

**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**
(Минсельхоз России)

П Р И К А З

от 30 октября 2020 г.

№ 655

Москва

Об утверждении Методики производства молекулярно-генетического исследования генно-инженерно-модифицированных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения, используемых для разведения и (или) выращивания на территории Российской Федерации, Методики производства экспертиз (исследований) биологической безопасности генно-инженерно-модифицированных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения, используемых для разведения и (или) выращивания на территории Российской Федерации

В соответствии с пунктом 13 Правил государственной регистрации генно-инженерно-модифицированных организмов, предназначенных для выпуска в окружающую среду, а также продукции, полученной с применением таких организмов или содержащей такие организмы, включая указанную продукцию, ввозимую на территорию Российской Федерации, утвержденных постановлением Правительства Российской Федерации от 23 сентября 2013 г. № 839 (Собрание законодательства Российской Федерации, 2013, № 39, ст. 4991), п р и к а з ы в а ю:

1. Утвердить:

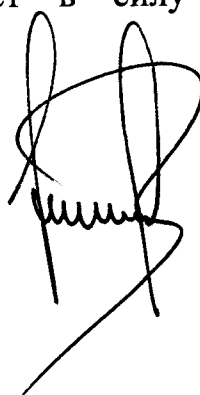
Методику производства молекулярно-генетического исследования генно-инженерно-модифицированных микроорганизмов сельскохозяйственного

назначения, используемых для разведения и (или) выращивания на территории Российской Федерации, согласно приложению № 1 к настоящему приказу;

Методику производства экспертиз (исследований) биологической безопасности генно-инженерно-модифицированных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения, используемых для разведения и (или) выращивания на территории Российской Федерации, согласно приложению № 2 к настоящему приказу.

2. Настоящий приказ вступает в силу с 1 марта 2021 г. и действует до 1 марта 2027 г.

Министр

A handwritten signature in black ink, consisting of several loops and a long horizontal stroke at the bottom, identifying the official as D.N. Patrushev.

Д.Н. Патрушев

М Е Т О Д И К А
производства молекулярно-генетического исследования
генно-инженерно-модифицированных микроорганизмов
сельскохозяйственного назначения, используемых для разведения
и (или) выращивания на территории Российской Федерации

1. Настоящая Методика устанавливает порядок проведения молекулярно-генетического исследования генно-инженерно-модифицированных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения, используемых для разведения и (или) выращивания на территории Российской Федерации (далее – исследование, ГММ соответственно).

2. Исследование проводится организацией (испытательной лабораторией), аккредитованной в национальной системе аккредитации в области аккредитации, соответствующей исследованиям, указанным в настоящей Методике.

3. Результаты исследования оформляются заключением о результатах исследования, составляемым на основании протоколов испытаний, которое должно содержать следующие сведения:

наименование заключения;

полное наименование и адрес в пределах места нахождения организации (испытательной лаборатории), осуществившей проведение исследования;

наименование ГММ с указанием его таксономического статуса;

полное наименование, адрес в пределах места нахождения, идентификационный номер налогоплательщика юридического лица, осуществляющего на территории Российской Федерации генно-инженерную деятельность в целях создания ГММ (далее – заявитель);

полное наименование и адрес в пределах места нахождения юридического лица либо фамилия, имя, отчество (при наличии), адрес места жительства индивидуального предпринимателя — изготовителя образцов ГММ, представленных для проведения исследования;

вид предполагаемого целевого использования ГММ;

сведения о трансформационном событии в виде кода, сформированного согласно Общероссийскому классификатору трансформационных событий;

место депонирования и коллекционный номер штамма ГММ (указывается для депонированных ГММ);

регистрационный номер свидетельства о государственной регистрации ГММ, предназначенного (предназначенных) для выпуска в окружающую среду, на основе которого (которых) создан ГММ, в отношении которого проведено исследование (в случае если ГММ создан на основе иного (иных) ГММ);

регистрационный номер свидетельства о государственной регистрации ГММ для иного целевого использования (при наличии);

