

Metodických pokynů k provádění kontrol uzavřeného prostoru, kde se nakládá s geneticky modifikovanými mikroorganismy

K § 15 odst. 3 zákona č. 78/2004 Sb., o nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty

Komplexní kontrolu uzavřeného prostoru, kde se nakládá s geneticky modifikovanými mikroorganismy (GMM), je doporučeno provádět 1x za 6 měsíců a dále po případných mimořádných událostech nebo získání nových informací o rizicích uzavřeného nakládání s používanými GMM. (Systém a četnost kontrol musí být uvedeny v provozním řádu pracoviště.) Je třeba kontrolovat:

1. Vedení dokumentace

K § 19 písm. b) zákona č. 78/2004 Sb., a § 8 vyhlášky č. 209/2004 Sb., o bližších podmínkách nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty

Základním dokumentem pro pracoviště, kde se nakládá s GMO je **kopie oznámení o nakládání s GMO s přílohami** a příslušné **ev. potvrzení o oprávněnosti nakládat s GMO**. Potvrzení se předkládá kontrole z ČIZP a kopie se přikládá k podání projektů grantovým agenturám, které to vyžadují. Číslo jednací MŽP **Oznámení** se uvádí v korespondenci, je-li třeba doložit oprávnění nakládat s GMO.

Přílohy Oznámení:

Hodnocení rizika

Provozní řád

Havarijní plán

Požadavky na uzavřený prostor (srovnávací tabulka)

Dalšími povinnými dokumenty jsou:

Provozní deník

Potvrzení o pravidelném ročním školení zaměstnanců

Roční hlášení o uzavřeném nakládání s GMO

Přehled: Kontrola dokumentů pro uzavřené nakládání s GMM

2. Opatření v uzavřeném prostoru

Přehled: Kontrola opatření v místnostech, kde probíhá uzavřené nakládání s GMM

3. Přítomnost GMM

Postupy detekce přítomnosti geneticky modifikovaných mikroorganismů

Zjišťování kontaminace vzduchu

Metoda slouží k monitorování úniku GMM do prostoru. Tuto kontrolu se doporučuje provádět 1x za 6 měsíců, a dále po každé mimořádné události. Provádí se rozložením otevřených Petriho misek s agarovým médiem v uzavřeném prostoru. Půda v agarových miskách má být svým složením specifická pro testované mikroorganismy, s nimiž se pracuje, a u kterých nastala možnost úniku. Je vhodné použít medium obsahující antibiotikum, které selektuje modifikované mikroorganismy s příslušným rezistenčním markerem (signálním genem). Misky s agarovým

mediem se otevřeně položí do uzavřeného prostoru. Po 15 minutách se opět přikryjí a nechají inkubovat v termostatu při teplotě vhodné pro růst hledaných mikroorganismů (např. na 37 °C nebo 30 °C) po dobu 3 dnů. V případě nárůstu kolonií se postupuje podle hodnocení rizika příslušného nakládání. Je třeba provést důkladnou dezinfekci ploch alternativními dezinfekčními prostředky a dezinfekci prostoru ozařováním germicidní UV-lampou po dobu 1 hodiny, případně přes noc.

V případě opakovaného nárůstu kolonií v prostoru, kde probíhá nakládání s GMM 2. kategorie rizika, je třeba testovat mikrobiální izoláty vzrostlé na Petriho miskách pomocí metody PCR s použitím vhodných primerů. V případě pozitivní PCR je třeba dosáhnout účinné inaktivace detegovaného GMM.

Zjišťování kontaminace povrchů stěrovou metodou

Metoda se provádí setřením sledovaného povrchu sterilní gázou a následným rozetřením stěru na Petriho misky s vhodným agarovým médiem (stejně jako při zjišťování kontaminace vzduchu). V případě nárůstu kolonií se postupuje stejně jako při zjišťování kontaminace vzduchu.

Detekce GMO pomocí polymerasové řetězové reakce (PCR)

V krajním případě, kdy nelze identifikovat přežívající mikroorganismy, se provádí jejich detekce pomocí metody PCR. Amplifikované úseky DNA lze dále přesně charakterizovat sekvenováním a porovnáváním se sekvencí předpokládaného modifikovaného úseku v GMM.

Vzor testu přítomnosti modifikované DNA s využitím PCR:

Složení reakční směsi a program automatického cyklu:

Složka	Objem
Extrakt testovaného vzorku	1 µl
10x konc. pufr pro DNA polymerasu	5 µl
dNTP (20mM)	1 µl
Oligonukleotid 1	1 µl (50 pmol)
Oligonukleotid 2	1 µl (50 pmol)
Pfu polymerasa	1 µl
voda destilovaná	40 µl

Číslo cyklu	Počet cyklů	Teplota (°C)	Čas (s)
1	1	94	120
2	30	94	30
		50	30
		72	60
		72	300

10 µl produktu se vizualizuje a zkoumá pomocí elektroforetické analýzy. Amplifikovaný úsek DNA lze případně charakterizovat sekvenováním.

Přehledy:

Kontrola přítomnosti GMM při nakládání 1. kategorie

Kontrola přítomnosti GMM při nakládání 2. Kategorie