрифуга со скоростью вращения ротора 8 000—12 000 об./мин для пробирок, вместимостью 1,5 и 0,5 мл типа «Эппендорф»	
Прибор для горизонтального электрофореза	
Встряхиватель вибрационный (типа «Вортекс»)	
Водяная баня с подогревом	ГОСТ 12026—76
Ультрафиолетовый трансиллюминатор	
Холодильная камера на – 20 °С	

Пипетки полуавтоматические одноканальные со сменяемыми наконечниками на 1—10, 5—40, 40—200, 200—1 000 мкл типа «Ленпипет»

5.1.1.4.2. Лабораторная посуда и материалы

Пробирки типа «Эппедорф», вместимостью 1,5 мл, совместимые с центрифугой
Пробирки типа «Эппедорф», вместимостью 0,5 мл, совместимые с амплификатором
Наконечники пластиковые на 1—200 мкл к пипеткам полуавтоматическим
Наконечники пластиковые на 200—1 000 мкл к пипеткам полуавтоматическим
Перчатки резиновые ГОСТ 3—88
Колбы плоскодонные конические разной вместимости ГОСТ 1770—74
Штативы для пробирок

5.1.1.4.3. Реактивы

Допускаются к использованию реактивы производства различных отечественных и зарубежных фирм, прошедшие государственную регистрацию и разрешенные для использования в установленном порядке.

Трис аминометан
ЭДТА
Хлористый натрий
Бычий сывороточный альбумин
Ацетат калия
Едкий натр
β-меркаптоэтанол
Водный раствор дезоксинуклетидтрифосфатов (0,1 М)
Термостабильная ДНК-полимераза
AMV-ревертаза (обратная траснскриптаза)
Бромфеноловый синий
Агароза для электрофореза
Бромистый этидий
Ледяная уксусная кислота
Вода деионизованная ГОСТ 6709—72
Масло вазелиновое ГОСТ 3164—78

5.1.1.4.4. Приготовление основных растворов

1 М Трис pH-7,5. Растворить 121,1 г Трис в 800 мл воды. Довести pH до необходимого значения добавлением концентрированной HCL и довести объем до 1 л. Раствор простерилизовать.

0,5 М ЭДТА pH-8,0. К 186,1 г ЭДТА добавить 800 мл воды. Довести pH до 8,0 NaOH.

5 М NaCl (х. ч. или ч. д. а.). 29,22 г NaCl растворить в 80 мл воды довести объем до 100 мл, простерилизовать.

10 %-ный SDS. 10 г SDS растворить в 90 мл воды, чтобы ускорить растворение, можно нагреть раствор до 60 °С. Довести pH до 7,2 добавлением нескольких капель концентрированной HCl и довести до 100 мл. **Внимание!** *При взвешивании SDS наденьте на лицо маску, т. к. при попадании на слизистую оболочку носоглотки этот летучий порошок вызывает сильное раздражение.*

5 М Ацетат калия. 49,1 г ацетата калия растворить в 80 мл воды и *довести объем до 100 мл.*

70 %-ный этанол. Для приготовления 100 мл раствора требуется 73 мл 96 % этанола и 27 мл воды.

5.1.1.4.5. Выделение ДНК из штамма ГММ

Для выделения ДНК из штамма ГММ может применяться фенол-хлороформный или другой адекватный метод. Однако наиболее надежные результаты в ПЦР дает ДНК, выделенная непосредственно перед постановкой реакции из замороженной бактериальной пасты по методу Бирнобойма и Доли:

20—40 мкл оттаявшей бактериальной массы суспендируют в 100 мкл буфера I (50 mM Трис-HCl, pH 8,0, 5 mM ЭДТА, 50 мкг/мл РНКазы). К суспензии добавляют 120 мкл лизирующего буфера (0,2 М NaOH, 1 % SDS) и ожидают лизиса бактерий, видимого по возрастанию вязкости суспензии. После этого комплекс бактериальных белков и обломков клеточной стенки осаждают добавлением 100 мкл 2,55 М ацетата калия при энергичном встряхивании на вортексе в течение 5 мин. Затем смесь центрифугируют в течение 5—10 мин. Надосадочную жидкость переносят в пробирку объемом 1,5 мл, содержащую 0,75 мл смолы марки Wizzard. Смесь тщательно перемешивают и фильтруют через мини-колонку; промывают осадок смолы в мини-колонке 2 мл 80 % изопропанола и центрифугируют 1 мин при 12 000 g для удаления остатков жидкости. Мини-колонку помещают в стерильную пробирку объемом 1,5 мл, наносят в мини-колонку 50 мкл стерильной бидистиллированной или деионизованной воды и прогревают пробирку с колонкой 5 мин при плюс 70 °С. Затем мини-колонку в пробирке помещают в

центрифугу и центрифугируют 1 мин при максимальной скорости для переноса раствора ДНК в пробирку. Описанным способом получают порядка 5 мкг ДНК размером от 3 до 15 т.п.н. Полученные препараты ДНК сохраняются при минус 70 °С и используются для анализа методом ПЦР. При условии использования стерильных растворов и посуды получаемая ДНК может храниться при плюс 4 °С в течение полугода. Срок хранения препаратов ДНК при минус 20 °С превышает 2 года.