сведения о регистрации ГММ за рубежом (при наличии);

оценка полноты представленных заявителем документов и данных;

краткое содержание документов и данных, представленных заявителем для проведения исследования;

описание представленных заявителем для проведения исследования образцов ГММ и исходного микроорганизма-реципиента с указанием их количества, а также оценка их пригодности для проведения исследования;

перечень исследований ГММ с указанием их результатов;

выводы о результатах исследования: о молекулярно-генетической структуре ГММ, об отсутствии или наличии незаявленных генетических конструкций; об эффективности метода идентификации ГММ; сведения

о соответствии генетической модификации природным (естественным) процессам;

фамилии, имена, отчества (при наличии) лиц, проводивших исследование, ученые степени, ученые звания (при наличии), места их работы и должности;

дата и номер заключения исследования;

подпись руководителя организации (испытательной лаборатории), осуществившей проведение исследования.

4. К заключению о результатах исследования ГММ должны прилагаться протоколы испытаний, на основании которых оно составлено, подписанные лицами, проводившими исследования.

5. В случае если заявителем не представлены документы и данные, предусмотренные пунктом 6 настоящей Методики, и (или) необходимые образцы, пригодные для проведения исследований, исследование не проводится. Заявителю должен быть выдан мотивированный отказ в проведении исследования, подписанный руководителем организации (испытательной лаборатории), аккредитованной в национальной системе аккредитации в области аккредитации, соответствующей исследованиям, указанным в настоящей Методике, в которую обратился заявитель для проведения исследования.

6. В рамках исследования осуществляется рассмотрение представленных заявителем документов и данных:

а) наименования ГММ с указанием его таксономического статуса; полного наименования и адреса в пределах места нахождения, идентификационного номера налогоплательщика заявителя; полного наименования и адреса в пределах места нахождения юридического лица либо фамилии, имени, отчества (при наличии), адреса места жительства индивидуального предпринимателя – изготовителя образцов ГММ, предоставленных на исследование; вида предполагаемого целевого использования ГММ; регистрационного номера свидетельства

о государственной регистрации ГММ, предназначенного (предназначенных) для выпуска в окружающую среду, на основе которого (которых) создан ГММ, в отношении которого проводится исследование (в случае если ГММ создан на основе иного (иных) ГММ); регистрационного номера свидетельства о государственной регистрации ГММ для иного целевого использования (при наличии) либо информации об отсутствии такого свидетельства;

б) сведений об исходном микроорганизме-реципиенте (таксономическая характеристика с указанием метода идентификации; источник выделения штамма: субстрат, географический пункт, дата выделения; методы идентификации штамма, кем идентифицирован (фамилия, имя, отчество (при наличии), ссылка на использованные определители);

в) сведений о трансформационном событии в виде кода, сформированного согласно Общероссийскому классификатору трансформационных событий;

г) информации о месте депонирования и коллекционном номере штамма ГММ, паспорта штамма ГММ (для депонированных штаммов ГММ) либо следующей информации (в случае непредставления информации о месте депонирования и коллекционном номере штамма ГММ, паспорта штамма ГММ):

о культурально-морфологических, физиолого-биохимических (ферментативных), антигенных, биологических свойствах и генетических особенностях штамма ГММ;

об условиях культивирования: наименованиях питательных сред, pH среды, температуре и продолжительности выращивания, сроке хранения и периодичности пересева культуры штамма ГММ в нативной форме;

о применяемом способе и условиях хранения штамма ГММ: в случае лиофилизации указываются продолжительность выращивания на питательной среде (возраст культуры), состав защитной среды, титр

клеточной суспензии, режим высушивания, температура хранения, срок хранения; в случае криоконсервации указываются продолжительность выращивания на питательной среде (возраст культуры), состав защитной среды, титр клеточной суспензии, скорость замораживания (град/мин), температура хранения, срок хранения;

о диссоциации культуры в зависимости от метода хранения (описание морфологических типов колоний на конкретной среде с подробным описанием типа, сохраняющего полезный или диагностический признак);

