

РУКОВОДЯЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ ПО ПРОВЕДЕНИЮ ОЦЕНКИ БЕЗОПАСНОСТИ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫВЕДЕННЫХ МЕТОДОМ РЕКОМБИНАНТНОЙ ДНК

CAC/GL 46-2003

РАЗДЕЛ 1 – ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

1. Настоящие руководящие положения подкрепляют принципы анализа риска пищевых продуктов, полученных методом современной биотехнологии, и регламентируют аспекты безопасности и питательных свойств пищевых продуктов, полученных с использованием микроорганизмов, созданных методом рекомбинантной ДНК.¹ Микроорганизмы, созданные методом рекомбинантной ДНК, которые используются для изготовления этих пищевых продуктов, обычно получают с использованием методов современной биотехнологии из штаммов с предысторией безопасного и целенаправленного использования в пищевой промышленности. Однако в тех случаях, когда у штаммов-реципиентов предыстории безопасного использования нет, необходимо установить их безопасность.² Такие пищевые продукты или ингредиенты пищевых продуктов могут содержать жизнеспособные или нежизнеспособные микроорганизмы, созданные методом рекомбинантной ДНК, или могут быть получены путем ферментации с использованием микроорганизмов, созданных методом рекомбинантной ДНК, из которых такие микроорганизмы впоследствии удалены.

2. С учетом того, что нижеследующие вопросы могут решаться другими органами или с помощью других инструментов, в настоящем документе не рассматриваются:

- вопросы безопасности микроорганизмов, используемых в сельском хозяйстве (для защиты растений, в биоудобрениях, в кормах для животных или в пищевых продуктах, полученных от животных, которые откармливаются такими кормами и т.п.);
- риски, связанные с высвобождением в окружающую среду микроорганизмов, полученных методом рекомбинантной ДНК, которые используются в производстве пищевых продуктов;
- безопасность веществ, вырабатываемых микроорганизмами, используемыми в качестве пищевых или технологических добавок, включая ферменты для использования в производстве пищевых продуктов³;
- специфические преимущества, имеющие целью укрепление здоровья, или последствия, относящиеся к симбиозу, которые могут быть приписаны использованию микроорганизмов в пищевых продуктах; или
- вопросы, относящиеся к безопасности работников пищевой промышленности, работа которых связана с микроорганизмами, полученными методом рекомбинантной ДНК.

3. Множество микроорганизмов, используемых в пищевой промышленности обладало длительной предысторией безопасного использования, еще до того, как стала проводиться научная оценка. Некоторые микроорганизмы были подвергнуты научной оценке с помощью таких методов, которые позволили полностью описать все потенциальные риски, связанные с пищевым продуктом, который они обычно вырабатывают, включая в некоторых случаях потребление жизнеспособных микроорганизмов. Кроме того, Принципы анализа риска Кодекса, в частности для оценки риска, предназначены, прежде всего, для применения к конкретным химическим соединениям, таким как пищевые добавки и остатки пестицидов, или к конкретным химическим или микробиологическим загрязнителям, которые сопряжены с идентифицируемыми опасностями и рисками; на первоначальном этапе они не предназначались для применения к преднамеренным видам использования микроорганизмов в процессах переработки пищевых продуктов или в продуктах, трансформируемых методом микробной ферментации. Оценки безопасности, которые проводились ранее, были в основном сосредоточены на подтверждении отсутствия свойств, связанных с патогенностью этих микроорганизмов, и сообщений о неблагоприятных последствиях, приписываемых попаданию этих микроорганизмов в пищеварительный тракт,

¹ Микроорганизмы, задействованные в этих видах применения, включают бактерии, дрожжи и мицелиальные грибы. (Такие виды применения могут включать изготовление йогурта, сыров, ферментированных колбасных изделий, натто, кимчи, хлеба, пива и вина, но не ограничиваться ими.)

² Установление критерия безопасности микроорганизмов, используемых в производстве пищевых продуктов, у которых нет предыстории безопасного использования, в круг вопросов, рассматриваемых в настоящем документе, не входит.

³ В настоящее время Объединенный комитет экспертов ФАО/ВОЗ по пищевым добавкам (ОКЭПД) пересматривает руководящие положения по общим спецификациям и соображениям в отношении ферментных препаратов, используемых в переработке пищевых продуктов. Эти руководящие положения используются для оценки ферментных препаратов, полученных на основе генетически измененных микроорганизмов.

а не на оценке результатов предписанных исследований. Кроме того, многие пищевые продукты содержат вещества, которые – в том случае, если бы они были подвергнуты обычным методам проверки безопасности, – были бы сочтены вредными. Таким образом, в тех случаях, когда речь идет о безопасности продукта в целом, необходимо использовать более адресный подход.

4. Информация, которая учитывается при разработке этого подхода, включает:

- А) использование живых микроорганизмов в процессе производства пищевых продуктов;
- Б) рассмотрение видов генетических модификаций, которые, возможно, были внесены в эти организмы;
- В) виды имеющихся методологий проведения оценки безопасности; и
- Г) вопросы, конкретно относящиеся к использованию микроорганизмов на основе рекомбинантной ДНК в процессе производства пищевых продуктов, включая их генетическую устойчивость, потенциал передачи генов, колонизацию желудочно-кишечного тракта и их стойкость⁴, взаимодействие, которое может быть у микроорганизмов, полученных на основе рекомбинантной ДНК, с кишечно-желудочной флорой или млекопитающим-хозяином, и любое воздействие микроорганизмов на основе рекомбинантной ДНК на иммунную систему.

5. В основе этого подхода лежит принцип, в соответствии с которым безопасность пищевых продуктов, полученных с использованием рекомбинантных микроорганизмов, оценивается по их обычным аналогам, для которых характерна предыстория безопасного использования не только применительно к продукту, полученному на основе того или иного микроорганизма, созданного методом рекомбинантной ДНК, но и применительно к самому микроорганизму. Этот подход учитывает как преднамеренные последствия, так и непреднамеренные. Вместо того чтобы определять каждый вид опасности, связанный с конкретным пищевым продуктом или микроорганизмом, его цель заключается в выявлении новых или измененных видов опасности по отношению к обычному аналогу.

6. Этот метод оценки безопасности вписывается в рамки концепции оценки риска, которая рассматривается в разделе 3 Принципов анализа риска пищевых продуктов, полученных методом современной биотехнологии. Если в ходе оценки безопасности выявлен новый или измененный вид опасности, проблема с питательными свойствами или иной фактор, представляющий интерес с точки зрения безопасности данного пищевого продукта, то сначала производится оценка риска с целью определить его отношение к здоровью человека. По итогам оценки безопасности и, в случае необходимости, дополнительной оценки риска данный пищевой продукт или компонент этого продукта, например, микроорганизм, используемый в процессе его производства, должен проверяться – до рассмотрения вопроса о его использовании в коммерческих целях – на соответствие критериям регулирования рисков согласно принципам анализа риска пищевых продуктов, полученных методом современной биотехнологии.

7. Помощь в проведении этого процесса оценки риска могут оказать такие меры по регулированию рисков, как послесбытовой мониторинг последствий для здоровья потребителей. Эти меры обсуждаются в пункте 20 Принципов анализа риска, связанного с пищевыми продуктами, полученными методами современной биотехнологии.

8. Настоящие Руководящие положения содержат описание рекомендуемых подходов к проведению оценки безопасности пищевых продуктов, полученных с использованием микроорганизмов, созданных методом рекомбинантной ДНК, путем их сопоставления с обычным аналогом. Оценка безопасности должна быть сосредоточена на определении безопасности рекомбинантных микроорганизмов, используемых в процессе производства пищевых продуктов, и, в надлежащих случаях, на метаболитах, выработанных в результате воздействия рекомбинантных микроорганизмов на данный пищевой продукт. В Руководящих положениях определяются данные и информация, которые обычно применяются к проведению таких оценок. При проведении сопоставления микроорганизма, созданного методом рекомбинантной ДНК, или пищевого продукта, полученного с использованием такого рекомбинантного микроорганизма, с их соответствующими обычными аналогами необходимо принимать во внимание любые обнаруженные различия, независимо от того, являются ли они результатом преднамеренных или непреднамеренных последствий. Кроме того, необходимо должным образом учитывать взаимодействие микроорганизма, созданного методом рекомбинантной ДНК, с пищевой матрицей или микрофлорой и безопасность любого экспрессированного нового белка или белков и вторичных продуктов обмена веществ. Хотя эти Руководящие положения предназначены для пищевых

⁴ Под стойкостью понимается выживание микроорганизмов в желудочно-кишечном тракте в течение времени, превышающего два интестинальных транзитных периода (Международный институт наук о жизни, «Оценка безопасности жизнеспособных генетически измененных микроорганизмов, используемых в качестве пищи», 1999 год, Брюссель; Совместная консультация экспертов ФАО/ВОЗ по пищевым продуктам, полученным методом биотехнологии – «Оценка безопасности пищевых продуктов, полученных с использованием генетически измененных микроорганизмов», 24-28 сентября 2001 год, Женева, Швейцария).

