МИНИСТЕРСТВО ЮСТИЦИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ЗАРЕГИСТРИРОВАНО
Регистрационный № 54775
от "29" мая 2019 г.

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(Минсельхоз России)

П Р И К А З

от 4 апреля 2019 г. **№** 169

Москва

Об утверждении Методики производства молекулярно-генетического исследования генно-инженерно-модифицированных организмов, используемых для производства лекарственных средств для ветеринарного применения

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; 2014, № 25, ст. 3317; 2017, № 28, ст. 4145; 2018, № 6, ст. 896; № 41, ст. 6260), п р и к а з ы в а ю:

Утвердить прилагаемую Методику производства молекулярно-генетического исследования генно-инженерно-модифицированных организмов, используемых для производства лекарственных средств для ветеринарного применения.

Министр Д.Н. Патрушев

УТВЕРЖДЕНА
приказом Минсельхоза России
от 04.04.2019 г. № 169

М Е Т О Д И К А
производства молекулярно-генетического исследования генно-инженерно-модифицированных организмов, используемых для производства лекарственных средств для ветеринарного применения

1. Настоящая Методика устанавливает порядок проведения молекулярно-генетического исследования генно-инженерно-модифицированных организмов, используемых для производства лекарственных средств для ветеринарного применения (далее – исследование, ГМО соответственно).

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

3. В рамках исследования осуществляется анализ представленных юридическим лицом, осуществляющим на территории Российской Федерации генно-инженерную деятельность в целях создания ГМО (далее – заявитель), документов и данных:

а) наименования ГМО с указанием его таксономического статуса;

б) полного наименования, места нахождения, идентификационного номера налогоплательщика (ИНН) заявителя;

в) полного наименования и места нахождения юридического лица либо фамилии, имени, отчества (при наличии), места жительства индивидуального предпринимателя – изготовителя образцов ГМО;

г) вида предполагаемого целевого использования ГМО;

д) сведений об исходном организме-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);

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

ж) информации о месте депонирования и коллекционном номере штамма ГМО, паспорта штамма ГМО (для депонированных штаммов ГМО) либо информации о культурально-морфологических, физиолого-биохимических

(ферментативных), антигенных, биологических свойствах и генетических особенностях штамма ГМО; условиях культивирования: наименованиях питательных сред, pH среды, температуре и продолжительности выращивания, сроке хранения и периодичности пересева культуры штамма ГМО в нативной форме; о применяемом способе и условиях хранения штамма ГМО: в случае лиофилизации указывается продолжительность выращивания на питательной среде (возраст культуры), состав защитной среды, титр клеточной суспензии, режим высушивания, температура хранения, срок хранения; в случае криоконсервации указывается 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 колонии, сохраняющего полезный или диагностический признак); о среде, на которой заявителем предоставляется штамм ГМО; о количестве, дате приготовления и сроке годности образцов штамма ГМО (в случае непредставления информации о месте депонирования и коллекционном номере штамма ГМО, паспорта штамма ГМО);

з) описания структуры, внесенной или удаленной генетической конструкции и места ее локализации, характеристик встроенных или измененных генов;

и) информации о генетической модификации: описание метода модификации, структуры вектора, структуры вставки, расположения рекомбинантной ДНК (хромосома, плазмида, мобильные элементы), включая фланкирующие последовательности, включения в состав мобильных генетических элементов;

к) информации об организмах-донорах вносимых генов (с указанием группы патогенности при наличии);

л) описания методики, позволяющей идентифицировать ГМО, в том числе описания нуклеотидных последовательностей, используемых праймеров, зондов и условий полимеразной цепной реакции (далее - ПЦР);

м) регистрационного номера свидетельства о государственной регистрации ГМО, предназначенного (предназначенных) для выпуска в окружающую среду, на основе которого (которых) создан ГМО, в отношении которого проводится исследование (в случае, если ГМО создан на основе иного (иных) ГМО);

н) регистрационного номера свидетельства о государственной регистрации ГМО для иного целевого использования (при наличии);

о) информации о регистрации ГМО за рубежом (при наличии);

п) данных полногеномного секвенирования ГМО (при наличии).

Заявителем ГМО для исследования предоставляются образцы ГМО и исходного организма-реципиента.

4. В рамках исследования осуществляются следующие испытания предоставленных заявителем образцов ГМО и исходного организма-реципиента:

а) проверка (валидация) методики идентификации ГМО, 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 ГМО;

в) подтверждение присутствия (отсутствия) маркерных и селективных генов в геноме ГМО, указанных в таблице № 2 приложения к настоящей Методике;

г) полногеномное секвенирование ГМО, который содержится в продукции в жизнеспособном виде (в случае непредставления заявителем ГМО данных полногеномного секвенирования ГМО, представляющего собой плазмиду, вирус (бактериофаг), бактерию или одноклеточное простейшее, животное, гриб), проведенного с использованием методики полногеномного секвенирования, соответствующей критериям эффективности, указанным в таблице № 3 приложения к настоящей Методике.