о среде, на которой заявителем предоставляется штамм ГММ;

о количестве, дате приготовления и сроке годности образцов штамма ГММ;

д) описания структуры генетической конструкции (внесенной или удаленной) и места ее локализации, характеристики экспрессии встроенных или измененных генов;

е) информации о генетической модификации (описание метода модификации, структуры вектора, структуры вставки);

ж) информации об организмах – донорах вносимых генов (с указанием группы патогенности при наличии);

з) описания методики, позволяющей идентифицировать генетическую модификацию с описанием нуклеотидных последовательностей, используемых праймеров, зондов и условий полимеразной цепной реакции (далее – ПЦР);

и) информации о регистрации ГММ за рубежом (при наличии);

к) данных полногеномного секвенирования ГММ (при наличии).

Заявителем для исследования предоставляются образцы ГММ и исходного микроорганизма-реципиента.

7. В рамках исследования должны быть проведены следующие испытания представленных заявителем образцов ГММ и исходного микроорганизма-реципиента:

а) проверка (валидация) методики идентификации ГММ, в том числе оценка чувствительности и специфичности данной методики в соответствии с критериями эффективности, указанными в таблице № 1 приложения к настоящей Методике;

б) подтверждение присутствия (отсутствия) заявленной генетической модификации в геноме ГММ;

в) полногеномное секвенирование ГММ (в случае непредставления заявителем данных полногеномного секвенирования ГММ, проведенного с использованием методики полногеномного секвенирования, соответствующей критериям эффективности, указанным в таблице № 2 приложения к настоящей Методике).

8. Полногеномное секвенирование ГММ проводится с использованием методики полногеномного секвенирования, соответствующей критериям эффективности, указанным в таблице № 2 приложения к настоящей Методике.

Приложение
к Методике производства
молекулярно-генетического
исследования генно-
инженерно-модифицированных
микроорганизмов
сельскохозяйственного
назначения, используемых для
разведения и (или)
выращивания на территории
Российской Федерации,
утвержденной приказом
Минсельхоза России
от 30 октября 2020 г. № 655

**Таблица № 1. Критерии эффективности методики
идентификации ГММ**

№	Характеристика	Описание характеристики	Критерий	Методы оценки критерия
1	Специфичность ПЦР	Способность ПЦР-тест-системы выявлять только целевую ДНК.	ПЦР-тест-система должна выявлять целевую ДНК. ПЦР-тест-система не должна давать ложноположительных результатов, в том числе выявлять ДНК близкородственных и неродственных биологических видов в 100% проводимых исследований.	Для оценки специфичности используются контрольные панели образцов. В состав панели должны входить образцы, содержащие целевую ДНК и не содержащие целевую ДНК.

№	Характеристика	Описание характеристики	Критерий	Методы оценки критерия
2	Чувствительность ПЦР	Наименьшее содержание копий целевой ДНК, которое может быть определено с использованием ПЦР-методики, в зависимости от свойств используемых праймеров и зондов	Чувствительность должна быть не ниже 100 копий целевой плазмидной ДНК в одной ПЦР	Проводятся исследования ряда десятикратных разведений целевой плазмидной ДНК с известной концентрацией в двух повторях каждое. Определяется максимальное разведение, при котором ДНК воспроизводимо выявляется (в двух повторях)

№	Характеристика	Описание характеристики	Критерий	Методы оценки критерия
3	Эффективность ПЦР	Прирост матрицы на каждом цикле амплификации.	<p>Эффективность ПЦР должна быть не ниже 90%.</p> <p>Это соответствует значению наклона линейной области зависимости C_t от логарифма концентрации ДНК матрицы (slope): не ниже - 3,6 (приемлем диапазон slope 3,1 – 3,6)</p>	<p>Для оценки эффективности ПЦР проводится амплификация с рядом десятикратных разведений целевой плазмидной ДНК (пункт 2 настоящей таблицы) в двух повторах каждое. По результатам амплификации строится график зависимости C_t от логарифма концентрации ДНК матрицы. Определяется наклон линейной области (slope). Эффективность ПЦР оценивается по уравнению: $E = [10^{-1 / \text{slope}}] - 1$, в идеальном случае – при удвоении количества ПЦР продукта за один цикл: $E = 100\%$, (slope = -3,32)</p>