5.1.1.4.6. Проведение ПЦР

ПЦР осуществляют с помощью ДНК-амплификаторов (термоциклеров). Для проведения ПЦР используется термостабильная Taq-полимераза, соответствующий ей десятикратный ПЦР-буфер, растворы четырех дезоксирибонуклеотидтрифосфатов и выбранной пары праймеров. В типичных экспериментах реакционную смесь объемом 50 мкл составляют так, чтобы она содержала 350 нг геномной ДНК, 1,5 мМ каждого из четырех дезоксирибонуклеотидтрифосфатов, 1 ед. Taq-полимеразы. Затем к реакционной смеси добавляют 30 пкМ пары олигонуклеотидных праймеров в буферном растворе следующего состава: 67 мМ Трис-HCl буфер (pH 8,0 при 25 °С), содержащий 16,6 мМ сульфат аммония, 15 мМ $MgCl_2$, 10 мМ 2-меркаптоэтанол, 6,7 мкМ ЭДТА и бычий сывороточный альбумин в концентрации 170 мкг/мл. Далее на каждую пробу наслаивают по 50 мкл минерального масла и реакцию проводят по специально подобранным программам в многоканальном амплификаторе ДНК.

При необходимости возможно проведение мультиплексной ПЦР для анализа нескольких важных фрагментов вставки, а также второго раунда ПЦР с внутренней парой праймеров (nested PCR) для повышения специфичности реакции.

Продукты амплификации анализируют с помощью электрофореза в пластине 6 %-ного полиакриламидного геля (2,5 ч при 200 в). ДНК-маркерами служит стандартный набор фрагментов ДНК плазмиды pBR322, полученный под действием рестриктазы Alu1. Окрашивание фрагментов ДНК осуществляется этидиум бромидом. Анализ результатов и фотографирование электрофореграммы осуществляют в условиях ультрафиолетовой подсветки на трансиллюминаторе. Допустимо анализ продуктов ПЦР производить путем электрофореза в 2 % агарозном геле с последующей видео- или фотодетекцией полученной на трансиллюминаторе картины. Фотоотпечатки или оттиски, выполненные на лазерном принтере с разрешением не менее 600 точек на дюйм, должны быть приложены к протоколу проведения испытаний.

5.1.2. Дополнительные методы идентификации генетического материала ГММ

Дополнительными и уточняющими методами идентификации генетической информации в штаммах ГММ являются рестрикционный анализ амплифицированных фрагментов ДНК, а также метод определения их нуклеотидной последовательности (секвенирование).

5.1.2.1. Аппаратура и инструментарий

Допускаются к использованию аппаратура и инструментарий производства различных отечественных и зарубежных фирм, прошедшие государственную регистрацию и разрешенные для использования в установленном порядке.

1. Спектрофотометр
2. Весы аналитические
3. Планшетный ридер (rider)
4. Планшетный вошер (wosher)
5. Прибор для проведения электрофореза
6. Прибор для проведения иммуноблоттинга
7. Источник тока
8. Термостатируемый шейкер
9. Центрифуга настольная типа «Эппендорф»
10. Холодильник бытовой
11. Компьютер, монитор, сканер, принтер
12. Пипетки многоканальные и одноканальные с переменным объемом.

5.1.2.2. Методы оценки экспрессии целевого гена

Оценка экспрессии встроенного целевого гена осуществляется на двух уровнях.

Первый уровень – транскрипционный. В этом случае определяется наличие в клетке ГММ и РНК, синтезируемой под контролем целевого гена. Второй уровень – трансляционный.

В этом случае определяется наличие белкового продукта определенной молекулярной массы и/или определенной иммунноспецифичности.

5.1.2.3. Определение иРНК, транскрибируемых с целевого гена методом обратной транскрипции – полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР)

1 мкг РНК, выделенной из клеток культуры ГММ, предварительно обработанной ДНКазой, отжигали с 10 пмоль одноцепочечного олигонуклеотида: 20 мин 65 °С и 10 мин при комнатной температуре. Затем проводили реакцию обратной транскрипции в общем объеме 20 мкл. Состав реакционной смеси: 1 мкг РНК с отожженным праймером, 50 мМ Трис-HCl, pH 8,3; 50 мМ KCl; 10 мМ $MgCl_2$; 10 мМ ДТТ; 1 мМ

каждого дезоксирибонуклеотидтрифосфата; 0,5 мМ спермидина; 1 Ед AMV ревертазы. Реакцию проводили 30 мин при 42 °С. Далее эту смесь анализировали с помощью полимеразной цепной реакции (методика проведения ПЦР описана в разделе 5.1.1).

5.1.2.4. Определение белка, экспрессируемого целевым геном ГММ, методом электрофоретического разделения в ПААГ – ДСН

Цель метода: Сравнительный анализ белкового состава и определение молекулярной массы полипептида, экспрессируемого целевым геном.