продуктов, полученных с использованием микроорганизмов, созданных методом рекомбинантной ДНК, или их компонентов, все же описанный в них подход можно в целом применить и к пищевым продуктам, полученным с использованием микроорганизмов, которые были изменены с помощью иных методов.

РАЗДЕЛ 2 – ОПРЕДЕЛЕНИЯ

9. К настоящим Руководящим положениям применяются следующие определения:

«Микроорганизм, созданный методом рекомбинантной ДНК» - означает бактерии, дрожжи или мицелиальные грибы, в которых генетический материал был изменен методом *in vitro* с использованием нуклеиновых кислот, включая рекомбинантную дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) и прямую инъекцию нуклеиновых кислот в клетки или оргanelлы.

«Обычный аналог»⁵ – означает:

- микроорганизм/штамм с известной предысторией безопасного использования в производстве и/или переработке пищевых продуктов и родственный штамму, созданному методом рекомбинантной ДНК. В пищевом продукте этот микроорганизм может быть жизнеспособным или может быть из него удален при переработке или лишен жизнеспособности в процессе переработки; или
- пищевой продукт, изготовленный с использованием традиционных микроорганизмов, применяемых в пищевой промышленности, в случае которых существует опыт определения безопасности на основе их обычного использования в пищевой промышленности.

РАЗДЕЛ 3 – ВВЕДЕНИЕ В СИСТЕМУ ОЦЕНКИ БЕЗОПАСНОСТИ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

10. Большинство пищевых продуктов, которое производится в результате целенаправленного размножения микроорганизмов, берет свое начало в глубокой древности и считалось безопасным задолго до того, как появились научные методы оценки безопасности. Микроорганизмы обладают такими свойствами, как быстрые темпы роста, которые позволяют производить генетические модификации, будь то с использованием обычных методов или методов современной биотехнологии, на протяжении коротких периодов времени. Микроорганизмы, используемые в производстве продовольствия, которые были созданы с помощью обычных методов генной инженерии, обычно не подвергались на систематической основе обстоятельной химической, токсикологической, эпидемиологической или медицинской оценке до их реализации на рынке. Вместо этого микробиологи, микологи и технологи пищевой промышленности оценивают новые штаммы бактерий, дрожжей и мицелиальные грибы для определения их фенотипических характеристик, которые могут быть использованы в производстве пищевых продуктов.

11. Оценка безопасности микроорганизмов, созданных методом рекомбинантной ДНК, должна предусматривать документальное отражение фактов использования родственных микроорганизмов в пищевых продуктах, отсутствие свойств, которые, как известно, характерны для патогенов, у микроорганизмов, полученных методом рекомбинантной ДНК, или у штаммов-реципиентов, используемых для конструирования микроорганизмов методами рекомбинантной ДНК, а также известных отрицательных явлений, обусловленных организмами-реципиентами, или смежными организмами. Кроме того, если микроорганизм, созданный методом рекомбинантной ДНК, непосредственно воздействует на пищевой продукт или остается в нем, то в этом случае необходимо изучить любые последствия для безопасности данного пищевого продукта.

12. Использование модели оценки токсикологических воздействий на животных является важнейшим элементом оценки риска многих соединений, например пестицидов. Однако в большинстве случаев свойства вещества, которое подвергается проверке, описаны точно, его чистота известна, конкретной питательной ценностью оно не обладает и уровень его воздействия на организм человека в целом низок. В этой связи нет ничего относительно предосудительного в том, чтобы давать такие соединения в корм животным в диапазоне доз, которые на несколько порядков превышают уровни ожидаемого воздействия на человека, с целью определить любые потенциальные и значимые неблагоприятные последствия для здоровья людей. Таким образом, в большинстве случаев можно оценить уровни воздействия, при которых отрицательные последствия не наблюдаются, и с помощью соответствующих коэффициентов безопасности установить безопасные уровни приема.

13. Проверить риски, связанные с пищевыми продуктами в целом, которые представляют собой сложную смесь соединений, зачастую характеризующихся широким ассортиментом веществ, входящих в их состав, и широким диапазоном питательной ценности, с помощью методов исследования на животных напрямую невозможно. С учетом их объема и воздействия на насыщение их можно использовать только для скармливания

⁵ Как признается, в обозримом будущем микроорганизмы, полученные методом современной технологии, в качестве обычных аналогов использоваться не будут.

животным в количестве, которое на несколько порядков ниже того количества, которое может присутствовать в рационе питания человека. К тому же, во избежание неблагоприятных последствий, которые не связаны непосредственно с самим материалом, при проведении исследований на животных в целях проверки пищевых продуктов необходимо в обязательном порядке проверить один из ключевых факторов – питательную ценность и сбалансированность используемого рациона питания. Поэтому обнаружение любых потенциальных неблагоприятных последствий и установление убедительным образом их связи с какой-либо конкретной характеристикой данного пищевого продукта может оказаться делом чрезвычайно трудным. Если описание данного пищевого продукта указывает на то, что для тщательной оценки безопасности имеющихся данных недостаточно, то в этом случае может потребоваться проведение надлежащим образом спланированных исследований на животных в целях определения воздействия этих пищевых продуктов в целом. Еще одно соображение, которое необходимо учитывать при принятии решения о необходимости проведения исследования на животных, заключается в целесообразности подвергать подопытных животных такому исследованию, если вероятность получить значимую информацию невелика.

14. Исследования на животных, которые обычно используются в процессе токсикологических оценок, также нельзя напрямую применить к проверке потенциальных рисков, связанных с поглощением микроорганизмов, используемых для производства пищевых продуктов. Микроорганизмы – это живые образования со сложной структурой, состоящей из многочисленных биохимических веществ, и в этой связи они с чистыми соединениями не сопоставимы. В некоторых переработанных пищевых продуктах они могут остаться жизнеспособными после переработки и поглощения и могут конкурировать и, в некоторых случаях, задерживаться в кишечнике в течение продолжительных периодов времени. Соответствующие исследования на животных следует использовать для оценки безопасности микроорганизмов, созданных методом рекомбинантной ДНК, в тех случаях, когда донор, ген или генный продукт не имеет предыстории безопасного использования в пищевых продуктах, с учетом имеющейся информации, касающейся донора и характеристик измененного генетического материала и генного продукта. Кроме того, для оценки питательной ценности данного пищевого продукта или биодоступности экспрессированного нового вещества в данном пищевом продукте можно использовать надлежащим образом спланированные исследования на животных.

15. С учетом трудностей применения традиционных токсикологических методов проверки и оценки риска, связанного с пищевыми продуктами в целом, для оценки безопасности пищевых продуктов, полученных с использованием микроорганизмов, созданных методом рекомбинантной ДНК, нужен более целенаправленный подход. Эта проблема решена путем разработки многоотраслевого подхода к оценке безопасности, в котором учитываются предусмотренные последствия, характер модификации и поддающиеся обнаружению непредусмотренные изменения, которые могут проявиться в микроорганизме или в его воздействии на пищевой продукт, с использованием концепции существенной эквивалентности⁶.

16. Хотя акцент в оценке безопасности будет сделан на микроорганизме, созданном методом рекомбинантной ДНК, все же при применении концепции существенной эквивалентности, которая является ключевым этапом в процессе оценки безопасности, необходимо принимать во внимание дополнительную информацию о взаимодействии этого микроорганизма с пищевой матрицей. Однако концепция существенной эквивалентности сама по себе не является оценкой безопасности. Она скорее представляет собой отправную точку, которая используется для построения схемы оценки безопасности как микроорганизма, созданного методом рекомбинантной ДНК, по отношению к его обычному аналогу, так и пищевого продукта, полученного с использованием рекомбинантного микроорганизма, по отношению к его обычному аналогу. Эта концепция используется для оценки сходств и различий между микроорганизмами, созданными методом рекомбинантной ДНК, которые используются в процессе переработки пищевых продуктов, а также между пищевым продуктом, полученным с использованием микроорганизмов, созданных методом рекомбинантной ДНК, и их соответствующими обычными аналогами, как они определяются в пункте 9. Она помогает выявить потенциальные проблемы, связанные с безопасностью и питательными свойствами, и в настоящее время рассматривается в качестве наиболее подходящего способа оценки безопасности пищевых продуктов, полученных с использованием микроорганизмов, созданных методом рекомбинантной ДНК. Оценка безопасности, полученная с использованием этого метода, отнюдь не предполагает абсолютную безопасность этого нового продукта; она скорее сосредоточена на оценке любых выявленных различий, что позволяет определить безопасность микроорганизма, созданного методом рекомбинантной ДНК, и пищевого продукта, полученного с использованием какого-либо рекомбинантного микроорганизма, по отношению к их соответствующим обычным аналогам.