№	Характеристика	Описание характеристики	Критерий	Методы оценки критерия
4	Предел обнаружения ПЦР-тест-системы (LOD)	Минимальное количество биологического искомого объекта в исследуемом образце, которое может достоверно обнаружить данный метод	Чем меньше искомого биологического объекта способен выявить метод, тем выше его чувствительность. Предел обнаружения ПЦР-тест-системы (LOD) должен составлять не более 0,1%	Готовится ряд модельных образцов с разным содержанием целевой матрицы. Готовятся образцы целевого ГММ ингредиента (от 5 до 0,001% содержания) в соответствующей матрице. Приготовленная панель исследуется с использованием ПЦР-методики. Определяется минимальное содержание ГММ-ингредиента в тотальной ДНК организма, при котором ГММ воспроизводимо выявляется (в десяти повторях)
5	Предел количественного определения (LOQ)	Наименьшее количество (концентрация) вещества в образце, которое может быть количественно оценено с использованием методики с требуемой正确ностью и внутрилабораторной прецизионностью	Предел количественного определения (LOQ) должен быть не более 0,1%. На пределе чувствительности относительное стандартное отклонение (RSD) не должно превышать 20%. Истинное значение измеряемой величины должно входить в полученный при измерениях доверительный интервал	Исследуются 10 повторов 0,1% ГММ-стандарта по ПЦР-методике. Рассчитывается среднее значение содержания ГММ в образце и относительное стандартное отклонение (RSD). Рассчитанное стандартное отклонение (RSD) сравнивается с критерием 20%. Также оценивается, входит ли истинное значение в доверительный интервал полученного среднего значения

№	Характеристика	Описание характеристики	Критерий	Методы оценки критерия
6	Аналитическая область	Интервал определяемых аналитических характеристик, в котором получаемые результаты имеют приемлемый уровень правильности и прецизионности, приемлем диапазон 0,1 – 5%	Диапазон 0,1 – 5% ГММ экспериментальных данных должен удовлетворять линейной модели (пункт 7 настоящей таблицы)	Проводятся исследования образцов с различным содержанием ГММ. Оценивается линейность зависимости аналитического сигнала
7	Линейность	Наличие линейной зависимости аналитического сигнала в анализируемой пробе в пределах аналитической области методики. Оценивается как коэффициент корреляции R2, определяющий верность модели линейной зависимости Ct от логарифма концентрации калибровочных образцов	Коэффициент R2 для калибровочных образцов должен быть не менее 0,98%	Исследуются в двух повторах 0,1%, 1,0% и 5% калибровочные ГММ-стандарты по ПЦР-методике. Строится калибровочная прямая (dCt от lgC), оценивается коэффициент корреляции данных с линейной зависимостью (R2)

№	Характеристика	Описание характеристики	Критерий	Методы оценки критерия
8	Правильность	Отклонение среднего результата определений, выполненных с использованием методики, от значения, принимаемого за истинное	Методика дает корректные результаты, если значения, принимаемые за истинные, лежат внутри доверительных интервалов соответствующих средних результатов анализов, полученных экспериментально по данной методике	Готовятся образцы из калибровочных ГММ-стандартов 0,1%, 1,0% и 5% с добавлением матриц различного происхождения путем смешивания указанных стандартов с другими ингредиентами (сухим молоком, мясным фаршем, рыбной мукой). Образцы исследуются по ПЦР-методике в двух повторах. Оценивается, входит ли истинное значение в диапазон погрешности полученного среднего значения для каждого образца