5. Полногеномное секвенирование ГМО проводится с использованием методики полногеномного секвенирования, соответствующей критериям эффективности, указанным в таблице № 3 приложения к настоящей Методике.

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

наименование заключения;

полное наименование и место нахождения организации (испытательной лаборатории), осуществившей проведение исследования;

наименование ГМО с указанием его таксономического статуса;

полное наименование, место нахождения, идентификационный номер налогоплательщика (ИНН) заявителя;

полное наименование и место нахождения юридического лица либо фамилия, имя, отчество (при наличии), место жительства индивидуального предпринимателя – изготовителя образцов ГМО;

вид предполагаемого целевого использования ГМО;

место депонирования и коллекционный номер (указывается для депонированных штаммов ГМО);

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

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

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

сведения о регистрации ГМО за рубежом (при наличии);

оценку полноты представленных заявителем документов и данных;

краткое содержание представленных заявителем документов и данных;

описание представленных заявителем образцов ГМО и исходного организма-реципиента с указанием их количества, а также оценку их пригодности для проведения исследования;

выводы о результатах исследования: о молекулярно-генетической структуре ГМО, об отсутствии или наличии не заявленных генетических конструкций, об эффективности метода идентификации ГМО, сведения о соответствии генетической модификации природным (естественным) процессам;

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

дату и номер заключения;

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

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

8. В случае если заявителем не представлены документы и данные, предусмотренные настоящей Методикой, и (или) образцы ГМО и исходного организма-реципиента, пригодные для проведения исследований, в количестве, необходимом 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, с областью аккредитации, соответствующей исследованиям, указанным в настоящей Методике, в которую обратился заявитель для проведения исследования.

Приложение
к Методике производства
молекулярно-генетического
исследования генно-инженерно-
модифицированных организмов,
используемых для производства
лекарственных средств для
ветеринарного применения

Таблица № 1. Критерии эффективности методики идентификации ГМО

№ п/п	Характеристика	Описание характеристики	Критерий	Методы оценки критерия
1	Специфичность ПЦР	Способность ПЦР-тест-системы выявлять только целевую нуклеиновую кислоту (далее – НК)	ПЦР-тест-система должна выявлять целевую НК. ПЦР-тест-система не должна давать ложноположительных результатов, в том числе выявлять НК близкородственных и неродственных биологических видов, в 100% проводимых исследований	Для оценки специфичности используют контрольные панели образцов. В состав панели входят образцы, содержащие целевую НК и не содержащие целевую НК
2	Чувствительность ПЦР	Наименьшее содержание копий целевой НК, которое может быть определено с использованием данной ПЦР-методики, в первую очередь зависит от свойств используемых праймеров и зондов	Чувствительность должна быть не ниже 100 копий целевой НК, например, плазмидной, в одной ПЦР	Проводят исследования ряда десятикратных разведений целевой плазмидной НК с известной концентрацией в двух повторах каждое. Определяют максимальное разведение, при котором НК воспроизводимо выявляется (в двух повторах)

№ п/п	Характеристика	Описание характеристики	Критерий	Методы оценки критерия
3	Эффективность ПЦР	Характеризует прирост матрицы на каждом цикле амплификации	Эффективность ПЦР должна быть не ниже 90%. Это соответствует значению наклона линейной области зависимости Ct от логарифма концентрации ДНК матрицы (slope): не ниже 3,6 (приемлем диапазон slope 3,1 – 3,6)	Для оценки эффективности ПЦР проводят амплификацию с рядом десятикратных разведений целевой плазмидной НК (пункт 2 настоящей таблицы) в двух повторах каждое. Строят график зависимости Ct от логарифма концентрации НК матрицы. Определяют наклон линейной области (slope). Эффективность ПЦР оценивают по уравнению: E = [10(-1/slope)]-1 В идеальном случае – при удвоении количества ПЦР продукта за один цикл: E = 100%, (slope = -3,32)

№ п/п	Характеристика	Описание характеристики	Критерий	Методы оценки критерия
4	Предел обнаружения ПЦР-тест-системы (LOD)	Отражает 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. Определяется экспериментально, но должен составлять не более 0,1%	Готовят ряд модельных образцов с разным содержанием целевой матрицы. Готовят образцы целевого ГМО-ингредиента (от 5% до 0,001% содержания) в соответствующей матрице. Исследуют приготовленную панель с использованием ПЦР-методики. Определяют минимальное содержание ГМО-ингредиента в тотальной НК организма, при котором ГМО воспроизводимо выявляется (в десяти повторах)
5	Предел количественного определения (LOQ)	Наименьшее количество (концентрация) вещества в образце, которое может быть оценено с использованием методики с требуемой правильностью и внутрилабораторной прецизионностью	Для методик ГМО предел должен быть не более 0,1%. На пределе чувствительности относительное стандартное отклонение (RSD) для методик ГМО не должно превышать 20%. Истинное значение измеряемой величины должно входить в полученный при измерениях доверительный интервал	Исследуют 10 повторов 0,1% ГМО-стандарта по ПЦР-методике. Рассчитывают среднее значение содержания ГМО в образце и относительное стандартное отклонение (RSD). Сравнивают рассчитанное стандартное отклонение (RSD) с критерием 20%. Также оценивают, входит ли истинное значение в доверительный интервал полученного среднего значения