Для проведения анализа используют следующие оборудование и реактивы:

А. Электрофоретическая камера и источник питания (типа «Биорад» или аналоги);

Б. Реактивы (производства фирм, прошедших государственную регистрацию и разрешенных к использованию в установленном порядке):

1. Раствор 40\0,8 (40 % акриламида, 0,8 % бис-акриламида);
2. Раствор 20\0,3 (20% акриламида, 0,3% бис-акриламида);
3. Буфер разделяющего геля (БРГ), pH 8,8;
4. Буфер фокусирующего геля (БФГ), pH 6,8;
5. Электродный буфер, pH 8,3;
6. Буфер образца;
7. Раствор ДСН (додецилсульфат натрия) 10 %;
8. Раствор персульфата аммония 10 %;
9. Раствор для окраски гелей ERZ Blue;
10. Маркеры молекулярного веса.

Проведение электрофореза:

I. Приготовление гелевой пластинки

- вымыть части прибора в детергенте;
- промыть дистиллированной водой;
- смонтировать установку для заливки гелей;
- внести разделяющий гель, полимеризация 30 мин;
- наслоить фокусирующий гель и вставить гребенку, полимеризация 10 мин.

После полимеризации (10 мин) одномоментно удалить гребенку.

Гель можно хранить в полиэтилене, целлофане при температуре 4 °С; использовать в течение 4 дней.

II. Пробоподготовка

К образцу, содержащему ~1 мг\мл белка (по поглощению при 280 нм) добавить буфер образца, прогреть при 100 °С 5 минут.

III. Электрофорез

• поместить гелевую пластину в камеру;

• заполнить камеры буфером;

• нанести образцы микрошприцем;

• включить источник питания;

• условия: сила тока – 20 мА на пластину;

• образцы концентрируются на анодном конце, затем разделяются по молекулярной массе на основе эффекта молекулярного сита.

IV. Окраска геля

а) По окончании электрофореза, гель вынуть из кассеты, поместить в камеру для окраски. Окраска согласно протоколу, прилагаемому к реагенту ERZ Blue.

V. Хранение

Для консервации применяют высушивание геля между целлофановыми пленками.

Для сохранения данного изображения гель фотографируют в видимом спектре или сканируют.

5.1.2.5. Определение специфичности белка, экспрессируемого целевым геном ГММ методом иммуноблоттинга

Цель метода – идентификация экспрессируемого полипептида с помощью специфических моноклональных антител. Метод позволяет определять идентичность синтезируемого белка продукту целевого гена, указанного заявителем.

Для проведения анализа используют следующие оборудование и реактивы:

А. Электрофоретическая камера, камера для переноса и источник питания (типа «Биорад» или аналоги);

Б. Реактивы (производства фирм, прошедших государственную регистрацию и разрешенных к использованию в установленном порядке)

Проведение иммуноблоттинга

I. Перенос белков

После электрофоретического разделения образца в ПААГ-ДСН осуществляют перенос белков из пластин геля на нитроцеллюлозную мембрану методом электропереноса в «полусухой» буферной системе.

Для этого на нижний угольный электрод (анод) ячейки для переноса помещают 6 листов ватмана (№ 3), пропитанного раствором «С» (0,03 М Трис, 20 % изопропилового спирта, pH 10,0). Следующим слоем помещают PVDF-мембрану, затем накладывают пластину полиакриламидного геля с разделенными белками и 6 листов бумаги, пропитанной

раствором «А» (0,025 М Трис, 0,04 М ε-аминокапроновой кислоты, 20 % изопропилового спирта, 0,01 % додецилсульфата лития, pH 9,4), накладывают верхний электрод (катод) и плотно прижимают.

При сборке системы следят, чтобы между слоями не было пузырьков воздуха. Размер листов фильтровальной бумаги и нитроцеллюлозных фильтров должен соответствовать размеру геля. Перенос проводят при постоянном токе 100 мА в течение 1,5 часов при комнатной температуре.

II. Обработка мембраны

Для блокирования несвязавшихся с белками участков нитроцеллюлозы, мембрану после переноса инкубируют в 0,1 %-ном растворе Твин-20 в течение 10 минут при 37 °С, затем 30 мин в растворе 3 %-ного казеина или сухого молока.

Последующие стадии обработки фильтров включают:

- инкубацию с моноклональными антителами;
- с антивидовым иммунопероксидазным конъюгатом;
- окрашивание мембраны.

Условия инкубации на каждой стадии: 1 час на шейкере при 37 °С. После окончания каждой стадии инкубации фильтр трижды отмывают проточной водой и трижды 0,1 %-ным раствором Твин-20 в течение 10 мин. Проявление зон осуществляют субстратным раствором пероксидазы (β-хлорнафтол, диаминобензидин). Реакцию окрашивания останавливают промыванием мембраны в воде.

После высушивания окрашенные реплики сканируют.

5.1.2.6. Определение нуклеотидной последовательности ДНК

Нуклеотидную последовательность ДНК определяют по методу Sanger. Реакцию проводят по протоколу фирмы «Promega» в 3 стадии:

1. Радиомаркирование (кинирование) праймера

Реакция кинирования праймера проходит в объеме 10 мкл в следующих условиях: 50 мМ Tris-HCl, pH 7,5; 10 мМ $MgCl_2$; 5 мМ DTT; 0,1 мМ спермидина; 10 pmol праймера; 10 pM [γ^{32}P]dATP; 5 ед. Т4-полинуклеотидкиназы. Инкубировать 30 минут на 37 °С, затем активность фермента T4-Kinase останавливают повышением температуры до 90 °С в течение 2 минут.