Таблица № 2. Критерии эффективности методики полногеномного секвенирования

Этап анализа	Характеристика	Описание характеристики	Критерий
Подготовка библиотеки для секвенирования	Концентрация геномной ДНК		Не менее 0,2 нг/мкл
	Размер фрагментов ДНК	Распределение фрагментов по длинам устанавливается электрофоретически	Распределение в диапазоне 250 – 1000 п.н. Максимум распределения – 300 – 500 п.н.
Проведение массового параллельного секвенирования	Распределение качества идентификации нуклеотидов	$Q = -10 \log_{10} p$, где p – вероятность неправильного определения	$Q > 20$, то есть вероятность ошибки не более 0,01

		нуклеотида	
	Среднее качество прочтения		$Q > 25$
	Служебные последовательности	Наличие служебных последовательностей (адаптеров, индексов) в прочтении	Должны отсутствовать
	Покрывтие чтения	Число чтений, содержащих определенный нуклеотид последовательности генома	Не менее десятикратного покрытия
	Представленность нуклеотидов в каждом цикле	Максимальное отклонение между А и Т или G и C	Не более 20% в любой позиции
	GC-состав на прочтение	Сумма отклонений от ожидаемого распределения	Не более 30% прочтений

МЕТОДИКА
производства экспертиз (исследований) биологической
безопасности генно-инженерно-модифицированных микроорганизмов
сельскохозяйственного назначения, используемых для разведения
и (или) выращивания на территории Российской Федерации

I. Общие положения

1. Настоящая Методика устанавливает порядок производства экспертиз (исследований) биологической безопасности генно-инженерно-модифицированных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения, используемых для разведения и (или) выращивания на территории Российской Федерации (далее – экспертиза, ГММ соответственно).

2. Экспертиза проводится организацией (испытательной лабораторией), аккредитованной в национальной системе аккредитации в области аккредитации, соответствующей исследованиям, указанным в настоящей Методике.

3. Результаты экспертизы оформляются заключением о результатах экспертизы, составленным на основании протоколов исследований ГММ, которое должно содержать следующие сведения:

наименование заключения;

полное наименование и адрес в пределах места нахождения организации (испытательной лаборатории), осуществившей проведение экспертизы;

наименование ГММ с указанием его таксономического статуса;

полное наименование, адрес в пределах места нахождения, идентификационный номер налогоплательщика юридического лица, осуществляющего на территории Российской Федерации генно-инженерную деятельность в целях создания ГММ (далее – заявитель);

полное наименование и адрес в пределах места нахождения юридического лица либо фамилия, имя, отчество (при наличии), адрес места жительства индивидуального предпринимателя — изготовителя образцов ГММ, представленных на экспертизу;

вид предполагаемого целевого использования ГММ;

сведения о трансформационном событии в виде кода, сформированного согласно Общероссийскому классификатору трансформационных событий;

место депонирования и коллекционный номер штамма ГММ (указывается для депонированных ГММ);

регистрационный номер свидетельства о государственной регистрации ГММ, предназначенного (предназначенных) для выпуска в окружающую среду, на основе которого (которых) создан ГММ, в отношении которого проведена экспертиза (в случае если ГММ создан на основе иного (иных) ГММ);

регистрационный номер свидетельства о государственной регистрации ГММ для иного целевого использования (при наличии);

сведения о регистрации ГММ за рубежом (при наличии);

оценка полноты представленных заявителем документов и данных;

краткое содержание документов и данных, представленных заявителем для проведения экспертизы;

перечень исследований ГММ с указанием их результатов;

описание представленных заявителем на экспертизу образцов ГММ и исходного микроорганизма-реципиента с указанием их количества, а также оценка их пригодности для проведения исследований;

выводы о результатах экспертизы: о наличии или отсутствии негативного воздействия ГММ на окружающую среду;

специальные условия использования ГММ (при наличии);

срок действия свидетельства о государственной регистрации ГММ (в случае отсутствия сведений о негативном воздействии ГММ

на окружающую среду);

фамилии, имена, отчества (при наличии) лиц, проводивших экспертизу, ученые степени, ученые звания (при наличии), места их работы и должности;

дата и номер заключения экспертизы;

подпись руководителя организации (испытательной лаборатории), осуществившей проведение экспертизы.