⁶ Концепция *существенной эквивалентности*, изложенная на Совместной консультации экспертов ФАО/ВОЗ по пищевым продуктам, полученным методами биотехнологии – Аспекты безопасности генетически измененных растений, 29 мая – 2 июня 2000 года, Женева, Швейцария, и в разделе 4.3 доклада Совместной консультации экспертов ФАО/ВОЗ по пищевым продуктам, полученным методом биотехнологии – Аспекты безопасности пищевых продуктов, полученных с использованием генетически измененных микроорганизмов, 24 – 28 сентября 2001 года, Женева, Швейцария.

Непредусмотренные последствия

17. В процессе решения задачи по приданию тому или иному микроорганизму конкретного целевого признака (предусмотренные последствия) путем добавления, замены, изъятия или аранжировки определенных последовательностей ДНК, включая те, которые используются в целях передачи или сохранения ДНК в организмах-реципиентах, в некоторых случаях этот микроорганизм может приобрести дополнительные признаки либо утратить или видоизменить существующие признаки. Потенциальное возникновение непредусмотренных последствий не ограничивается применением метода *in vitro* с использованием нуклеиновых кислот. Речь в данном случае идет скорее о естественном и общераспространенном явлении, которое может также произойти в процессе разработки штаммов с использованием традиционных генетических методов и процедур или в результате воздействия на микроорганизмы предусмотренного или непредусмотренного «селекционного давления». Что касается других микроорганизмов, экологической приспособленности данного микроорганизма, воздействия этого микроорганизма на человека после его поглощения или безопасности пищевых продуктов, полученных с использованием этого организма, непредусмотренные последствия могут быть пагубными, благотворными или нейтральными. Непредусмотренные последствия в микроорганизмах, созданных методом рекомбинантной ДНК, могут также возникнуть в результате преднамеренной модификации последовательности ДНК либо в результате рекомбинации или иных естественных явлений в микроорганизме, созданном методом рекомбинантной ДНК. Оценка безопасности должна включать данные и информацию, которые позволяют снизить вероятность того, что микроорганизм, созданный методом рекомбинантной ДНК, будет иметь непредусмотренные неблагоприятные последствия для здоровья человека.

18. Непредусмотренные последствия могут быть обусловлены встраиванием новых для микроорганизма последовательностей ДНК в микробный геном; их можно сопоставить с последствиями, наблюдаемыми в результате деятельности перемещающихся генетических элементов, возникающих естественным путем. Встраивание ДНК может вызвать изменение экспрессии генов в геноме реципиента. Встраивание ДНК из гетерологических источников в ген может также привести к синтезу химерного белка, который также называется слитым белком. Кроме того, необходимо рассмотреть генетическую нестабильность и ее последствия.

19. Непредусмотренные последствия могут также привести к формированию новых или изменению существующих метаболитов. Например, экспрессия ферментов высокой концентрации или экспрессия фермента, который является новым для данного организма, может привести к возникновению вторичных биохимических последствий, к изменению функции регулирования способов обмена веществ или к изменению уровней метаболитов.

20. Непреднамеренные последствия, обусловленные генетической модификацией, можно подразделить на две группы: так называемые предсказуемые последствия и «неожиданные» последствия. Многие непредусмотренные последствия можно в значительной мере предсказать на основе известных данных о «встроенном» признаке и его метаболических последствиях или о месте «вставки». В связи с увеличением объема информации о микробных геномах и физиологии и с учетом повышения уровня специфичности функций генетических материалов, инъецируемых методом рекомбинантной ДНК, по сравнению с иными формами генетической манипуляции, предсказать непредусмотренные последствия той или иной конкретной модификации может оказаться проще. Для анализа потенциальных изменений на уровне транскрипции и трансляции, которые могут привести к возникновению непредусмотренных последствий, можно также использовать методы молекулярной биологии и биохимии.

21. Оценка безопасности пищевых продуктов, полученных с использованием микроорганизмов, созданных методом рекомбинантной ДНК, предполагает необходимость применения методики определения и обнаружения таких непредусмотренных последствий, а также процедур оценки их биологического характера и потенциального воздействия на безопасность пищевых продуктов. Для оценки непредусмотренных последствий нужны самые разнообразные данные и информация, поскольку обнаружить все возможные непреднамеренные последствия или установить с определенной долей уверенности те, которые имеют отношение к здоровью человека, с помощью какого-то одного теста невозможно. Эти данные и информация, если их проанализировать в совокупности, дают гарантию того, что данный пищевой продукт вряд ли окажет отрицательное воздействие на здоровье человека. Эта оценка непредусмотренных последствий проводится с учетом биохимических и физиологических характеристик микроорганизма, которые обычно подвергаются селекции в целях улучшения штаммов для их использования в производстве пищевых продуктов или напитков в коммерческих целях. Эти оценки представляют собой первый этап выбраковки микроорганизмов, которые обнаруживают непредусмотренные признаки. Микроорганизмы, созданные методом рекомбинантной ДНК, которые прошли первый этап этого скрининга, подвергаются оценке на предмет их безопасности в порядке, изложенном в разделе 4.

ПРИНЦИПЫ ОЦЕНКИ БЕЗОПАСНОСТИ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

22. Оценка безопасности того или иного пищевого продукта, полученного с использованием микроорганизма, созданного методом рекомбинантной ДНК, основана на определении безопасного использования данного микроорганизма, представляющем собой поэтапный процесс анализа соответствующих факторов, которые включают:

- А) описание микроорганизма, созданного методом рекомбинантной ДНК;
- Б) описание микроорганизма-реципиента и его использования в производстве пищевых продуктов;
- В) описание организма-донора или организмов-доноров;
- Г) описание генетического изменения или изменений, включая вектор и матрицу;
- Д) определение характеристик генетического изменения или изменений;
- Е) оценку безопасности:
 - а) экспрессированные вещества: оценка потенциальной токсичности и иных признаков, связанных с патогенностью;
 - б) анализы состава ключевых компонентов;
 - в) оценка метаболитов;
 - г) последствия переработки пищевых продуктов;
 - д) оценка иммунологического воздействия;
 - е) оценка жизнеспособности и стойкости микроорганизмов в желудочно-кишечном тракте человека;
 - ж) устойчивость к антибиотикам и передача гена; и
 - з) изменение питательных свойств.

23. В некоторых случаях характеристики данных микроорганизмов и/или пищевых продуктов, изготовленных/переработанных с использованием этих микроорганизмов, могут предполагать необходимость сбора дополнительных данных и информации для решения вопросов, которые присущи только данным микроорганизмам и/или пищевым продуктам, которые подвергаются анализу.

24. Эксперименты, имеющие целью собрать данные, необходимые для оценки безопасности, следует планировать и проводить в соответствии с научно обоснованными концепциями и принципами, а также при необходимости, в соответствии с надлежащей лабораторной практикой. Основные данные следует предоставлять в распоряжение органов нормативного регулирования по их требованию. Данные следует собирать с использованием научно обоснованных методов и анализировать с помощью соответствующих статистических приемов. Чувствительность всех аналитических методов следует отражать в соответствующей документации.

25. Цель каждой оценки безопасности – дать гарантию того, что в свете самых современных научных знаний данный продукт, в случае его приготовления или потребления в пищу в соответствии с тем видом использования, для которого он предназначен, никакого вреда не причинит, равно как и сам организм не должен причинять вреда, если такие жизнеспособные организмы остаются в пище. Оценки безопасности должны охватывать аспекты здравоохранения всего населения в целом, включая людей с нарушенной функцией иммунной системы, детей грудного возраста и престарелых. Ожидаемым конечным результатом такой оценки будет вывод о том, является ли новый пищевой продукт и/или микроорганизмы столь же безопасными, что и их обычные аналоги, с учетом диетологического воздействия любых изменений питательного содержания или питательной ценности этого продукта. Если, по предположениям, микроорганизм после поглощения останется жизнеспособным, его безопасность следует сопоставить с безопасностью его обычного аналога с учетом стойкости микроорганизма, созданного методом рекомбинантной ДНК, в желудочно-кишечном тракте и, при необходимости, с учетом взаимодействия между ним и желудочно-кишечной флорой млекопитающих (в особенности людей) и воздействия данного рекомбинантного микроорганизма на иммунную систему. Поэтому результат процесса оценки безопасности состоит, в сущности, в определении рассматриваемого продукта таким образом, чтобы специалисты по регулированию рисков могли установить, нужны ли в этой связи какие-либо меры по охране здоровья потребителей, и если нужны, то принять в этой связи хорошо обоснованные и надлежащие решения.