2. Синтез меченых цепей методом ПЦР

Кинированный праймер используется для синтеза методом ПЦР меченых ^{32}P цепей ДНК разной длины, терминированных случайным включением ddNTP. Реакция проводится в 17,5 мкл в условиях: 50 мМ Tris-HCl, pH 9,0; 10 мМ $MgCl_2$; 1,5 pmol кинированного праймера; 40

fmol матричной ДНК; 5 ед. Taq-полимеразы. В заранее подготовленные 4 пробирки, содержащие ddNTP, 50 мМ NaCl, раскапывают по 4 мкл реакционной смеси, сверху наслаивают вазелиновое масло и проводят амплификацию. Реакция проходит в следующих условиях: плавление цепей – 95 °С – 0,5 мин; отжиг затравок – 42 °С – 0,5 мин; элонгация цепей ДНК – 70 °С – 1 минута. Продолжительность амплификации составляет 30 циклов. Останавливают реакцию добавлением 4 мкл буфера для нанесения (95 % формамид, 20мМ ЭДТА; 0,05 % бромфенолового синего и 0,05 % ксиленцианола FF).

3. Электрофорез

Полученные образцы прогревают 2 минуты при 70 °С и наносят на 6 % полиакриламидный денатурирующий гель. В каждый слот геля наносят по 3 мкл соответствующего образца. Электрофорез проводят при постоянном напряжении (25—30 V/cm) при температуре 55 °С. По окончании электрофореза проводят фиксирование геля в 10 %-ной уксусной кислоте, затем гель сушат 30 минут на стекле при температуре 60 °С. Экспонирование с рентгеновской пленкой «Кодак» проводят в течение 15—48 часов при комнатной температуре.

5.1.2.7. Рестрикционный анализ ампликонов

Рестрикционный анализ проводят с помощью гидролиза ДНК специфическими эндодезоксирибонуклеазами (рестриктазами) с последующим фракционированием в агарозном геле. Выбор рестриктаз определяется наличием специфических сайтов рестрикции в синтезированных ампликонов.

1. Гидролиз ДНК специфическими эндодезоксирибонуклеазами.

Для гидролиза ДНК рестриктазами используют буферные смеси с низкой, средней и высокой ионной силой, согласно рекомендациям фирм-производителей этих ферментов. Время инкубации составляет от 1 до 4 часов при 37 °С.

2. Фракционирование фрагментов ДНК методом электрофореза в агарозном геле.

Разделение фрагментов ДНК проводят методом электрофореза в горизонтальных агарозных гелях с концентрацией агарозы от 0,8 до 3 %. Электрофорез проводят при комнатной температуре в трис-ацетатном буфере (0,04 М трис-ацетат pH 8,1, 0,002 М ЭДТА) с содержанием 0,5 мкг/мл бромистого этидия, при напряженности электрического поля 10 В/см в течение 30—60 мин. Гели с разделенными фрагментами фотографируют в УФ-свете на пленку «Микрат-300» с использованием оранжевого светофильтра или осуществляют видеодетекцию

полученной на трансиллюминаторе картины. Фотоотпечатки или оттиски, выполненные на лазерном принтере с разрешением не менее 600 точек на дюйм, должны быть приложены к протоколу проведения испытаний.

5.1.3. Методы оценки экспрессии целевого гена

Оценка экспрессии встроенного целевого гена осуществляется на двух уровнях. Первый уровень – транскрипционный. В этом случае определяется наличие в клетке ГММ иРНК, синтезируемой под контролем целевого гена. Второй уровень – трансляционный. В этом случае определяется наличие белкового продукта определенной молекулярной массы и/или определенной иммуноспецифичности.

Определение иРНК, транскрибируемых с целевого гена методом обратной транскрипции-полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР).

1 мкг РНК, выделенной из клеток культуры ГММ, предварительно обработанной ДНКазой, отжигали с 10 пмоль одноцепочечного олигонуклеотида: 20 мин 65 °С и 10 мин при комнатной температуре. Затем проводили реакцию обратной транскрипции в общем объеме 20 мкл. Состав реакционной смеси: 1 мкг РНК с отожженным праймером; 50 мМ трис-HCl pH 8,3; 50 мМ KCl; 10 мМ $MgCl_2$; 10 мМ ДТТ; 1 мМ каждого дезоксирибонуклеотидтрифосфата, 0,5 мМ спермидина, 1 Ед AMV ревертазы. Реакцию проводили 30 мин при 42 °С. Далее эту смесь анализировали с помощью полимеразной цепной реакции (методика проведения ПЦР описана в разделе 5.1.1).

Электрофорез белка, экспрессируемого целевым геном ГММ, в ПААГ в присутствии ДСН (PAGE-SDS)

Цель метода: определение молекулярного веса состава белка.

Для проведения анализа используют следующие оборудование и реактивы:

А. Электрофоретическая камера и источник питания.