4. К заключению о результатах экспертизы должны прилагаться протоколы исследований ГММ, на основании которых оно составлено, подписанные лицами, проводившими исследования.

5. В случае если заявителем не представлены документы и данные, предусмотренные пунктом 6 настоящей Методики, и (или) необходимые образцы, пригодные для проведения исследований, экспертиза не проводится. Заявителю должен быть выдан мотивированный отказ в проведении экспертизы, подписанный руководителем организации (испытательной лаборатории), аккредитованной в национальной системе аккредитации в области аккредитации, соответствующей исследованиям, указанным в настоящей Методике, в которую обратился заявитель для проведения экспертизы.

II. Экспертиза ГММ

6. В рамках экспертизы ГММ осуществляется рассмотрение представленных заявителем документов и данных:

а) наименования ГММ с указанием его таксономического статуса; полного наименования, адреса в пределах места нахождения, идентификационного номера налогоплательщика заявителя; полного наименования и адреса в пределах места нахождения юридического лица, фамилии, имени, отчества (при наличии), адреса места жительства индивидуального предпринимателя – изготовителя образцов ГММ,

предоставленных на экспертизу; вида предполагаемого целевого использования ГММ; регистрационного номера свидетельства о государственной регистрации ГММ, предназначенного (предназначенных) для выпуска в окружающую среду, на основе которого (которых) создан ГММ, в отношении которого проводится экспертиза (в случае если ГММ создан на основе иного (иных) ГММ); регистрационного номера свидетельства о государственной регистрации ГММ для иного целевого использования (при наличии) либо информации об отсутствии такого свидетельства;

б) сведений об исходном микроорганизме-реципиенте (таксономическая характеристика с указанием метода идентификации; источник выделения штамма: субстрат, географический пункт, дата выделения; методы идентификации штамма, кем идентифицирован (фамилия, имя, отчество (при наличии), ссылка на использованные определители);

в) описания структуры генетической конструкции (внесенной или удаленной) и места ее локализации, характеристики экспрессии встроенных или измененных генов;

г) сведений о трансформационном событии в виде кода, сформированного согласно Общероссийскому классификатору трансформационных событий;

д) информации о генетической модификации (описание метода модификации, структуры вектора, структуры вставки);

е) информации о месте депонирования и коллекционном номере штамма ГММ, паспорта штамма ГММ (для депонированных штаммов ГММ) либо следующей информации (в случае непредставления информации о месте депонирования и коллекционном номере штамма ГММ, паспорта штамма ГММ):

о культурально-морфологических, физиолого-биохимических (ферментативных), антигенных, биологических свойствах и генетических особенностях штамма ГММ;

об условиях культивирования: наименованиях питательных сред, pH среды, температуре и продолжительности выращивания, сроке хранения и периодичности пересева культуры штамма ГММ в нативной форме;

о применяемом способе и условиях хранения штамма ГММ: в случае лиофилизации указываются продолжительность выращивания на питательной среде (возраст культуры), состав защитной среды, титр клеточной суспензии, режим высушивания, температура хранения, срок хранения; в случае криоконсервации указываются продолжительность выращивания на питательной среде (возраст культуры), состав защитной среды, титр клеточной суспензии, скорость замораживания (град/мин), температура хранения, срок хранения;

о диссоциации культуры в зависимости от метода хранения (описание морфологических типов колоний на конкретной среде с подробным описанием типа, сохраняющего полезный или диагностический признак);

о среде, на которой заявителем предоставляется штамм ГММ;

о количестве, дате приготовления и сроке годности образцов штамма ГММ;

ж) информации о вносимых генах (для организмов-доноров указывается таксономический статус, данные о вирулентных, аллергенных и патогенных свойствах);

з) описания свойств, приобретенных ГММ в результате модификации;