РАЗДЕЛ 4 – ОБЩИЕ СООБРАЖЕНИЯ

ОПИСАНИЕ МИКРООРГАНИЗМА, СОЗДАННОГО МЕТОДОМ РЕКОМБИНАНТНОЙ ДНК

26. Необходимо дать описание бактериального, дрожжевого или грибкового штамма и пищевого продукта, которые представлены в целях оценки безопасности. Для облегчения понимания природы организма или пищевого продукта, изготовленного с использованием данного организма, представленного в целях оценки безопасности, это описание должно быть достаточно подробным. Микроорганизмы, созданные методом рекомбинантной ДНК, которые используются в пищевой промышленности или содержатся в пищевых продуктах, должны сохраняться в качестве банка культур с соответствующей идентификацией на основе молекулярных методов и, предпочтительно, в созданных коллекциях культур. Это может облегчить анализ первоначальной оценки безопасности. Такой банк культур должен предоставляться в распоряжение органов нормативного регулирования по их требованию.

ОПИСАНИЕ МИКРООРГАНИЗМА-РЕЦИПИЕНТА И ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ПРОИЗВОДСТВЕ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ

27. Необходимо представить полное описание микроорганизма-реципиента или микроорганизма, подвергнутого модификации. Микроорганизмы-реципиенты должны иметь предысторию безопасного использования в производстве пищевых продуктов или безопасного потребления в пищу. Организмы, которые вырабатывают токсины, антибиотики или иные вещества, которые не должны присутствовать в пищевых продуктах или которые несут в себе генетические элементы, могущие привести к генетической нестабильности или устойчивости к антибиотикам или которые могут содержать гены, передающие функции, связанные с патогенностью (т.е. гены, известные также как векторы патогенности или факторы вирулентности) не должны использоваться в качестве реципиентов. Необходимые данные и информация должны включать следующие элементы, но не обязательно ограничиваться ими:

- А) идентификационные данные: научное название, общепринятое название или иное название (названия), используемые для каталогизации микроорганизма, обозначение штамма, информация о штамме и его источнике или номер регистрации, или иная информация из признанной коллекции культуры, из которой можно получить организм или его предшественников и, в случае применимости, информация, подтверждающая его таксономическое назначение;
- В) предыстория использования и культивирования, известная информация о развитии штамма (включая изоляцию мутаций или предшествующих штаммов, использованных для конструирования данного штамма); в частности, определяющие признаки, которые могут отрицательно воздействовать на здоровье человека;
- С) информация о генотипе и фенотипе микроорганизма-реципиента, имеющая отношение к его безопасности, включая любые известные токсины, антибиотики, факторы устойчивости к антибиотикам или иные факторы, относящиеся к его патогенности или иммунологическому воздействию, и информация о генетической стабильности микроорганизма;
- Д) предыстория безопасного использования в производстве пищевых продуктов или безопасного потребления в пищу; и
- Е) информация о соответствующих рабочих параметрах, используемых для культивирования микроорганизма-реципиента.

28. Соответствующую информацию о фенотипе и генотипе следует представлять не только по микроорганизму-реципиенту, но и по родственным видам и любым экстрахромосомным генетическим элементам, которые усиливают функции штамма-реципиента, особенно в том случае, если родственные виды используются в пищевых продуктах или причастны к патогенным последствиям для людей или животных. Следует принять во внимание информацию о генетической стабильности микроорганизма-реципиента, включая, в надлежащих случаях, наличие мобильных элементов ДНК, т.е. последовательностей «вставок», транспозонов, плазмид и профагов.

29. Предыстория использования может включать информацию о том, каким образом микроорганизм-реципиент обычно размножается, транспортируется и хранится, меры гарантии качества, которые обычно применяются, включая меры по проверке идентификационных данных штамма и рабочих спецификаций микроорганизмов и пищевых продуктов, и данные о том, сохраняют ли эти организмы жизнеспособность в переработанной пище, или вследствие переработки удаляются или теряют жизнеспособность.

ОПИСАНИЕ ОРГАНИЗМА-ДОНОРА ИЛИ ОРГАНИЗМОВ-ДОНОРОВ

30. Следует представить информацию об организме-доноре (организмах-донорах) и любых промежуточных организмах, в случае применимости, и, в соответствующих случаях, о родственных организмах.

Исключительно важно определить, проявляет ли донор или промежуточный организм(ы) или иные близкие родственные виды естественные характеристики патогенности или выработки токсинов и обладают ли они иными признаками, которые отрицательно сказываются на здоровье человека. Описание организма-донора или промежуточного организма (организмов) должно включать:

- А) идентификационные данные: научное название, общепринятое название или иное название (названия), используемые для каталогизации микроорганизма, обозначение штамма, информация о штамме и его источнике или номер регистрации, или иная информация из признанной коллекции культуры, из которой можно получить организм или его предшественников и, в случае применимости, информация, подтверждающая его таксономическое назначение;
- Б) информация об организме или родственных организмах, которое имеет отношение к безопасности пищевых продуктов;
- В) информация о генотипе и фенотипе микроорганизма, имеющая отношение к его безопасности, включая любые известные токсины, антибиотики, факторы устойчивости к антибиотикам или иные факторы, относящиеся к его патогенности, или иммунологическому воздействию; и
- Г) информация о прошлом и нынешнем использовании, если таковая имеется, в производстве пищевых продуктов и о пути или путях воздействия, помимо преднамеренного использования в пищевых продуктах (например, возможное наличие в качестве загрязнителей).

ОПИСАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ИЗМЕНЕНИЯ ИЛИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ, ВКЛЮЧАЯ ВЕКТОРЫ И МАТРИЦЫ

31. Следует представить достаточную информацию о генетическом изменении или изменениях, с тем чтобы можно было идентифицировать весь генетический материал, который может быть внесен в микроорганизм-реципиент или изменен в нем, и представить необходимую информацию для анализа данных, подтверждающих характеристики ДНК, добавленные в микробный геном, встроенные в него, измененные в нем или исключенные из него.

32. Описание процесса конструирования штамма должно включать:

- А) информацию о специфичном методе или методах, используемых для генетического изменения;
- Б) информацию о ДНК, использованной для изменения микроорганизма, включая источник (например, растительный, микробный, вирусный, синтетический), идентификационные данные и ожидаемую функцию в микроорганизме, созданном методом рекомбинантной ДНК, и число копий плазмид; и
- В) промежуточные организмы-реципиенты, включая организмы (например, другие бактерии или грибки), используемые для создания или трансформации ДНК до внесения в конечный организм-реципиент.

33. Следует представить информацию о добавленной, включенной, изъятой или измененной ДНК, включая:

- А) характеристики всех генетических компонентов, в том числе маркерные гены, векторные гены, регулятивные и иные элементы, воздействующие на функцию ДНК;
- Б) размер и идентификационные данные;
- В) место и ориентацию последовательности в окончательном векторе/матрице; и
- Г) функцию.

ХАРАКТЕРИСТИКИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ИЗМЕНЕНИЯ ИЛИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ

34. Для обеспечения четкого понимания воздействия генетического изменения на состав и безопасность пищевых продуктов, полученных с использованием микроорганизмов, созданных методом рекомбинантной ДНК, необходимо произвести всестороннее описание молекулярных и биохимических характеристик генетического изменения. Для облегчения оценки безопасности сегмент ДНК, подлежащий включению, должен предпочтительно ограничиваться последовательностями, необходимыми для осуществления предусмотренных функций.