Б. Реактивы:

1. Раствор 40\0,8 (40 % акриламида, 0,8 % бис-акриламида).
2. Раствор 20\0,3 (20 % акриламида, 0,3 % бис-акриламида).
3. Буфер разделяющего геля (БРГ), pH 8,8 доводить концентрированной HCl (1,8 мл).
4. Буфер фокусирующего геля (БФГ), pH 6,8 доводить концентрированной HCl (1 мл).
5. Электродный буфер, pH 8,3 ДСН (SDS) – 4,0 г.
6. Раствор ДСН (SDS) 10 %.
7. Раствор персульфата аммония 10 %.

8. Раствор для окраски гелей ERZ Blue.

Проведение электрофореза:

I. Приготовление гелевой пластинки

• вымыть части прибора в детергенте;

• ополоснуть дистиллированной водой;

• смонтировать установку;

• внести разделяющий гель, полимеризация 30 мин;

• наслоить фокусирующий гель и вставить гребенку.

После полимеризации (10 мин) одномоментно удалить гребенку.

Гель можно хранить в полиэтилене, целлофане при температуре 4 °С; использовать в течение 4 дней.

II. Пробоподготовка

К образцу, содержащему ~1 мг\мл белка (по поглощению при 280 нм) добавить буфера образца с дитиотрейтолом, инкубировать при 100 °С 3 минуты.

III. Электрофорез

• поместить гелевую пластину в камеру;

• заполнить камеры буфером;

• нанести образцы микрошприцем;

• включить источник питания;

• условия: ток – 20 мА на пластину;

• Образцы концентрируются на анодном конце, затем разделяются по молекулярному весу на основе эффекта молекулярного сита.

IV. Окраска

а) По окончании электрофореза, гель вынуть из кассеты, поместить в камеру для окраски. Окраска согласно протоколу, прилагаемому к реагенту ERZ Blue.

V. Хранение

Для консервации применяют высушивание геля между целлофановыми пленками.

Для сохранения данного изображения гель фотографируют в видимом спектре или сканируют.

Иммуноблоттинг (Western-blotting Immunoassay)

Метод иммуноблотинга позволяет с помощью специфических моноклональных антител, определять идентичность синтезируемого белка продукту целевого гена, указанного заявителем.

После электрофоретического разделения в ПААГ-ДСН (PAGE-SDS) белки переносят из пластин геля на нитроцеллюлозную мембрану методом электропереноса в «полусухой» буферной системе.

Для этого на нижний угольный электрод (анод) ячейки для переноса помещают 6 листов фильтровальной бумаги (W№ 3), пропитанной раствором «С» (0,03 М Трис, 20 % изопропилового спирта, pH 10,0). Следующим слоем помещают нитроцеллюлозную мембрану ВА 85, затем накладывают пластину полиакриламидного геля с разделенными белками и 6 листов бумаги, пропитанной раствором «А» (0,025 М Трис, 0,04 М ε-аминокапроновой кислоты, 20 % изопропилового спирта, 0,01 % додецилсульфата лития, pH 9,4), накладывают верхний электрод (катод) и плотно прижимают.

При сборке системы следят, чтобы между слоями не было пузырьков воздуха. Размер листов фильтровальной бумаги и нитроцеллюлозных фильтров должен соответствовать размеру геля. Перенос проводят при постоянном токе 100 мА в течение 1,5 часов при комнатной температуре.

Обработка мембраны.

Для блокирования не связавшихся с белками участков нитроцеллюлозы, мембрану после переноса инкубируют в 0,1 %-ном растворе Твин-20 в течение 10 минут при 37 °С, затем 30 мин в растворе 3 % казеина.

Последующие стадии обработки фильтров включают:

- инкубацию с моноклональными антителами (поликлональными антителами);
- с антивидовым иммунопероксидазным конъюгатом;
- окрашивание мембраны.

Условия инкубации на каждой стадии: 1 час на шейкере при 37 °С. После окончания каждой стадии инкубации фильтр трижды отмывают проточной водой и трижды 0,1 %-ным раствором Твин-20 в течении 10 мин. Проявление зон осуществляют субстратным раствором пероксидазы (β-хлорнафтол, диаминобензидин). Реакцию окрашивания останавливают промыванием мембраны в воде.

После высушивания окрашенные реплики сканируют.

5.2. Определение ДНК ГММ в готовых продуктах питания

Полная микробиологическая и молекулярно-генетическая, медико-биологическая и технологическая оценка ГММ проводится для пищевых продуктов 1 группы (см. п. 3.4 настоящих МУК). Такая оценка предусматривает наряду с анализом документации как исследования культур ГММ (таксономии и свойств доноров, реципиентов, самих ГММ, последовательностей генных вставок, наличия биомаркеров и т. д.), так и продуктов с ГММ.

Для продукции, относимой ко второй группе (само по себе длительное использование которой в питании населения без вреда для здоровья является одним из свидетельств безопасности), основными подходами могут быть микробиологическая и молекулярно-генетическая оценка образцов готовых продуктов (идентификация ДНК генной вставки, наличие селективных маркеров или маркеров генной модификации [векторных генов, линкеров и т. п.; либо комплексная фено- и генотипическая идентификация выделенного из продукта ГММ*] и/или экспертиза документации.