и) характеристики различий ГММ с исходным микроорганизмом-реципиентом, в том числе описания способа размножения, распространения, вирулентности, схемы культивирования, новых

фенотипических свойств, биологических преимуществ ГММ по сравнению с исходным микроорганизмом-реципиентом;

к) описания методики, позволяющей подтвердить таксономический статус ГММ, описания нуклеотидных последовательностей, используемых праймеров, зондов, условий проведения полимеразной цепной реакции;

л) результатов изучения стабильности ГММ, в том числе в организмах животных (крыс или мышей), а также оценки способности к переносу генов, введенных в исходный микроорганизм-реципиент с использованием методов генной инженерии в другие микроорганизмы;

м) информации о регистрации ГММ в государствах – членах Евразийского экономического союза, иных государствах или об отсутствии такой регистрации, а также о наличии либо отсутствии фактов негативных последствий применения ГММ;

н) копии заключения о результатах молекулярно-генетического исследования ГММ;

о) информации о биоинформатическом анализе, поиске гомологии рекомбинантного белка с аминокислотными последовательностями токсических белков, белков, обладающих фармакологической или иной биологической активностью, при использовании специализированных баз данных;

п) протоколов исследований, указанных в пункте 7 настоящей Методики, проведенных в организациях (испытательных лабораториях), аккредитованных в национальной системе аккредитации в области аккредитации, соответствующей исследованиям, указанным в настоящей Методике (при наличии).

7. В отношении ГММ должны быть проведены следующие исследования в сравнении с исходным микроорганизмом-реципиентом:

- а) исследование вирулентности ГММ на лабораторных животных;
- б) токсикологические исследования на лабораторных животных;
- в) исследования стабильности свойств ГММ;

г) исследование жизнестойкости ГММ на объектах окружающей среды, в том числе на влажных опилках, ватных тампонах, при термической обработке.

8. В случае отсутствия у заявителя протоколов исследований, указанных в подпункте «п» пункта 6 настоящей Методики, им должны быть представлены образцы ГММ и исходного микроорганизма-реципиента. Соответствующие исследования этих образцов проводятся организацией (испытательной лабораторией), осуществляющей проведение экспертизы.

9. Если ГММ соответствует показателям (условиям) безопасности, указанным в пункте 10 настоящей Методики, заявителю должно быть выдано заключение об отсутствии негативного воздействия ГММ на окружающую среду. В заключении об отсутствии негативного воздействия на окружающую среду могут быть указаны специальные условия использования ГММ.

10. Требования к проведению исследований и показатели (условия) безопасности ГММ:

а) исследования вирулентности ГММ на лабораторных животных должны проводиться на свободных от специфических патогенов мышах или цыплятах с определением летальной дозы для 50% лабораторных животных (далее – ЛД₅₀) в течение 10 календарных дней при соотношении самцов и самок 1:1. Животные должны быть разделены на 2 равные группы: группа «контроль» и группа «опыт». Определение ЛД₅₀ проводится путем внутрибрюшинного введения животным группы «опыт» по 0,1 см³ живой суточной культуры исследуемого штамма в концентрации 1х10⁽⁹⁾, 1х10⁽⁷⁾, 1х10⁽⁵⁾ и 1х10⁽³⁾ КОЕ/см³. Животным группы «контроль» внутрибрюшинно вводится стерильный физиологический раствор или стерильная среда для культивирования исследуемого штамма ГММ.

Обе группы животных должны получать одинаковый по объему и составу рацион. Животные должны иметь доступ к корму и воде,

содержаться в помещении с системой отопления и регулируемым микроклиматом.