35. Следует представить информацию об изменениях ДНК в микроорганизме, созданном методом рекомбинантной ДНК; она должна включать:

- А) описание характеристик, а также добавленных, включенных, изъятых или иным образом измененных генетических материалов, включая плазмиды или иные носители ДНК, используемые для передачи желаемых генетических последовательностей. Эта информация должна включать анализ потенциала мобилизации любых плазмид или иных использованных генетических элементов, место расположения добавленных, включенных, изъятых или иным образом измененных генетических

материалов (локализация на хромосомном или экстрахромосомном участке); если они расположены на многократной копии плазмиды, – число копий плазмиды;

- Б) число сайтов вставок;
- В) организацию измененного генетического материала в каждом сайте вставки, включая число копий и данные о последовательности встроенного, измененного или изъятых материала, плазмид или носителя ДНК, использованных для передачи желаемых генетических последовательностей, и окружающие последовательности. Это даст возможность идентифицировать любые экспрессированные вещества в качестве последовательности встроенного, измененного или изъятых материала;
- Г) идентификационные данные о любых раскрытых рамках считывания во встроенной ДНК или созданной путем изменения смежной ДНК в хромосоме или плазмиде, включая те, которые могут привести к синтезу слитых белков; и
- Д) конкретную ссылку на любые последовательности, которые, как известно, кодируют или воздействуют на экспрессию потенциально вредных функций.

36. Следует представить информацию о любых экспрессированных веществах в микроорганизме, созданном методом рекомбинантной ДНК; она должна включать:

- А) информацию о генном продукте (продуктах) (например, о белке или нетранслируемой РНК) или иную информацию, например, данные анализа транскрипции или экспрессии продуктов, позволяющие идентифицировать любые новые вещества, которые могут присутствовать в пищевом продукте;
- Б) функцию генного продукта;
- В) описание фенотипа нового признака (признаков);
- Г) уровень и сайт экспрессии (межклеточный, периплазматический – для грамотрицательных бактерий, на уровне органеллы – для эукариотических микроорганизмов, продукт секреции) в микроорганизме экспрессированного генного продукта (продуктов) и, в случае применимости, уровни его метаболитов в организме;
- Д) количество встроенного генного продукта или продуктов, если функция экспрессированных последовательностей/генов состоит в изменении специфической эндогенной мРНК или белка; и
- Е) отсутствие генного продукта или изменений в метаболитах, связанных с генными продуктами, если это применимо к преднамеренной функции или функциям генетического изменения или изменений.

37. Кроме того, следует представить информацию с целью:

- А) показать, сохранилось ли то же расположение измененного генетического материала⁷, или существенно ли изменилось его расположение после его встраивания в клетку и размножения рекомбинантного штамма до масштабов, необходимых для его использования в производстве пищевых продуктов, включая изменения, которые могут возникнуть в ходе его хранения в соответствии с нынешними методами;
- Б) показать, привела ли преднамеренная модификация, которой была подвергнута последовательность аминокислоты экспрессированного белка, к изменениям в его посттрансляционной модификации, или воздействует ли она на сайты, которые имеют исключительно важное значение для его структуры или функции;
- В) показать, было ли достигнуто преднамеренное последствие модификации, и что все экспрессированные признаки выражены и унаследованы таким образом, что они будут носить стабильный характер в масштабах размножения, необходимого для её использования в производстве пищевых продуктов и в соответствии с законами наследственности. Если характеристики фенотипа

⁷ Микробные геномы более подвижны, чем геномы высших эукариотов; это означает, что организмы размножаются быстрее, адаптируются к изменяющимся окружающим условиям и более подвержены изменениям. Хромосомные реаранжировки носят обычный характер. Общая генетическая пластичность микроорганизмов может воздействовать на рекомбинантную ДНК в микроорганизмах и должна быть рассмотрена в целях оценки стабильности микроорганизмов, созданных методом рекомбинантной ДНК.

невозможно измерить непосредственно, то в этом случае может оказаться необходимым изучить наследственность встроеной или модифицированной ДНК или экспрессию соответствующей РНК⁸;

- Г) показать, выражены ли новые экспрессированные признаки, как и ожидалось, и попали ли они в соответствующий сайт клетки-мишени или они выражены таким образом и на таких уровнях, которые соответствуют связанным с ними регуляторным последовательностям, вызывающим экспрессию соответствующего гена;
- Д) указать наличие любого факта, позволяющего предположить, что один или несколько генов в микроорганизме-реципиенте были подвержены процессу изменений или генетического обмена; и
- Е) подтвердить идентификационные данные и характер экспрессии любых новых слитых белков.

ОЦЕНКА БЕЗОПАСНОСТИ

38. Оценку безопасности измененного микроорганизма следует производить в каждом конкретном случае в зависимости от характера и масштабов внесенных изменений. Обычные токсикологические исследования можно, как считается, не проводить в тех случаях, когда данное вещество или близкое родственное вещество не представляет опасности при его приеме в пищу с учетом его функции и воздействия. В других случаях может потребоваться проведение обычных токсикологических или других соответствующих исследований на этом новом веществе. Кроме того, необходимо изучить последствия микроорганизма, созданного методом рекомбинантной ДНК, на пищевую матрицу. Если характеристики пищевого продукта указывают на то, что имеющихся данных для тщательной оценки безопасности недостаточно, может быть сочтено необходимым провести надлежащим образом спланированные исследования на животных или *in vitro* с микроорганизмом, созданным методом рекомбинантной ДНК, и/или с пищевым продуктом, изготовленным с его использованием.

Экспрессированные вещества: оценка потенциальной токсичности и других признаков, связанных с патогенностью

39. Когда вещество является для данных пищевых продуктов или процесса их переработки новым, необходимо использовать обычные токсикологические исследования или иные применимые исследования на новом веществе. Это может потребовать изоляции нового вещества из микроорганизма, созданного методом рекомбинантной ДНК, пищевого продукта, если данное вещество является продуктом секреции, или, при необходимости, синтеза или производства вещества из какого-либо альтернативного источника, в каком случае необходимо показать, что со структурной, функциональной и биохимической точек зрения этот материал эквивалентен тому материалу, который вырабатывается микроорганизмом, созданным методом рекомбинантной ДНК. Следует представить информацию об ожидаемом воздействии этого вещества на потребителей, потенциальном приеме и диетологическом воздействии.

40. Оценка безопасности экспрессированного вещества должна производиться с учетом его функции и концентрации в пищевом продукте. Кроме того, необходимо определить число жизнеспособных микроорганизмов, оставшихся в пищевом продукте, и сопоставить его с обычным аналогом. Все количественные измерения должны анализироваться с использованием соответствующих статистических приемов. Следует также рассмотреть диетологическое воздействие и возможные последствия для соответствующих подгрупп населения.

- В случае белков оценка потенциальной токсичности должна проводиться с учетом структуры и функции белка и должна ограничиваться определением сходных характеристик последовательностей аминокислот между белком и известными белковыми токсинами и антипитательными веществами (например, ингибиторами протеазы, сидерофорами), а также устойчивости к нагреванию или к переработке и расщеплению в соответствующих репрезентативных системах, имитирующих желудочно-кишечные условия. В тех случаях, когда белок присутствует в пищевом продукте, однако не обнаруживает тесного сходства с белками, которые ранее без всякой опасности потреблялись в пищу, и с учетом его биологической функции в микроорганизмах, если она известна, может потребоваться проведение соответствующих исследований на пероральную токсичность⁹
- Потенциальная токсичность небелковых веществ, которые не потреблялись в пищу безопасным образом, должна оцениваться в каждом конкретном случае в зависимости от идентификационных данных, концентрации и биологической функции вещества и его диетологического воздействия. Типы исследований,

⁸ Измененные штаммы должны поддерживаться таким образом, чтобы их можно было проверить на генетическую стабильность.

⁹ Руководящие принципы проведения исследований на пероральную токсичность были разработаны на международных форумах, например, Руководящие принципы проверки химических веществ ОЭСР.

которые необходимо провести, могут включать исследования, касающиеся метаболизма, токсикокинетики, хронической токсичности/ канцерогенности, воздействия на репродуктивную функцию и тератогенности.

41. Следует показать, что экспрессированные новые или измененные свойства не связаны ни с одной характеристикой организмов-доноров, которые могут быть вредны для здоровья человека. Необходимо представить информацию с целью убедиться в том, что гены, кодирующие известные токсины или антипитательные вещества, присутствующие в организмах-донорах, не передаются микроорганизмам, созданным методом рекомбинантной ДНК, которые обычно не экспрессируют эти токсические или антипитательные характеристики.

- Для оценки токсичности экспрессированных веществ могут потребоваться дополнительные исследования *in vivo* или *in vitro* в каждом конкретном случае с учетом потенциального накопления любых веществ, токсичных метаболитов или антибиотиков, которые могут проявиться в результате генетического изменения.