Стандартно принятыми методами для определения наличия чужеродного генетического материала в продуктах являются иммунологический анализ и выявление ДНК ГММ при помощи ПЦР.

Критерием в пользу выбора ПЦР как метода анализа является высокая чувствительность метода, превосходящая как минимум на два порядка чувствительность известных иммунологических методов. Помимо этого, ПЦР является гораздо менее дорогим и более стабильным методом, чем другие методы анализа. Немаловажным достоинством ПЦР является то, что используемые в реакции синтетические олигонуклеотиды при правильном их выборе могут быть применены для проведения анализов различных ГММ, что в случае иммунологических методов невозможно.

5.2.1. ПЦР-идентификация ДНК ГММ в готовых продуктах питания

5.2.1.1. Выделение ДНК ГММ из тестируемого продукта

В выборе метода выделения ДНК определяющую роль играет содержание жиров в продуктах питания. При повышенном содержании жиров проводится дополнительная экстракция суспензией неполярных растворителей с водой. Это позволяет перевести содержащуюся в пищевом продукте ДНК в водную фазу, в которой и производится дальнейшая очистка.

Обычная длина ПЦР фрагмента при выявлении ДНК ГММ не превышает 1 000 пар оснований, поэтому в основу нижеследующих методик легли процедуры выделения и очистки, позволяющие получить достаточно чистые препараты ДНК для проведения ПЦР. Вторым критерием отбора методик явилось требование минимизации времени, затрачиваемого на выделение одного препарата ДНК.

1. 0,5 г образца пищевого продукта гомогенизируют при помощи тефлонового пестика в 0,5 мл буфера А (100 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM NaCl, 10 мМ β-меркаптоэтанола.

---

* При экспертизе продуктов, содержащих жизнеспособные ГММ.

2. После гомогенизации добавляют 100 мкл 20 % SDS. Смесь тщательно перемешивают и инкубируют 20—30 мин при 65 °С.

3. Охлаждают до 4 °С, добавляют 0,3 мл 5 М ацетата калия, перемешивают в вортексе и центрифугируют 10 мин при 15 000 об./мин при комнатной температуре.

4. К надосадку добавляют 1 мл смолы Wizard MaxiPreps и инкубируют смесь 10 мин при 25 °С.

5. Затем фильтруют полученную смесь сквозь мини-колонку, промывают 2 мл 80 %-ного изопропанола, центрифугируют (15 000 об./мин, 2 мин) и удаляют оставшийся в мини-колонке изопропанол .

6. Добавляют в мини-колонку 50 мкл дистиллированной воды, подогретой 65 °С.

7. Инкубируют мини-колонку с водой 10 мин при 65 °С, центрифугируют (15 000 об./мин, 2 мин) и переносят раствор ДНК в чистую стерильную пробирку.

В зависимости от содержания ДНК в конкретном пищевом продукте на проведение единичной полимеразно-цепной реакции в объеме 50 мкл требуется от 2 до 20 мкл полученного препарата ДНК.

Образцы пищевых продуктов с повышенным содержанием масла перед выделением ДНК требуется подвергнуть дополнительной экстракции эмульсией хлороформа в воде.

Для этого 0,5 г исследуемого продукта гомогенизируют в смеси 0,5 мл буфера А и 0,5 мл хлороформа и инкубируют гомогенат 20 мин при 56 °С. Затем охлаждают его до 4 °С и центрифугируют 10 мин при 15 000 об./мин на микроцентрифуге при комнатной температуре. Водную фазу собирают и переносят в чистую пробирку. Далее продолжают, начиная с пункта 2 вышеизложенной методики.

5.2.1.2. Выбор праймеров для проведения ПЦР

Для точного определения наличия ДНК вставки в штаммах ГММ фирмой-заявителем должна быть представлена информация о нуклеотидной последовательности целевого гена и его регуляторных элементов, а также о структурных элементах и маркерах вектора .

Это требование вводится для того, чтобы можно было точно идентифицировать наличие конкретной генетической конструкции. В таком случае синтетические олигонуклеотиды для проведения ПЦР будут синтезированы таким образом, чтобы выявить факт наличия генетических модификаций. Длина используемых при анализе специфических праймеров должна составлять не менее 20 пар нуклеотидов с целью избежания появления в результате ПЦР неспецифических продуктов реакции.

В случае, когда подобная информация по каким-то причинам не может быть представлена (например, фирма-изготовитель продуктов питания закупает используемые в технологическом процессе штаммы микроорганизмов у специализированного производителя) необходимо проводить проверку на присутствие в выделяемой из тестируемой продукции ДНК наборами праймеров, позволяющими подтвердить видовую идентификацию штамма и выявить наличие возможных генетических модификаций. Рекомендуемые стратегии выявления генетических модификаций предлагают использовать для этих целей наиболее часто употребляемые векторные последовательности: селективные гены (гены антибиотико-резистентности, бактериоцинов или ауксотрофные селективные маркеры), неэкспрессируемые последовательности (полилинкеры, промоторы или терминаторы), а также последовательности мигрирующих элементов. Обнаружение таких последовательностей будет свидетельствовать о возможных незадокументированных генетических модификациях, что потребует проведения дополнительных исследований, подтверждающих или опровергающих это предположение.