№ п/п	Характеристика	Описание характеристики	Критерий	Методы оценки критерия
6	Аналитическая область (dynamic range)	Интервал определяемых аналитических характеристик, в котором получаемые результаты имеют приемлемый уровень правильности и прецизионности. Для ГМО-методик обычно приемлем диапазон 0,1% – 5%	Диапазон 0,1% – 5% ГМО экспериментальных данных, должен удовлетворять линейной модели (пункт 7 настоящей таблицы)	Проводят исследования образцов с различным содержанием ГМО. Оценивают линейность зависимости аналитического сигнала
7	Линейность	Наличие линейной зависимости аналитического сигнала в анализируемой пробе в пределах аналитической области методики. Оценивается как R^2 – коэффициент корреляции, определяющий верность модели линейной зависимости Ct от логарифма концентрации калибровочных образцов	R^2-коэффициент для калибровочных образцов должен быть не менее 0,98%	Исследуют в двух повторах 0,1%, 1,0% и 5,0% калибровочные ГМО-стандарты по ПЦР-методике. Строят калибровочную прямую (dCt от lgC), оценивают коэффициент корреляции данных с линейной зависимостью (R^2)

№ п/п	Характеристика	Описание характеристики	Критерий	Методы оценки критерия
8	Правильность	Правильность методики характеризуется отклонением среднего результата определений, выполненных с ее использованием, 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	Готовят образцы из калибровочных стандартов 0,1%, 1,0% и 5,0% с добавлением матриц различного происхождения (для этого смешивают стандарты с другими ингредиентами, сухим молоком, мясным фаршем, рыбной мукой). Исследуют образцы по ПЦР-методике в двух повторах. Оценивают, входит ли истинное значение в диапазон погрешности полученного среднего значения для каждого образца

При использовании методики, основанной на ПЦР, исследование включает последовательные процессы: подготовку проб, выделение нуклеиновых кислот из образцов, амплификацию заданных фрагментов нуклеиновых кислот, детекцию продуктов амплификации, анализ и интерпретацию результатов.

Таблица № 2. Основные маркерные и селективные гены, являющиеся составляющими частями генно-инженерных конструкций

Мишень	Описание
Ген LacZ	Кодирует фермент b-галактозидазу. Используется в векторных плазмидных конструкциях (pCR2.1 TOPO, pVIK112, pBSKSII и других), включает область полилинкера для клонирования рекомбинантных генов. При наличии данного фермента бесцветный субстрат X-gal превращается в окрашенный продукт, бактериальные колонии, экспрессирующие LacZ, имеют голубой цвет
Ген gfp	Ген зеленого флуоресцентного белка используется в ряде векторных плазмид для генно-инженерных манипуляций (pKEN-gfpmut2, pRK415-gfp) в качестве светящейся метки
Ген amp	Кодирует устойчивость к ампициллину, используется в ряде векторных плазмид для селекции по антибиотикоустойчивости (pBR322, pUC18, pBSKSII, pET, pCR2.1 TOPO)
Ген Km	Кодирует устойчивость к канамицину, используется в ряде векторных плазмид для селекции по антибиотикоустойчивости (pVIK112, pMC212)
Ген tetO	Кодирует устойчивость к тетрациклину, используется в ряде векторных плазмид для селекции по антибиотикоустойчивости (pBR322)
F1 ori	Ориджин репликации плазмид (pBSKSII, pKEN-gfpmut2, pCR2.1 TOPO)
Транспозон Tn7L	Фрагмент обеспечивает транспозицию рекомбинантных генов из плазмид в геном (pRK415-gfp)
Ген ermC	Кодирует устойчивость к эритромицину, плазмидные векторы
Ген cat	Кодирует устойчивость к хлорамфениколу, плазмидные векторы
R6K ori	Ориджин репликации плазмид (pVIK112)

Таблица № 3. 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=-10log10p, где p – вероятность неправильного определения нуклеотида	Q>20, то есть вероятность ошибки не более 0,01
	Среднее качество прочтения		Q>25
	Служебные последовательности	Наличие служебных последовательностей (адаптеров, индексов) в прочтении	Должны отсутствовать
	Покрытие чтения	Число чтений, содержащих определенный нуклеотид последовательности генома	Не менее десятикратного покрытия
	Представленность нуклеотидов в каждом цикле	Максимальное отклонение между A и T или G и C	Не более 20% в любой позиции
	GC-состав на прочтение	Сумма отклонений от ожидаемого распределения	Не более 30% прочтений