Анализ состава ключевых компонентов

42. Анализ концентрации ключевых компонентов¹⁰ пищевых продуктов, полученных с использованием микроорганизмов, созданных методом рекомбинантной ДНК, следует сопоставлять с результатами эквивалентного анализа обычного аналога, полученного в тех же условиях. Статистическую значимость любого наблюдаемого различия следует оценивать с учетом диапазона естественных колебаний этого параметра с целью определить его биологическое значение. В идеальном случае компаратор или компараторы, используемые в процессе этой оценки, должны быть пищевым продуктом, полученным с использованием близкого изогенного исходного штамма. Это сопоставление в сочетании, при необходимости, с оценкой воздействия имеет целью установить, что вещества, которые могут отрицательно сказаться на безопасности данного пищевого продукта, не были изменены таким образом, что это может оказать неблагоприятное воздействие на здоровье человека.

Воздействие метаболитов

43. Некоторые микроорганизмы, созданные методом рекомбинантной ДНК, возможно, изменились таким образом, что это привело к появлению новых различных метаболитов в пищевых продуктах, полученных с помощью этих организмов, или к изменению их уровней. Если установлено, что уровни метаболитов в пищевых продуктах изменились, то следует изучить их потенциальное воздействие на здоровье человека с использованием обычных процедур определения безопасности таких метаболитов (например, с помощью процедур оценки безопасности химических веществ в пищевых продуктах для здоровья человека).

44. Новые или измененные уровни метаболитов, выработанных микроорганизмом, созданным методом рекомбинантной ДНК, могут изменить популяцию микроорганизмов в смешанной культуре, потенциально повышая тем самым риск размножения вредных организмов или накопления вредных веществ. Если для переработки пищевых продуктов, например, для производства натурального сыра, «мизо», соевого соуса и т.п., используется смешанная культура микроорганизмов, следует оценить возможные последствия генетического изменения данного микроорганизма для других микроорганизмов.

Последствия переработки пищевых продуктов

45. Следует также изучить потенциальное воздействие переработки пищевых продуктов, в том числе приготовление в домашних условиях, на пищевые продукты, полученные с помощью микроорганизмов, созданных методом рекомбинантной ДНК. Например, в результате переработки могут произойти изменения параметров термостойкости эндогенных токсических веществ или биодоступности какого-либо важного питательного вещества. В этой связи необходимо представить информацию с описанием условий обработки, используемых в процессе производства данного пищевого продукта. Например, в случае йогурта, необходимо представить информацию о размножении организма и условиях культивирования.

¹⁰ Ключевые питательные вещества или ключевые антипитательные вещества – это те компоненты, содержащиеся в конкретном продукте, которые могут оказать существенное воздействие на рацион питания в целом. Ими могут быть важнейшие составляющие (жиры, белки, углеводы), ингибиторы ферментов в качестве антипитательных веществ или второстепенные соединения (минеральные соли, витамины). Ключевыми токсическими веществами являются те значимые с токсикологической точки зрения соединения, которые, как известно, вырабатываются данным микроорганизмом, например, те соединения, у которых уровень и эффективность токсических свойств могут иметь существенное значение для здоровья человека. В принципе, данных о том, что микроорганизмы, традиционно используемые в процессе переработки пищевых продуктов, вырабатывают такие соединения в производственных условиях, не существует.

Оценка иммунологического воздействия

46. Когда белок или белки, синтезированные в результате встроенного гена, присутствуют в пищевом продукте, его необходимо во всех случаях оценить на предмет потенциальной аллергенности. Следует рассмотреть вероятность того, что отдельные лица, возможно, уже чувствительны к данному белку, а также вопрос о том, вызовет ли данный белок, который является новым в данном пищевом продукте, аллергическую реакцию. Детальное изложение вопросов, подлежащих рассмотрению, содержится в приложении к настоящим Руководящим положениям.

47. Следует допускать, что гены, полученные из известных аллергенных источников, кодируют соответствующий аллерген, и в этой связи их следует избегать, если только научные данные не свидетельствуют об обратном. Передачу генов от организмов, известных тем, что они вызывают энтеропатию, чувствительную к растительным белкам, в людях с чувствительной реакцией, следует избегать, если только документально не подтверждено, что переданный ген не кодирует аллерген или белок, причастный к энтеропатии, чувствительной к растительным белкам.

48. Микроорганизмы, созданные методом рекомбинантной ДНК, которые сохраняют жизнеспособность в пищевых продуктах, могут взаимодействовать с иммунной системой в желудочно-кишечном тракте. Более пристальное изучение этих взаимодействий будет зависеть от вида различий между микроорганизмом, полученным методом рекомбинантной ДНК, и его обычным аналогом.

Оценка жизнеспособности и стойкости микроорганизмов в желудочно-кишечном тракте человека

49. В некоторых пищевых продуктах, полученных с использованием микроорганизмов, выведенных методом рекомбинантной ДНК, поглощение этих микроорганизмов и их стойкость¹¹ могут оказывать воздействие на желудочно-кишечный тракт человека. При решении вопроса о необходимости дальнейшей проверки таких микроорганизмов следует исходить из наличия их обычного аналога в пищевых продуктах и характера предусмотренных и непредусмотренных последствий генетических изменений. Если в результате переработки конечного пищевого продукта происходит уничтожение жизнеспособных микроорганизмов (в результате тепловой обработки, например, при выпечке хлеба) или если накопление конечных продуктов, токсичных для данного микроорганизма (таких, как спирты или кислоты) лишает их жизнеспособности, то тогда проверять жизнеспособность и стойкость микроорганизмов в системе пищеварения нет необходимости.

50. Для тех видов применения, когда используемые в производстве микроорганизмы, созданные методом рекомбинантной ДНК, сохраняют жизнеспособность в конечном пищевом продукте (например, организмы в некоторых молочных продуктах), может оказаться целесообразным показать жизнеспособность (или время обитания) микроорганизма самого по себе и в соответствующей пищевой матрице в пищеварительном тракте и его воздействие на кишечную микрофлору в соответствующих системах. Масштабы такой проверки будут определяться характером предусмотренных и непредусмотренных последствий и степенью его отличия от обычного аналога.

Устойчивость к антибиотикам и передача генов

51. Как правило, традиционные штаммы микроорганизмов, созданные для использования в процессах переработки пищевых продуктов, на устойчивость к антибиотикам не оцениваются. Многие микроорганизмы, используемые в производстве пищевых продуктов, обладают присущей им устойчивостью к конкретным антибиотикам. Такие свойства не должны являться поводом для исключения таких штаммов в качестве реципиентов при конструировании микроорганизмов методом рекомбинантной ДНК. Однако штаммы, устойчивость которых к антибиотикам кодируется передаваемыми генетическими элементами, – в тех случаях, когда такие штаммы или эти генетические элементы присутствуют в конечном пищевом продукте, – использоваться не должны. Любой факт, указывающий на присутствие плазмид, транспозонов и интегронов, содержащих такие гены, необходимо изучать отдельно.

52. В целях селекции микроорганизмов, созданных методом рекомбинантной ДНК, следует использовать альтернативные технологии, которые подтвердили свою безопасность на практике и не используют маркерные гены устойчивости к антибиотикам в жизнеспособных микроорганизмах, содержащихся в пищевых продуктах.

¹¹ Постоянная колонизация поглощенными микроорганизмами в течение всей жизни – явление редкое. Некоторые микроорганизмы, поглощенные пероральным путем, были обнаружены в фекальных веществах или в слизи ободочной кишки через несколько недель после прекращения приема данного продукта в пищу. Независимо от того сохраняется генетически измененный микроорганизм в желудочно-кишечном тракте или нет, возможность того, что он может воздействовать на микрофлору или на млекопитающее-хозяина, остается (Совместная консультация экспертов ФАО/ВОЗ по пищевым продуктам, полученным методом биотехнологии – *Безопасная оценка пищевых продуктов, полученных с использованием генетически измененных микроорганизмов*, 24-28 сентября 2001 года, Женева, Швейцария).

Как правило, использование маркеров, устойчивых к антибиотикам, для конструирования промежуточных штаммов не должно создавать никакой серьезной опасности, которая исключала бы возможность использования конечных штаммов в производстве пищевых продуктов, при условии, что маркерные гены, устойчивые к антибиотикам, из конечного сконструированного штамма удаляются.