5.2.1.3. Выбор условий проведения ПЦР

Для ПЦР-анализа ДНК, выделенной из продуктов питания, подбираются оптимальные условия проведения реакции для каждой конкретной пары праймеров, обеспечивающие максимальную чувствительность и специфичность анализа, исключающую наличие перекрестных реакций с неспецифическими ДНК.

Выбор условий проведения ПЦР включает подбор оптимального соотношения компонентов реакционной смеси, структуры программы амплификации (временных и температурных характеристик каждого этапа амплификации) и адекватного метода детекции результатов.

5.2.1.4. Проведения ПЦР

Для проведения ПЦР используется термостабильная Taq-полимераза, соответствующий ей десятикратный ПЦР-буфер, растворы четырех дезоксирибонуклеотитрифосфатов и выбранной пары праймеров. В типичных экспериментах реакционную смесь объемом 50 мкл составляют так, чтобы она содержала 350 нг геномной ДНК, 1,5 мМ каждого из четырех дезоксирибонуклеотидтрифосфатов, 1 ед. Taq-полимеразы. Затем к реакционной смеси добавляют 30 пкМ пары олигонуклеотидных праймеров в буферном растворе следующего состава: 67 мМ Трис-HCl буфер (pH 8,0 при 25 °C), содержащий 16,6 мМ сульфат аммония, 67 мМ MgCl, 10 мМ 2-меркапто-этанол, 6,7 мкМ ЭДТА и бычий сывороточный альбумин в концентрации 170 мкг/мл. Далее на каждую пробу

наслаивают по 50 мкл минерального масла и реакцию проводят по специально подобранным программам в многоканальном амплификаторе ДНК.

При необходимости возможно проведение мультиплексной ПЦР для анализа нескольких важных фрагментов вставки, а также второго раунда ПЦР с внутренней парой праймеров (nested PCR) для повышения специфичности реакции.

Продукты амплификации анализируют с помощью электрофореза в пластине 6 %-ного полиакриламидного геля (2,5 ч при 200 в). ДНК-маркерами служит стандартный набор фрагментов ДНК плазмиды pBR322, полученный под действием рестриктазы Alu 1. Окрашивание фрагментов ДНК осуществляется этидиум бромидом. Анализ результатов и фотографирование электрофореграммы осуществляют в условиях ультрафиолетовой подсветки на трансиллюминаторе. Допустимо анализ продуктов ПЦР производить путем электрофореза в 2 %-ном агарозном геле с последующей видео- или фотодетекцией, полученной на трансиллюминаторе картины. Фотоотпечатки или оттиски, выполненные на лазерном принтере с разрешением не менее 600 точек на дюйм, должны быть приложены к протоколу проведения испытаний.

Приложение

Термины и определения

Пищевые продукты – продукты в натуральном или переработанном виде, употребляемые человеком в пищу (в т. ч. продукты детского питания, продукты диетического питания), бутылированная питьевая вода, алкогольная продукция (в т. ч. пиво), безалкогольные напитки, жевательная резинка, а также продовольственное сырье, пищевые добавки и биологически активные добавки.

Продовольственное сырье – сырье растительного, животного, микробиологического, минерального и искусственного происхождения и вода, используемые для изготовления пищевых продуктов.

Качество пищевых продуктов – совокупность характеристик пищевых продуктов, способных удовлетворять потребности человека в пище при обычных условиях их использования.

Безопасность пищевых продуктов – состояние обоснованной уверенности в том, что пищевые продукты при обычных условиях их использования не являются вредными и не представляют опасности для здоровья нынешнего и будущих поколений.

Удостоверение качества и безопасности пищевых продуктов – документ, в котором изготовитель удостоверяет соответствие качества и безопасности каждой партии пищевых продуктов требованиям нормативных, технических документов.

Нормативные документы – государственные стандарты, санитарные и ветеринарные правила и нормы, устанавливающие требования к качеству и безопасности пищевых продуктов, контролю за их качеством и безопасностью, условиям их изготовления, хранения, перевозок, реализации и использования, утилизации или уничтожения некачественных, опасных пищевых продуктов, материалов и изделий.

Технические документы – документы, в соответствии с которыми осуществляются изготовление, хранение, перевозка и реализация пищевых продуктов, материалов и изделий (технические условия, технологические инструкции, рецептуры и др.).

Генная инженерия – совокупность методов и технологий, в т. ч. технологий получения рекомбинантных рибонуклеиновых и дезоксирибонуклеиновых кислот, по выделению генов из организма, осуществлению манипуляций с генами и введению их в другие организмы.

Генно-инженерная деятельность – деятельность, осуществляемая с использованием методов генной инженерии и генно-инженерно-модифицированных (генно-модифицированных) организмов.

Генетически модифицированный организм (ГМО) – организм или несколько организмов, любые неклеточные, одноклеточные или многоклеточные образования, способные к воспроизводству или передаче наследственного генетического материала, отличные от природных организмов, полученные с применением методов генной инженерии и содержащие генно-инженерный материал, в т. ч. гены, их фрагменты, или комбинацию генов.

