

Věstník MŽP ČR, částka 1/2017

Příloha č. 7

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 médiem se otevřené 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 cyklem:

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
3	1	72	300

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

EPI S