53. Поскольку между местной кишечной микрофлорой и поглощенными микроорганизмами, созданными методом рекомбинантной ДНК, может происходить передача плазмид и генов, следует также рассмотреть возможность и последствия такой передачи генов от микроорганизмов, созданных методом рекомбинантной ДНК, и пищевыми продуктами, полученными с помощью таких микроорганизмов, микроорганизмам желудочно-кишечного тракта или клеткам человека. В условиях отсутствия селективного давления переданная ДНК вряд ли сохранится. Тем не менее, полностью сбрасывать со счетов возможность таких явлений нельзя.

54. Для того чтобы свести возможность передачи генов к минимуму, необходимо рассмотреть следующие шаги:

- А) хромосомная интеграция встроенного генетического материала может оказаться предпочтительнее локализации на плазмиде;
- Б) если микроорганизм, созданный методом рекомбинантной ДНК, сохраняет в желудочно-кишечном тракте жизнеспособность, то в генетической конструкции следует избегать использования генов, которые могли бы дать преимущество с точки зрения селекции организмам-реципиентам, которым был непреднамеренно передан генетический материал; и
- В) при конструировании встраиваемого генетического материала следует избегать последовательностей, через которые может произойти интеграция в другие геномы.

ИЗМЕНЕНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СВОЙСТВ

55. Оценка возможных изменений в составе ключевых питательных веществ, которая должна проводиться для всех пищевых продуктов, полученных с помощью микроорганизмов, созданных методом рекомбинантной ДНК, уже рассматривалось в разделе «Анализ состава ключевых компонентов». Если такие изменения питательного состава были произведены, то такие пищевые продукты должны подвергаться дополнительной оценке на определение питательных свойств с целью оценить последствия изменений и выяснить вопрос о том, может ли измениться количество приема питательных веществ в результате включения таких пищевых продуктов в рацион питания.

56. Для оценки возможного приема в пищу продуктов, полученных с использованием микроорганизма, созданного методом рекомбинантной ДНК, следует использовать информацию об известной структуре использования и потребления такого продукта и его производных. Для оценки диетологических последствий изменения структуры питательных веществ как на обычном, так и на максимальном уровнях потребления необходимо использовать величину ожидаемого приема такого пищевого продукта. Оценка, основанная на максимально возможном уровне потребления, дает гарантию того, что потенциал любых нежелательных диетологических последствий будет обнаружен. При этом необходимо обращать внимание на конкретные физиологические характеристики и потребности с точки зрения обмена веществ конкретных групп населения, таких как младенцы, дети, беременные и кормящие грудью женщины, пожилые и все те, кто страдает хроническими болезнями или у кого нарушена иммунная система. Результаты анализа диетологических последствий и потребностей конкретных подгрупп населения могут свидетельствовать о необходимости проведения дополнительных оценок питательных свойств. Важно также выяснить, в какой степени измененный питательный элемент биологически доступен и сохраняет стабильность в течение времени и в процессе переработки и хранения.

57. Использование методов современной биотехнологии для изменения уровня питательных свойств в пищевых продуктах, получаемых с использованием микроорганизмов, может привести к существенному изменению характера питательных свойств. Преднамеренное видоизменение микроорганизма может привести к изменению общего характера питательных свойств данного продукта, которое, в свою очередь, может сказаться на диетологическом статусе отдельных лиц, потребляющих этот продукт. Воздействие изменений, которые могут сказаться на общем характере питательных свойств, подлежит определению.

58. Если результатом изменения, является какой-либо пищевой продукт, состав которого существенно отличается от его обычного аналога, то в качестве компараторов, позволяющих оценить диетологическое воздействие данного продукта, может быть целесообразным использовать другие обычные продукты питания или их компоненты (например, продукты, у которых состав питательных веществ ближе к составу продукта, полученного с использованием микроорганизма, созданного методом рекомбинантной ДНК).

59. Некоторые пищевые продукты могут нуждаться в дополнительной проверке. Например, в случае пищевых продуктов, полученных с использованием микроорганизмов, созданных методом рекомбинантной ДНК, могут быть оправданы исследования на животных, если ожидается что биодоступность питательных веществ

изменится или их состав будет несопоставим с обычными пищевыми продуктами. Кроме того, в случае пищевых продуктов, предназначенных для укрепления здоровья, могут понадобиться конкретные диетологические, токсикологические и другие соответствующие исследования. Если характеристики данного пищевого продукта указывают на то, что имеющихся данных для проведения тщательной оценки безопасности недостаточно, то в этом случае можно потребовать проведения должным образом разработанных исследований на животных с использованием данных продуктов в целом.

ПЕРЕСМОТР ОЦЕНКИ БЕЗОПАСНОСТИ

60. Оценка безопасности имеет целью сделать вывод о том, является ли пищевой продукт, полученный с использованием микроорганизма, созданного методом рекомбинантной ДНК, столь же безопасным, что и его обычный аналог с учетом диетологического воздействия любых изменений на содержание и ценность питательных свойств. Тем не менее, оценку безопасности следует пересматривать с учетом новой научной информации, которая ставит под сомнения выводы, сделанные по результатам первоначальной оценки безопасности.

Приложение: оценка возможной аллергенности

РАЗДЕЛ 1 – ВВЕДЕНИЕ

1. Все новые экспрессированные белки¹² выработанные микроорганизмами, созданными методом рекомбинантной ДНК, которые могут присутствовать в конечном продукте, должны оцениваться на предмет их потенциала вызывать аллергические реакции. Эта оценка имеет целью выяснить следующие вопросы: является ли новый экспрессированный белок именно тем белком, к которому уже могут быть чувствительны некоторые люди, и может ли какой-либо новый белок в пищевом рационе вызвать аллергическую реакцию у определенной группы людей.

2. В настоящее время какого-либо окончательного теста, на который можно было бы положиться в плане предсказания аллергической реакции у людей на новый экспрессированный белок, не существует, поэтому в оценке возможной аллергенности новых экспрессированных белков рекомендуется использовать комплексный, поэтапный и индивидуальный подход, описанный ниже. В соответствии с этим подходом в расчет принимаются факты, выведенные из различных видов информации и данных, поскольку ни один критерий сам по себе не позволяет сделать достаточно точный прогноз.

3. Конечным результатом оценки является определение вероятности того, что данный белок является пищевым аллергеном.

РАЗДЕЛ 2 – КОНЦЕПЦИЯ ОЦЕНКИ

4. На начальных этапах оценки возможной аллергенности любых новых экспрессированных белков определяются следующие моменты: источник привнесенного белка; любое существенное сходство между последовательностью аминокислот белка и последовательностью известных аллергенов; и его структурные свойства, включая подверженность расщеплению под действием ферментов и стойкость к теплу и/или обработке в кислотной и ферментной среде, но не ограничиваясь ими.

5. Поскольку какого-либо одного теста, который позволял бы предсказать возможность ответной реакции иммуноглобулина Е человека на пероральное воздействие, не существует, первым шагом по определению характеристик новых экспрессированных белков должно быть сопоставление последовательности аминокислот и некоторых физико-химических характеристик нового экспрессированного белка с характеристиками уже установленных аллергенов на основе имеющихся фактических данных. Это предполагает необходимость изоляции любых новых экспрессированных белков из микроорганизмов, созданных методом рекомбинантной ДНК, либо синтеза или получения вещества из альтернативного источника, в каком-либо случае необходимо показать, что материал по своей структуре, функциям и биохимическим свойствам эквивалентен материалу, выработанному рекомбинантными организмами. Особое внимание следует уделять выбору хозяина экспрессии, поскольку на аллергенный потенциал белка могут оказать воздействие посттрансляционные модификации, которые допускаются различными хозяевами (т.е. эукариотические системы против прокариотических систем).

6. Кроме того, важно выяснить следующий вопрос: известно ли, что данный источник может вызвать аллергические реакции. В любом случае следует допускать, что гены, полученные из известных аллергенных источников, кодируют соответствующий аллерген, если только научные данные не свидетельствуют об обратном.

РАЗДЕЛ 3 – ПЕРВОНАЧАЛЬНАЯ ОЦЕНКА

РАЗДЕЛ 3.1 – ИСТОЧНИК БЕЛКА

7. В качестве части данных, подтверждающих безопасность пищевых продуктов, полученных с использованием микроорганизмов, созданных методом рекомбинантной ДНК, информация должна включать любые сообщения об аллергенности, связанной с организмом-донором. В качестве аллергенных источников генов будут определяться те организмы, по которым имеются разумные фактические данные, свидетельствующие об аллергии, вызванной реакцией иммуноглобулина Е на пероральное, респираторное или контактное воздействие. Знание источника привнесенного белка позволяет идентифицировать средства и соответствующие данные, которые следует рассмотреть в ходе оценки аллергенности. Они включают наличие

¹² Эта концепция оценки не применяется к выяснению вопроса о том, могут ли новые экспрессированные белки вызвать энтеропатию к растительным белкам или другим веществам. Вопрос энтеропатии уже рассматривается в оценке возможной аллергенности (белков), пункт 47 Руководящих положений по проведению оценки безопасности пищевых продуктов, полученных с использованием микроорганизмов, созданных методом рекомбинантной ДНК. Кроме того, эта концепция не применяется к оценке пищевых продуктов, в случае которых для целей подавления аллергической реакции активность генов снижена.