Генетически модифицированный микроорганизм (ГММ) – микроорганизмы (бактерии, дрожжи и др.), в которых генетический материал (дезоксирибонуклеиновая кислота) изменен с использованием методов генной инженерии.

Библиографические данные

1. Руководство по методам анализа качества и безопасности пищевых продуктов /Под ред. И. М. Скурихина и В. А. Тутельяна —М.: «Брандес – Медицина», 1998.

2. ФАО/ВОЗ Стратегии оценки безопасности пищевых продуктов, полученных с помощью биотехнологии //Материалы объединенного совещания ФАО/ВОЗ по оценке биотехнологических методов производства и переработки пищевых продуктов с точки зрения их безопасности. Женева. Швейцария, 1990.

3. FAO/WHO Protein quality evaluation, Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation Held in Bethesda, Md, USA, 4—8 December, 1989, FAO Rome.

4. FAO/WHO Biotechnology and food safety, Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation, 1996. UN Food and Agriculture Organization, Rome.

5. ILSI Safety assassment of viable genetically modified microorganisms used in food, ILSI Europe Workshop on the Safety Assessment of Viable GMM, Microbial ecology in health and desiase, 1999, 11: 198—207.

6. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование.—М.: Из-во «Мир», 1984.

7. Остерман Л. А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот: Наука, 1985.

8. Laemmly U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 //Nature, 1970.—V. 227.—P. 680—685.

9. Blum H., Beir H., Cross H. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels //Electrophoresis, 1987.—V. 8.—P. 126—129.

10. Ohnashi T. et al. Preparative hight-yield electroelution of proteins offer separation by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and its application to analysis of aminoacid sequences and to riseantibodyes //J.Chromatogr., 1991.—V. 585.—P. 153—159.

11. Towbin H., Staehelin T., Gordon J., Jordan J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: prosedure and some applications //Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1979.—V. 79.—P. 4350—4354.

12. Bredford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograme quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding //Anal. Biochem., 1976.—V. 72.

13. MacCormick C. A., Griffin H. G., Underwood H. M., Gasson M. J. Common DNA sequences with potential for detection of genetically manipulated organisms in food //J. Appl Microbiol, 1998, 84, 969—980.

14. Gasson M. Genetic manipulation of dairy cultures //Bulletin of the IDF 1997, 320: 41—44.

15. Koning W. N. et al Lactic acid bacteria: the bugs of the new millennium //Curr. Opin. Microbiol., 200, 3(3):276—282.

16. Pridmore R. D. et al Genomics, molecular genetics and the food industry //J. Biotechnol., 2000, 78, 3, 251—258.

17. Romanos M. A., Scorer C. A., Clare J. J. Foreign gene expression in yeast: a review //Yeast, 1992, 8, 423—488.

18. McKay L. L. Update. on dairy starter cultures: genetics and biotechnology of dairy streptococci. In: Proceedings of the ILSI International seminar on biotechnology, Tokyo, 1988.

19. Lindemann J. Biotechnology in food: a summary of major issues regarding safety assurance //Regular Toxilogy and Farmacology, 1990, 12: 96—104.

20. Holst-Jensen A., Sissel B. R., Lovseth A., Berdal K. G. PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs) //Ann. Bioannal. Chem., 2003, 375: 985—993.

21. Методические указания по определению остаточных количеств антибиотиков в продуктах животноводства. Утв. МЗ СССР 29.06.84 № 3049/84.—М., 1985.

22. AOAC Official methods of analysis, AOAC International, 1996.—V. 2, chapter 33, 45, 48.

23. Теоретические и клинические аспекты науки о питании /Под ред. Волгарева М. Н.—Т. 8, 1987.—210 с.

24. Госфармакопея СССР ГФ.—Т. 2, 1990.

25. Трахтенберг И. М., Сова Р. Е., Шефтель В. О., Оникиенко Ф. А. Показатели нормы у лабораторных животных в токсикологическом эксперименте.—М.: Медицина, 1978.

26. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник /Под редакцией Меньшикова В. В.—М.: Медицина, 1987.

27. Тиц Н. Энциклопедия клинических лабораторных тестов.—М.: Лабинформ, 1997.

28. Транхтенберг И. М., Сова Р. Е., Шефтель В. О., Оникиенко Ф. А. Показатели нормы у лабораторных животных.—М.: Медицина, 1978.

29. Фонштейн Л. М., Абилев С. К., Бобринев Е. Ф. и др. Методы первичного выявления генетической активности загрязнителей среды с помощью бактериальных тест-систем: Методические указания.—М., 1985.—34 с.

30. Kaufman P. B., Wu W., Kim D., Cseke L. J. Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine: CRC Press, 1995.

31. Гринберг К. Н., Кухаренко В. И., Ляшко В. Н., Терехов С. М., Пичугина Е. М., Фрейдин М. И., Черников В. Г. /В кн.: Методы культивирования клеток.—Л.: Изд-во «Наука», 1988.—С. 250—257.

gost.e-ecolog.ru