

## **Stratégia odberu vzoriek geneticky modifikovaných mikroorganizmov a vírusov pre kontrolu práce v uzavretých priestoroch a kritériá pre plánovanie protokolu vzorkovania mikroorganizmov**

Pri plánovaní protokolu vzorkovania je veľmi významným faktorom predbežná úprava vzoriek, potrebná pre nasledujúci dôkaz a/alebo identifikáciu GMM. Postup pre predbežnú úpravu vzoriek určuje pre každé konkrétne vzorkovanie referenčné laboratórium. Voľba postupu úpravy vzoriek závisí od povahy a zloženia vzoriek a rovnako aj od požiadavky techník dôkazov a/alebo identifikácie, ktoré sa použijú pre kontrolu prítomnosti a/alebo charakterizáciu GMM. Mnohé z týchto techník vyžadujú extrakciu (izoláciu) mikroorganizmov, nukleových kyselín a/alebo génových produktov zo vzoriek.

Príklady techník pre dôkaz a izoláciu GMM z odobraných vzoriek:

- biologický pokus,
- filtračné techniky,
- dekantácia a osievanie,
- centrifugácia a gradientová centrifugácia,
- imunologické techniky,
- afinitné techniky,
- kultivačné techniky.

Pri extrakcii nukleových kyselín a proteínov sú tiež vhodné:

- lýza buniek opakovaným zmrazením a rozmrazením,
- extrakcia organickým rozpúšťadlom,
- lýza buniek lytickými enzýmami,
- techniky dezintegrácie (rozbíjania) buniek napr. použitím sklenených guľičiek, dezintegrácia,
- ultrazvukom, použitím „French Press“,
- homogenizácia.

Alternatívne možno DNA extrahovať priamo zo vzorky bez predchádzajúcej izolácie GMM.

Všetky uvedené techniky vedú ku stratám cieľového GMM alebo makromolekúl (nukleové kyseliny, bielkoviny). Pri použití kombinácie techník sa tieto straty spočítavajú a môžu ovplyvniť výsledky.

V konkrétnych prípadoch môžu byť do plánu protokolov vzorkovania zahrnuté tiež nasledovné aspekty :

- Rozsah plochy na ktorej má byť GMM vzorkovaný môže vzhľadom na dostupnosť zdrojov významne ovplyvniť voľbu metódy v závislosti od nákladov a praktického detekčného limitu. Na malej ploche môže byť intenzívne vzorkovanie uskutočniteľné, nemusí to tak byť v prípade väčších plôch.
- Ak je to potrebné, po odbere vzoriek sa povrch plochy z ktorej bol odber uskutočnený vyčistí a dezinfikuje, aby sa odstránili zvyšky živín pochádzajúcich z procesu odberu vzoriek, ktoré zostali na povrchu po odbere vzoriek.
- Pre mikroorganizmy s výnimkou vírusov existuje potenciálna možnosť pomerne presne definovať oblasť („mikroprostredie“) možného výskytu GMM. Toto mikroprostredie môže v určitej miere zamedzovať šíreniu mikroorganizmu. Aj rozšírenie vo vnútri tohto mikroprostredia môže byť ovplyvnené rôznymi faktormi, medzi ktoré patrí schopnosť vytvárať spóry, kľudové štádiá a iné špecifické štruktúry. Dobrá znalosť týchto faktorov môže viesť k obmedzeniu plochy vzorkovania.
- V prípade vírusov existuje potenciálna možnosť definovať oblasť ich výskytu, a to v závislosti od hostiteľa, ktorého geneticky modifikovaný vírus infikuje. Tento hostiteľ môže v určitej miere zamedziť rozšíreniu vírusu.
- V niektorých prípadoch môže byť určenie pravdepodobnosti šírenia mikroorganizmu dosť náročné. Napríklad šírenie vzduchom môže preniesť mikroorganizmy na neočakávané miesta. Podobne sa podľa druhu mikroorganizmu určí výber metód vzorkovania v oblasti jeho možného rozšírenia. Mikroorganizmy ktoré sa šíria vzduchom môžu vyžadovať úplne odlišnú metodológiu v porovnaní s pôdnymi mikroorganizmami alebo s tými, ktoré žijú v symbióze s inými vyššími organizmami.
- Ak má byť vzorkovanie uskutočnené z väčšej plochy, je potrebné použiť režim náhodného výberu

- Vo všetkých prípadoch je potrebné poznať detekčný limit následne používaných analytických techník, aby sa zabezpečilo dostatočné množstvo odobranej vzorky
- Pre hodnotenie experimentu sú rozhodujúce vhodné kontrolné vzorky. Okrem vzoriek o ktorých sa vie, že neobsahujú GMM (napr. pôvodný mikroorganizmus, nemodifikovaný recipient), nukleovú kyselinu alebo génový produkt, ktorý je predmetom záujmu (negatívne kontrolné vzorky), plán protokolu vzorkovania zahŕňa aj kvalitatívne alebo kvantitatívne pozitívne kontrolné vzorky.