сывороток для целей скрининга; документально подтвержденные данные о типе, серьезности и частоте аллергических реакций; структурные характеристики и последовательность аминокислот; физико-химические и иммунологические свойства (если они имеются) известных аллергенных белков из данного источника.

РАЗДЕЛ 3.2 – ГОМОЛОГИЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ АМИНОКИСЛОТ

8. Сопоставление гомологии последовательностей имеет целью оценить степень, в которой новый экспрессированный белок схож по своей структуре с известным аллергеном. Эта информация дает возможность сделать вывод о наличии у этого белка аллергенного потенциала. Необходимо произвести поиск гомологии последовательностей в целях сопоставления структуры всех новых экспрессированных белков со всеми известными аллергенами. Для предсказания общих структурных сходств необходимо провести поиск с использованием различных алгоритмов, таких как FASTA или BLASTP. Для определения последовательностей, которые могут представлять собой линейные эпитопы, необходимо также использовать такую методику, как поэтапный поиск смежных идентичных сегментов аминокислот. Для того чтобы свести к минимуму возможность неправильных негативных или неправильных позитивных результатов, объем поиска смежных сегментов аминокислот следует определять исходя из научно обоснованных предпосылок¹³. Для того чтобы получить биологически значимые результаты, необходимо использовать утвержденные процедуры поиска и оценки.

9. Между экспрессированным новым белком и известным аллергеном может, как считается, существовать перекрестная реактивность с иммуноглобулином E в том случае, если в сегменте насчитывается 80 или более аминокислот (FAO/WHO 2001) или если на этот счет есть другие научно обоснованные критерии. Вся информация, полученная в результате сопоставления гомологии последовательностей между экспрессированным новым белком и известными аллергенами, должна отражаться в отчете, с тем чтобы в каждом конкретном случае можно было провести научно обоснованную оценку.

10. Поиски гомологии последовательностей страдают определенными недостатками. В частности, такие сопоставления ограничиваются последовательностями известных аллергенов в имеющихся базах данных общего пользования и в научной литературе. Кроме того, они не всегда способны обнаружить прерывистые эпитопы, которые могут соединяться со специфичными антителами иммуноглобулина E.

11. Отрицательный результат поиска гомологии последовательностей указывает на то, что экспрессированный новый белок не является известным аллергеном и вряд ли обладает перекрестной реактивностью с известными аллергенами. Результат, указывающий на отсутствие существенной гомологии последовательностей, следует рассматривать в процессе оценки аллергенного потенциала экспрессированных новых белков вместе с другими данными, указанными в настоящей концепции. В соответствующих случаях необходимо проводить дополнительные исследования (см. также разделы 4 и 5). Положительный результат поиска гомологии последовательностей указывает на то, что экспрессированный новый белок, вероятно, является аллергенным. Если этот продукт следует подвергнуть более глубокому изучению, то его необходимо исследовать с помощью сыворотки от людей, чувствительных к идентифицированному аллергенному источнику.

РАЗДЕЛ 3.3 – УСТОЙЧИВОСТЬ К ПЕПСИНАМ

12. У некоторых пищевых аллергенов наблюдается устойчивость к расщеплению пепсином; таким образом, между устойчивостью к расщеплению пепсином и аллергенным потенциалом существует определенная связь¹⁴. Поэтому устойчивость белка к разрушению в присутствии пепсина в соответствующих условиях указывает на необходимость дальнейшего анализа в целях установления вероятности того, что экспрессированный новый белок обладает свойством аллергена. Полезность этого метода можно повысить путем разработки последовательного и хорошо обоснованного протокола определения устойчивости к пепсину. Однако следует учитывать, что отсутствие устойчивости к пепсину не исключает того, что экспрессированный новый белок может быть соответствующим аллергеном.

13. Хотя протокол определения устойчивости к пепсину рекомендуется использовать самым настоятельным образом, все же следует признать, что в настоящее время существуют и другие протоколы определения

¹³ Консультация FAO/ВОЗ, состоявшаяся в 2001 году, пришла к выводу о целесообразности перейти от поиска 8 идентичных сегментов аминокислот до 6. Чем меньше последовательность пептидов, используемая в поэтапном сопоставлении, тем больше вероятность неправильных позитивных результатов, и напротив, чем больше используемая последовательность пептидов, тем выше вероятность получения неправильных негативных результатов, что тем самым снижает полезность такого сопоставления

¹⁴ Для установления этой связи был использован метод, изложенный в фармакопее США (1995 год) (Astwood *et al.*1996).

устойчивости к ферментам. В случае представления надлежащего обоснования можно использовать альтернативные протоколы¹⁵.

РАЗДЕЛ 4 – СКРИНИНГ НА СПЕЦИФИЧНУЮ СЫВОРОТКУ

14. Для тех белков, которые происходят из источника, который, как известно, является аллергенным, или гомология последовательностей которого совпадает с известным аллергеном, и в тех случаях, когда имеются соответствующие сыворотки, необходимо проводить иммунологическое испытание. Для проверки специфического связывания белка с антителами класса иммуноглобулина Е в ходе испытания *in vitro* можно использовать сыворотку от людей, у которых аллергия на данный источник белка подтверждена клиническими методами. Исключительно важным вопросом такого испытания является наличие сыворотки человека от достаточного числа людей¹⁶. Кроме того, для получения объективного результата испытания, качество сывороток и процедура испытаний должны быть стандартизованы. В случае белков из источников, о которых не известно, являются ли они аллергенными или нет, и которые не обнаруживают гомологии последовательностей при сопоставлении с известным аллергеном, можно рассмотреть вопрос о проведении адресного скрининга сыворотки в тех случаях, когда такие проверки, как описано в пункте 17, являются доступными.

15. В случае экспрессированного нового белка, полученного из известного аллергенного источника, негативный результат иммунологического испытания *in vitro* нельзя считать достаточным. Его следует рассматривать как подтверждение необходимости проведения дополнительного испытания, например возможного использования теста на коже и протоколов *ex vivo*¹⁷. Положительный результат таких испытаний будет указывать на потенциальный аллерген.

РАЗДЕЛ 5 – ПРОЧИЕ СООБРАЖЕНИЯ

16. Абсолютная подверженность воздействию экспрессированного нового белка и последствия соответствующей обработки пищевых продуктов будут, в общем и целом, подтверждать вывод о том, что он обладает потенциальным риском для здоровья человека. В этой связи при определении видов обработки, которые будут применяться, и их воздействия на присутствие белка в конечном пищевом продукте следует учитывать характер данного пищевого продукта, который предназначен для потребления.

17. По мере накопления научных знаний и развития технического прогресса для оценки потенциала аллергенности экспрессированных новых белков можно использовать, в качестве одного из компонентов методики оценки, другие методы и средства. Эти методы должны быть научно обоснованы и могут включать адресный скрининг сыворотки (т.е. оценку связывания с иммуноглобулином Е в сыворотке людей, которые обнаруживают подтвержденную клиническими методами аллергическую реакцию на в целом родственные категории пищевых продуктов); создание международных банков сыворотки; использование животных моделей; и изучение экспрессированных новых белков применительно к Т-клеточным эпитопам и структурным фрагментам, связанным с аллергенами.

¹⁵ Ссылка на Совместную консультацию экспертов ФАО/ВОЗ (2001 год).

¹⁶ В соответствии с докладом Совместной консультации экспертов ФАО/ВОЗ по аллергенности пищевых продуктов, полученных методом биотехнологии (22 – 25 января 2001 год, Рим, Италия), для обеспечения 99-процентной уверенности в том, что новый белок не является аллергеном (в случае, если речь идет о важнейшем аллергене), требуется не менее 8 соответствующих сывороток. Аналогичным образом в случае второстепенного аллергена для достижения такого же уровня уверенности требуется не менее 24 соответствующих сывороток. Такое количество сывороток для целей испытаний, как признается, может быть недоступным.

¹⁷ Ссылка на Совместную консультацию экспертов ФАО/ВОЗ (2001 год) по описанию *ex vivo*.