По завершении эксперимента необходимо подсчитать гибель животных в каждой группе и определить ЛД₅₀. Если ЛД₅₀ равна $5 \times 10(8)$ КОЕ/см³ и более, штамм считают авирулентным. ЛД₅₀ для штамма ГММ не должна быть меньше ЛД₅₀ исходного микроорганизма-реципиента;

б) токсикологические исследования на лабораторных животных должны проводиться на крысах или мышах (в зависимости от вида животных, сведения о которых представлены заявителем в соответствии с пунктом 6 настоящей Методики) в течение 90 календарных дней при соотношении самцов и самок 1:1. Животные должны быть разделены на 2 равные группы: группа «контроль» и группа «опыт». Группа «контроль» должна получать рацион с включением исходного микроорганизма-реципиента; группа «опыт» должна получать рацион с включением исследуемого ГММ. Обе группы животных должны получать одинаковый по объему и составу рацион, за исключением включенного исследуемого ГММ или исходного микроорганизма-реципиента. Исследуемый ГММ и исходный микроорганизм-реципиент должны быть включены в состав корма в равном количестве. Животные должны иметь доступ к корму и воде, содержаться в помещении с системой отопления и регулируемым микроклиматом.

Должны исследоваться следующие показатели состояния животных:
персистенция и выделение ГММ из организма животных;

общее состояние животных: внешний вид, двигательная активность, состояние шерстного покрова – каждые 2 календарных дня; поедаемость корма – ежедневно; масса тела – каждые 7 календарных дней;

гематологические показатели крови: концентрация гемоглобина; гематокрит; общее количество эритроцитов; средний объем эритроцита (СОЭ); среднее содержание гемоглобина в эритроците (ССЭ); средняя

концентрация гемоглобина в эритроците (СКЭ); общее количество тромбоцитов; общее количество лейкоцитов; дифференцированный подсчет лейкоцитов (нейтрофилы, лимфоциты, эозинофилы, моноциты, базофилы);

биохимические показатели крови: аланинаминотрансфераза (АЛТ); аспартатаминотрансфераза (АСТ); желчные кислоты; фосфатаза щелочная; билирубин общий; билирубин прямой; белок общий; альбумин; глобулин; креатинин; глюкоза; альфа-амилаза; липаза; лактатдегидрогеназа; общие липиды; триглицериды; холестерин; холинэстераза; мочевины; хлориды; натрий; фосфор; калий;

общий анализ мочи: цвет и прозрачность; относительная плотность; рН; белок; глюкоза; креатинин.

Исследования гематологических и биохимических показателей крови, персистенции и показателей мочи должны проводиться на 90-й календарный день опыта у 50% животных из каждой группы. По окончании восстановительного периода (10-й календарный день со дня окончания дачи рациона с ГММ, 101-й календарный день опыта) должны проводиться те же исследования у второй половины животных каждой группы.

Скармливание животным рациона, содержащего ГММ, не должно вызывать клинических изменений (показатели крови, мочи, общего состояния животных группы «опыт», персистенции и выделения ГММ не должны отклоняться от показателей группы «контроль»), не должны выявляться патологоанатомические изменения при вскрытии;

в) стабильность свойств ГММ должна проверяться при пассировании исследуемых штаммов на жидких и плотных питательных средах с тестированием фенотипических (биохимических) свойств через 6 последовательных пассажей. Молекулярно-генетическими методами должен исследоваться исходный ГММ и ГММ после шестикратного пассирования. Стабильными являются штаммы ГММ, не изменившие

фенотипических (биохимических) свойств и сохранившие генетическую структуру после проведения шестикратного пассивирования. ГММ должны демонстрировать стабильность фенотипических (биохимических) свойств и генетической структуры;

г) исследование жизнестойкости ГММ на объектах окружающей среды, в том числе на влажных опилках, ватных тампонах, при термической обработке должно проводиться с использованием питательных сред, культур клеток или иных тест-объектов, чувствительных к исходному микроорганизму-реципиенту, согласно информации, представленной заявителем в соответствии с пунктом 6 настоящей Методики. Эксперименты должны проводиться с использованием в качестве контроля исходного микроорганизма-реципиента. Условия экспериментов для исходного микроорганизма-реципиента и ГММ должны совпадать. Жизнестойкость ГММ в окружающей среде не должна превышать жизнестойкость исходного микроорганизма-реципиента.